



SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE QUITOSANA CARREGADAS COM QUERCETINA E LUTEOLINA PARA POTENCIAL APLICAÇÃO CONTRA O VÍRUS DA INFLUENZA AVIÁRIA

Milagros Y. Ramirez Tinta¹; Erick Peña Bedón¹, Ana C. Valderrama Negrón¹

¹Laboratório de Investigação em Biopolímeros e Metalofármacos (LIBIPMET), Faculdade de Ciências, Universidad Nacional de Ingeniería, Lima, Peru.

erick.pena.b@uni.pe

Palavras-Chave: gelificação iônica, flavonoides, nanoencapsulação, quitosana

Introdução

As doenças virais continuam representando um importante desafio para a saúde pública, a produção animal e a economia mundial. Entre elas, a influenza aviária destaca-se pelo elevado impacto sanitário e econômico, causando altas taxas de mortalidade em aves, perdas significativas para a indústria avícola e restrições ao comércio internacional, além do potencial risco de transmissão entre espécies (Badshah et al., 2021). No Peru, surtos recentes de influenza aviária reforçaram a necessidade de desenvolver novas estratégias para complementar as medidas de prevenção e controle da doença.

Nesse contexto, a nanotecnologia tem se consolidado como uma alternativa promissora para o desenvolvimento de sistemas de liberação de compostos bioativos. As nanopartículas poliméricas de quitosana apresentam elevada biocompatibilidade, biodegradabilidade, baixa toxicidade e capacidade de encapsular moléculas terapêuticas, protegendo-as da degradação e promovendo sua liberação controlada (Elnosary et al., 2023). Entre os métodos de síntese, a gelificação iônica utilizando tripolifosfato de sódio (TPP) destaca-se por sua simplicidade, eficiência e por dispensar o uso de solventes orgânicos tóxicos (Elnosary et al., 2023; Hadidi et al., 2020).

Os flavonoides quercetina e luteolina têm despertado interesse devido às suas propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias e antivirais. Estudos demonstram que esses compostos podem atuar em diferentes etapas do ciclo de infecção viral, incluindo a entrada, a replicação e a disseminação do vírus da influenza (Yan et al., 2019). Entretanto, sua aplicação terapêutica é limitada pela baixa solubilidade em meio aquoso, reduzida estabilidade e baixa biodisponibilidade, fatores que podem comprometer sua eficácia (Roy & Rhim, 2021).

A encapsulação individual desses flavonoides em nanopartículas de quitosana representa uma estratégia promissora para aumentar sua estabilidade, proteger os compostos



bioativos e favorecer sua liberação controlada (Elnosary et al., 2023). Assim, o objetivo deste trabalho foi sintetizar nanopartículas de quitosana carregadas individualmente com quercetina e luteolina por gelificação iônica, caracterizar suas propriedades físico-químicas por meio de microscopia eletrônica de varredura (SEM), espalhamento dinâmico de luz (DLS), potencial zeta, espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) e análise termogravimétrica (TGA), bem como determinar a eficiência de encapsulação dos flavonoides, visando sua futura avaliação da atividade antiviral frente ao vírus da influenza aviária em ovos embrionados de galinha.

As doenças virais continuam representando um importante desafio para a saúde pública, a produção animal e a economia mundial. Entre elas, a influenza aviária destaca-se pelo elevado impacto sanitário e econômico, causando altas taxas de mortalidade em aves, perdas significativas para a indústria avícola e restrições ao comércio internacional, além do potencial risco de transmissão entre espécies. No Peru, surtos recentes de influenza aviária reforçaram a necessidade de desenvolver novas estratégias para complementar as medidas de prevenção e controle da doença. Nesse contexto, a nanotecnologia tem se consolidado como uma alternativa promissora para o desenvolvimento de sistemas de liberação de compostos bioativos. As nanopartículas poliméricas de quitosana apresentam elevada biocompatibilidade, biodegradabilidade, baixa toxicidade e capacidade de encapsular moléculas terapêuticas, protegendo-as da degradação e promovendo sua liberação controlada. Entre os métodos de síntese, a gelificação iônica utilizando tripolifosfato de sódio (TPP) destaca-se por sua simplicidade, eficiência e por dispensar o uso de solventes orgânicos tóxicos.

