

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel
Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial
Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos

Tese



**Microencapsulação de própolis utilizando matrizes proteicas para aplicação
como ingrediente funcional em alimentos**

Cristina Jansen Alves

Pelotas, 2018

Cristina Jansen Alves

**Microencapsulação de própolis utilizando matrizes proteicas para aplicação
como ingrediente funcional em alimentos**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, da Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, da Universidade Federal de Pelotas como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Comitê de Orientação: Prof. PhD Rui Carlos Zambiasi

Prof^a. Dr^a. Caroline Dellinghausen Borges

Pelotas, 2018

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

A314m Alves, Cristina Jansen

Microencapsulação de própolis utilizando matrizes proteicas para aplicação como ingrediente funcional em alimentos / Cristina Jansen Alves ; Rui Carlos Zambiasi, Caroline Dellenghausen Borges, orientadores. — Pelotas, 2018.

132 f. : il.

Tese (Doutorado) — Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, 2018.

1. Extrato de própolis. 2. Atividade antioxidante. 3. Atividade antimicrobiana. 4. Compostos fenólicos. 5. Spray drying. I. Zambiasi, Rui Carlos, orient. II. Borges, Caroline Dellenghausen, orient. III. Título.

CDD : 664

Cristina Jansen Alves

Microencapsulação de própolis utilizando matrizes proteicas para aplicação como ingrediente funcional em alimentos

Tese aprovada como requisito parcial, para obtenção do grau de Doutor em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas.

Data da defesa: 02 de março de 2018.

Banca examinadora:

.....
Prof. Dr Rui Carlos Zambiasi
(Orientador) Doutor em Food and Nutrition Science pela University of Manitoba

.....
Prof^a. Dr^a Márcia de Mello Luvielmo
Doutora em Ciência de Alimentos pela Universidade Estadual de Campinas

.....
Dr^a Leticia Marques de Assis
Doutora em Engenharia e Ciência de Alimentos pela Universidade Federal do Rio Grande

.....
Prof^a. Dr^a. Andressa Carolina Jacques
Doutora em Ciência e Tecnologia Agroindustrial pela Universidade Federal de Pelotas

.....
Dr^a Deborah Murowaniecki Otero
Doutora em Engenharia e Ciência de Alimentos pela Universidade Federal do Rio Grande

Dedico este trabalho aos meus pais Claudete
e João Carlos com todo meu amor.

Agradecimentos

A Deus por sua presença, seu conforto e por transformar minhas idealizações em sua vontade.

A toda minha família, em especial aos meus pais, que são minha fonte de carinho, amor e paciência e que não mediram forças para que eu pudesse realizar os meus sonhos.

Ao meu marido, Gilson Alves Júnior, por toda paciência, amor, amizade, companheirismo, e por sempre me acalmar nos momentos mais difíceis.

Ao professor Rui Carlos Zambiasi, pelos anos de orientação, por todo o ensinamento, pela tranquilidade que sempre conduziu nossas reuniões e por me permitir realizar este trabalho.

À professora Caroline Borges, pela sua amizade, disponibilidade, dedicação e empenho com este trabalho, estando sempre pronta para ajudar.

A todos os meus amigos e colegas que passaram pelo Laboratório de Cromatografia agradeço pela parceria não só nos trabalhos e projetos, mas também pelos momentos de descontração, conversas e risadas. Sentirei muitas saudades!

Ao CDTEC (UFPe), ao professor Fabio Leite e ao *pós-doc* Rodrigo Cunha pelo auxílio na utilização do *spray drying*.

Aos laboratórios CEME-SUL (FURG), Central Analítica (UFPe), CDC-Bio (UFPe) pela realização de análises fundamentais para esse projeto, em especial a Cátia Radatz e Josiane Rutz pela agilidade com que realizaram as análises.

Ao Laboratório de Microbiologia do DCTA, em especial ao professor Wladimir Padilha da Silva e a doutoranda Darla Volcan por toda ajuda com a parte de atividade antimicrobiana.

Ao professor Fabio Chaves e as doutorandas Giovana Zandoná e Bianca Camargo pela realização da análise no HPLC-MS.