Os flavonoides quercetina e luteolina têm despertado interesse devido às suas propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias e antivirais. Estudos demonstram que esses compostos podem atuar em diferentes etapas do ciclo de infecção viral, incluindo a entrada, a replicação e a disseminação do vírus da influenza. Entretanto, sua aplicação terapêutica é limitada pela baixa solubilidade em meio aquoso, reduzida estabilidade e baixa biodisponibilidade, fatores que podem comprometer sua eficácia. A encapsulação individual desses flavonoides em nanopartículas de quitosana representa uma estratégia promissora para aumentar sua estabilidade, proteger os compostos bioativos e favorecer sua liberação controlada, individualmente com quercetina ou luteolina voltadas para aplicações contra o vírus da influenza aviária. Dessa forma, o desenvolvimento e a caracterização desses sistemas nanoestruturados podem contribuir para o avanço de novas alternativas terapêuticas para essa enfermidade.

Assim, o objetivo deste trabalho foi sintetizar nanopartículas de quitosana carregadas individualmente com quercetina e luteolina por gelificação iônica, caracterizar suas propriedades físico-químicas por meio de microscopia eletrônica de varredura (SEM), espalhamento dinâmico de luz (DLS), potencial zeta, espectroscopia no infravermelho por



transformada de Fourier (FTIR) e análise termogravimétrica (TGA), bem como determinar a eficiência de encapsulação dos flavonoides, visando sua futura avaliação da atividade antiviral frente ao vírus da influenza aviária em ovos embrionados de galinha.

Material e Métodos

As nanopartículas de quitosana carregadas com quercetina e luteolina foram preparadas separadamente pelo método de gelificação iônica, conforme descrito por Tuesta-Chávez et al. (2022), com adaptações. A quitosana foi dissolvida em tampão ácido acético/acetato de sódio (pH 4,7) sob agitação durante 24 h. As soluções de quercetina ou luteolina foram preparadas em água:PEG 400 (1:1, v/v) e adicionadas à solução de tripolifosfato de sódio (TPP), sendo posteriormente gotejadas sobre a solução de quitosana sob agitação contínua (850 rpm) durante 40 min. Em seguida, as suspensões foram submetidas à sonicação (60 % de amplitude) por 5 min para redução do tamanho das partículas.

As nanopartículas foram caracterizadas por espalhamento dinâmico de luz (DLS) quanto ao diâmetro hidrodinâmico, índice de polidispersidade (PDI) e potencial zeta, utilizando um analisador Zetasizer Ver. 7.13. A morfologia foi avaliada por microscopia eletrônica de varredura (SEM), as interações químicas por espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) e a estabilidade térmica por análise termogravimétrica (TGA).

A eficiência de encapsulação foi determinada por ultrafiltração a 15.000 rpm durante 1,5 h, seguida da quantificação do flavonoide não encapsulado por espectrofotometria UV-Vis, utilizando 365 nm para luteolina e 375 nm para quercetina. O perfil de liberação foi avaliado por diálise em tampão PBS à temperatura ambiente durante cinco dias, com coleta de alíquotas de 3 mL a cada 12 h para determinação da concentração liberada. A estabilidade das nanopartículas carregadas e sem carga foi avaliada após armazenamento a 4 °C durante sete dias, monitorando-se o diâmetro hidrodinâmico, o índice de polidispersidade e o potencial zeta nos dias 1, 4 e 7. Os ensaios de atividade antiviral em ovos embrionados SPF frente ao vírus da influenza aviária serão realizados em colaboração com o Laboratório de Patologia Aviária da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidad Nacional Mayor de San Marcos (UNMSM).

Resultados e Discussão

As nanopartículas de quitosana foram sintetizadas com sucesso pelo método de gelificação iônica utilizando tripolifosfato de sódio (TPP) como agente reticulante. Conforme apresentado na Tabela 1, a formulação sem flavonoides (NPQ) apresentou diâmetro hidrodinâmico médio de $103,1 \pm 2,0$ nm, índice de polidispersidade (IPD) de $0,17 \pm 0,01$ e potencial zeta de $+38,4 \pm 2,3$ mV, indicando elevada estabilidade coloidal e distribuição homogênea das partículas. A incorporação da quercetina promoveu um aumento discreto do diâmetro para $120,1 \pm 4,6$ nm, mantendo baixo IPD ($0,21 \pm 0,01$) e potencial zeta de $+22,5 \pm 1,0$ mV. Por outro lado, as nanopartículas contendo luteolina apresentaram diâmetro médio de $195,7 \pm 14,4$ nm, IPD de $0,28 \pm 0,05$ e potencial zeta de $+19,9 \pm 0,7$ mV, evidenciando maior

tamanho e heterogeneidade da dispersão. A redução do potencial zeta após a encapsulação dos flavonoides sugere interações entre os grupos fenólicos e os grupos amino protonados da quitosana, comportamento semelhante ao descrito por (Hafizi et al., 2021)

Tabla 1

TEM de nanopartículas cargadas y sin cargado

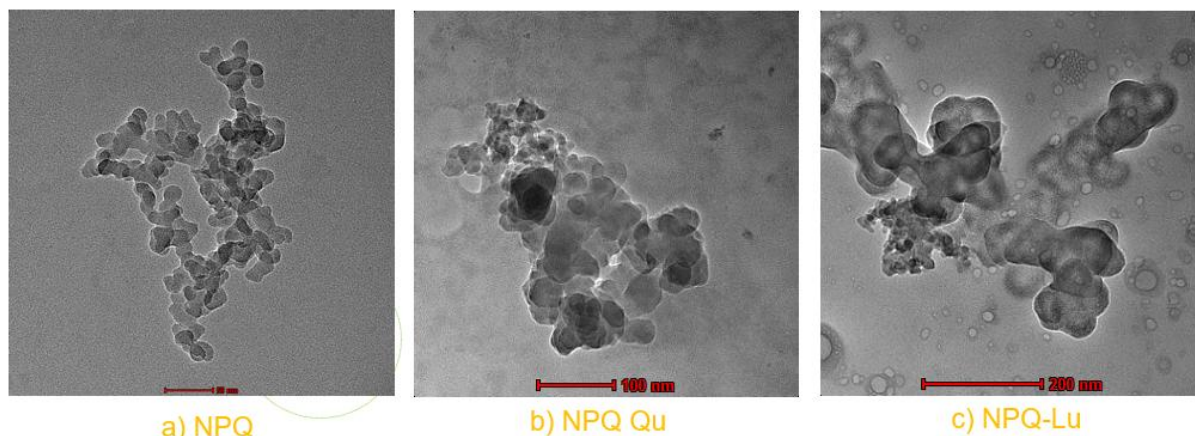
	Parametro	1	2	3	Promedio	SD
NPQ	Diametro (nm)	101.7	105.4	102.3	103.1	2.0
	IPD	0.174	0.188	0.161	0.2	0.014
	PZ (mV)	40.43	35.83	38.86	38.4	2.34
NPQ - Qu	Diametro (nm)	122.3	123.2	114.8	120.1	4.61
	IPD	0.207	0.212	0.196	0.2	0.01
	PZ (mV)	23.63	21.89	21.86	22.5	1.01
NPQ - Lu	Diametro (nm)	186.4	212.3	188.5	195.7	14.39
	IPD	0.298	0.322	0.218	0.3	0.05
	PZ (mV)	19.29	19.78	20.6	19.9	0.66

A eficiência de encapsulação dos flavonoides foi determinada por espectroscopia UV-Vis após a separação do composto livre. As nanopartículas contendo quercetina apresentaram eficiência de encapsulação de $66,9 \pm 4,9\%$, enquanto as nanopartículas contendo luteolina apresentaram valor médio de $43,1 \pm 23,3\%$. A maior eficiência observada para a quercetina pode estar relacionada à maior interação entre seus grupos hidroxila fenólicos e a matriz de quitosana/TPP, favorecendo sua retenção no sistema nanoparticulado. Em contraste, a menor eficiência e elevada variação experimental observada para a luteolina podem estar associadas à sua menor estabilidade durante o processo de encapsulação, à solubilidade limitada em meio aquoso e à maior tendência de agregação, fatores que também podem explicar o aumento do diâmetro hidrodinâmico e do IPD observado para essa formulação.

As micrografias obtidas por microscopia eletrônica de transmissão (Figura 1) evidenciaram nanopartículas predominantemente esféricas a quase esféricas. As formulações NPQ e NPQ-Qu apresentaram partículas menores e distribuição relativamente uniforme, enquanto as nanopartículas contendo luteolina exibiram maior tamanho e tendência à agregação, corroborando os resultados obtidos por espalhamento dinâmico de luz (DLS). As dimensões observadas encontram-se dentro da faixa normalmente reportada para nanopartículas de quitosana preparadas por gelificação iônica (Ahmad et al., 2023).

Figura 1

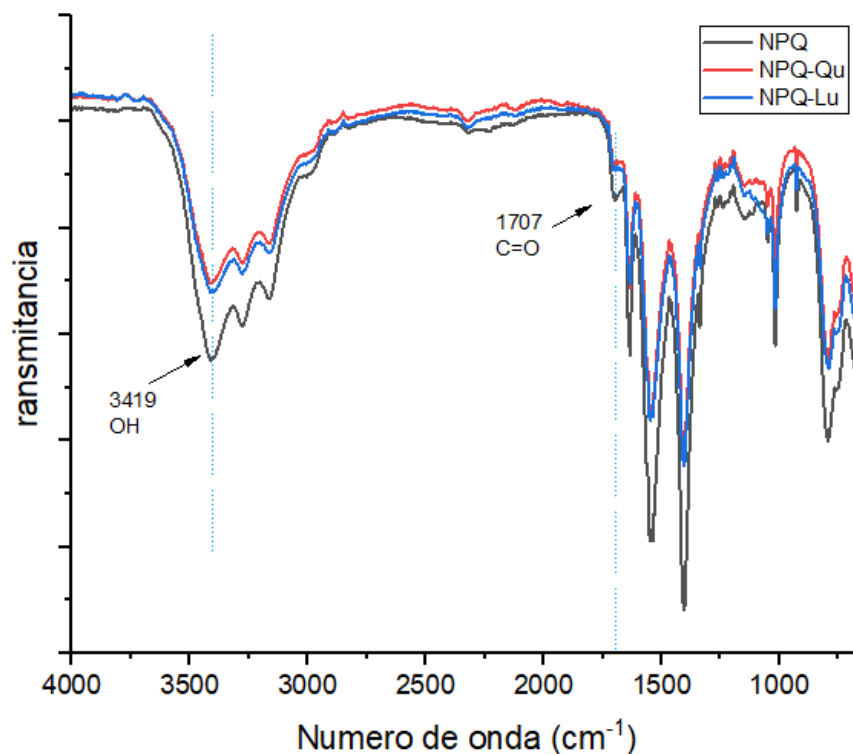
TEM de nanopartículas cargadas y sin cargado



Os espectros de FTIR (Figura 2) revelaram, para as nanopartículas carregadas com quercetina, as bandas características do flavonoide associadas às vibrações aromáticas (~ 1100 e 1600 cm^{-1}) e aos grupos fenólicos ($1200\text{--}1400\text{ cm}^{-1}$). Observou-se aumento da intensidade das bandas relacionadas aos grupos hidroxila fenólicos, bem como redução da intensidade e deslocamento da banda atribuída ao grupo carbonila ($\sim 1660\text{ cm}^{-1}$), indicando a formação de ligações de hidrogênio entre a quercetina e a matriz de quitosana/TPP. Além disso, os espectros de NPQ e NPQ-Qu apresentaram bandas características semelhantes, porém com menor intensidade na formulação carregada, sugerindo que a encapsulação ocorreu sem alterações estruturais significativas da matriz polimérica, indicando que a quercetina encontra-se tanto adsorvida na superfície quanto incorporada ao interior das nanopartículas (Jardim et al., 2022; Nguyen & Goycoolea, 2017).

Figura 2

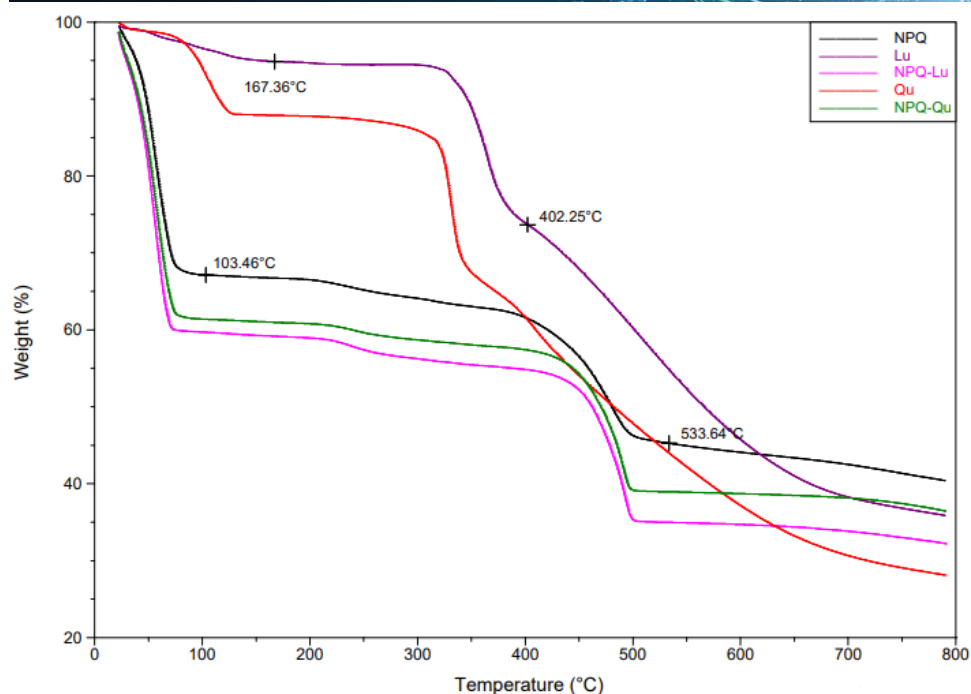
Espectros FTIR de luteolina, nanopartículas de quitosano (NPQ), NPQ-Qu y NPQ-Lu



As curvas termogravimétricas (Figura 3) evidenciaram comportamento térmico característico das nanopartículas de quitosana, apresentando perda inicial de massa associada à eliminação da água adsorvida, seguida pela degradação da matriz polimérica em temperaturas mais elevadas. As formulações contendo flavonoides apresentaram discretas modificações no perfil de degradação em comparação às nanopartículas sem carga, indicando interação entre os compostos bioativos e o polímero, em concordância com estudos anteriores

Figura 3

TGA de nanopartículas cargadas, sin cargado, y quercetina y luteolina



A estabilidade coloidal das formulações foi monitorada durante sete dias por meio da determinação do diâmetro hidrodinâmico e do índice de polidispersidade (Tabela 2). As nanopartículas NPQ e NPQ-Qu apresentaram pequenas variações no diâmetro médio ($106,0 \pm 3,7$ nm e $113,8 \pm 2,2$ nm, respectivamente), mantendo baixos valores de IPD, o que demonstra boa estabilidade durante o período de armazenamento. Em contraste, as nanopartículas contendo luteolina apresentaram maior variação no diâmetro ($219,7 \pm 42,8$ nm) e aumento do IPD ($0,43 \pm 0,13$), indicando maior heterogeneidade e tendência à agregação ao longo do armazenamento (Essa et al., 2023).

Tabla 2

TGA de nanopartículas cargadas, sin cargado, y quercetina y luteolina

Nanopartículas	Parametro	D 1	D 4	D 7	Promedio	SD	RSD (%)
NPQ	Diametro (nm)	102.3	106.1	109.7	106.0	3.7	3
	IPD	0.165	0.184	0.152	0.2	0.016	10
NPQ - Qu	Diametro (nm)	114.8	111.3	115.3	113.8	2.18	2
	IPD	0.196	0.255	0.289	0.2	0.05	19
NPQ - Lu	Diametro (nm)	212.3	265.8	181.1	219.7	42.84	19
	IPD	0.322	0.385	0.571	0.4	0.13	30

Em conjunto, os resultados apresentados nas Tabelas 1 e 2 e nas Figuras 1, 2 e 3 confirmam a obtenção de nanopartículas de quitosana capazes de encapsular quercetina e luteolina, apresentando tamanho nanométrico, estabilidade coloidal e características físico-químicas adequadas para sistemas de liberação controlada de compostos bioativos.(Roy & Rhim, 2021)



A formulação contendo quercetina apresentou maior estabilidade físico-química quando comparada à formulação contendo luteolina, demonstrando maior potencial para aplicações biomédicas.(Ahmad et al., 2023; Jardim et al., 2022) Os ensaios de atividade antiviral frente ao vírus da influenza aviária encontram-se em fase de desenvolvimento e serão realizados em ovos embrionados de galinha, permitindo correlacionar as propriedades físico-químicas das formulações com sua eficácia antiviral.

Conclusões

Neste trabalho, foram sintetizadas nanopartículas de quitosana carregadas com quercetina e luteolina pelo método de gelificação iônica utilizando tripolifosfato de sódio (TPP) como agente reticulante. Os resultados obtidos demonstraram a formação de sistemas nanoparticulados com características físico-químicas adequadas, apresentando tamanhos nanométricos, distribuição homogênea de partículas e estabilidade coloidal satisfatória. A formulação sem flavonoides apresentou diâmetro hidrodinâmico de $103,1 \pm 2,0$ nm, enquanto a incorporação dos compostos bioativos resultou em partículas de $120,1 \pm 4,6$ nm para quercetina e $195,7 \pm 14,4$ nm para luteolina.

As análises de potencial zeta indicaram a manutenção de carga superficial positiva após a incorporação dos flavonoides, sugerindo a interação entre os grupos fenólicos dos compostos bioativos e a matriz de quitosana/TPP. A eficiência de encapsulação demonstrou maior incorporação da quercetina ($66,9 \pm 4,9\%$) em comparação à luteolina ($43,1 \pm 23,3\%$), indicando maior afinidade da quercetina pela estrutura polimérica. As análises morfológicas por microscopia eletrônica de transmissão confirmaram a obtenção de nanopartículas predominantemente esféricas, enquanto as análises de FTIR e TGA evidenciaram interações entre os flavonoides e a matriz polimérica, sem alterações significativas na estrutura do sistema nanoparticulado.

A avaliação da estabilidade durante sete dias demonstrou que as nanopartículas contendo quercetina apresentaram maior estabilidade físico-química, com menor variação de tamanho e polidispersidade quando comparadas às formulações contendo luteolina. Dessa forma, as nanopartículas de quitosana carregadas com quercetina apresentaram propriedades mais favoráveis para aplicação como sistemas de liberação controlada de compostos bioativos. Os ensaios de atividade antiviral frente ao vírus da influenza aviária encontram-se em fase de desenvolvimento e permitirão avaliar a relação entre as características físico-químicas das nanopartículas e seu potencial efeito antiviral.

Agradecimentos

Agradecemos à Universidade Nacional de Engenharia (UNI), ao LIBIPMET e aos colaboradores pelo apoio técnico e científico no desenvolvimento deste trabalho

Referências

AHMAD, N.; KHAN, M. R.; PALANISAMY, S.; MOHANDOSS, S. Anticancer Drug-Loaded Chitosan Nanoparticles for In Vitro Release, Promoting Antibacterial and Anticancer Activities. *Polymers*, 15(19), 3925, 2023.



BADSHAH, S. L.; FAISAL, S.; MUHAMMAD, A.; POULSON, B. G.; EMWAS, A. H.; JAREMKO, M. Antiviral Activities of Flavonoids. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 140, 111596, 2021.

ESSA, D.; KONDIAH, P. P. D.; KUMAR, P.; CHOONARA, Y. E. Design of Chitosan-Coated, Quercetin-Loaded PLGA Nanoparticles for Enhanced PSMA-Specific Activity on LnCap Prostate Cancer Cells. *Biomedicines*, 11(4), 1201, 2023.

HAFIZI, T.; SHAHRIARI, M. H.; ABDOUSS, M.; KAHDESTANI, S. A. Synthesis and Characterization of Vancomycin-Loaded Chitosan Nanoparticles for Drug Delivery. *Research Square*, 2021.

JARDIM, K. V.; SIQUEIRA, J. L. N.; BÃO, S. N.; PARIZE, A. L. In Vitro Cytotoxic and Antioxidant Evaluation of Quercetin Loaded in Ionic Cross-Linked Chitosan Nanoparticles. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 74, 103561, 2022.

NGUYEN, H. T.; GOYCOOLEA, F. M. Chitosan/Cyclodextrin/TPP Nanoparticles Loaded with Quercetin as Novel Bacterial Quorum Sensing Inhibitors. *Molecules*, 22(11), 1975, 2017.

ROY, S.; RHIM, J. W. Fabrication of Chitosan-Based Functional Nanocomposite Films: Effect of Quercetin-Loaded Chitosan Nanoparticles. *Food Hydrocolloids*, 121, 107065, 2021.