A professora Marcia Gularte pelo auxílio na escolha e execução da análise sensorial.

Às *pós-doc* do DCTA: Deborah Otero, Shanise Halal e Helen Hackbart pelo auxílio nas análises e nos gráficos. A todos os professores e funcionários do DCTA.

Aos integrantes da banca pela disposição de participarem.

À UFPEL, CCQFA, CDTEC e DCTA pela oportunidade para a realização deste trabalho. À Capes pela concessão da bolsa.

“Tua caminhada ainda não terminou.
A realidade te acolhe dizendo que pela frente
o horizonte da vida necessita de tuas palavras e do teu silêncio.
Se amanhã sentires saudades, lembra-te da fantasia
e sonha com tua próxima vitória.”
(Charles Chaplin)

Resumo

JANSEN-ALVES, Cristina. **Microencapsulação de própolis utilizando matrizes proteicas para aplicação como ingrediente funcional em alimentos**. 2018. 132 f. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

A própolis apresenta propriedades benéficas à saúde que são atribuídas a presença de compostos fenólicos, porém, devido ao forte sabor e odor e a baixa solubilidade em água, sua aplicação em alimentos é limitada. A técnica de encapsulação protege os compostos bioativos da degradação, além de tornar possível sua liberação sob condições específicas e aumentar a sua solubilidade. Esta técnica tem sido utilizada para minimizar as características indesejáveis da própolis e facilitar sua aplicação em produtos variados, mantendo sua atividade biológica. Com isto, este estudo teve como objetivo microencapsular extrato de própolis (EP) utilizando como material de parede as proteínas do arroz, da ervilha, da soja e da ovoalbumina, com a técnica de *spray drying*, para aplicação das micropartículas em alimentos. No capítulo I o EP foi caracterizado quanto aos compostos fenólicos e a capacidade antioxidante. As micropartículas de EP produzidas foram caracterizadas quanto à eficiência, capacidade antioxidante, morfologia, comportamento térmico, grupos funcionais, cristalinidade, rendimento, propriedades físicas, além de ser avaliada a digestão gastrointestinal *in vitro* após a aplicação das micropartículas em pudim e queijo minas Frescal. O EP apresentou alta concentração de apigenina e luteolina, e as micropartículas apresentaram eficiência de encapsulação superior a 70%. A atividade antioxidante da própolis foi mantida nas micropartículas. As técnicas de DSC, ATR-FTIR e difração de Raios-X confirmaram a encapsulação. As micropartículas variaram em forma, tamanho e características físicas, podendo serem armazenadas em um ambiente de baixa umidade. No queijo a micropartícula de proteína concentrada de ervilha (PCE) demonstrou os melhores resultados na liberação gastrointestinal, uma vez que apresentou maior liberação no intestino, enquanto que as outras micropartículas poderiam ser utilizadas para produção de pudim. No capítulo II foi utilizado como material de parede a PCE, a qual apresentou os melhores resultados no primeiro estudo, e por isso foi utilizada para continuação do trabalho. Micropartículas foram produzidas pelo método de *spray drying* utilizando diferentes concentrações de EP e de PCE como material de parede. Após, realizou-se a caracterização e a avaliação das atividades antioxidante e antimicrobiana das micropartículas produzidas. A melhor concentração de EP foi de 5% (p/v) e de PCE foi de 2% (p/v), por apresentar a maior eficiência de encapsulação, maior atividade antioxidante e melhor rendimento. O aumento na concentração do EP e da PCE nas micropartículas não influenciou na morfologia das micropartículas, as quais apresentaram superfície arredondada com dobras e concavidades. O ATR-FTIR e a difração de Raios-X confirmaram a encapsulação do EP e demonstraram que a microencapsulação possibilitou uma proteção do EP. O EP apresentou atividade antimicrobiana frente a bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, e as micropartículas com 2% de PCE, e com 2,5% e 5% de EP apresentaram efeito bacteriostático e bactericida contra *Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes*. No capítulo III, o uso de proteína concentrada de ervilha (PCE) em diferentes concentrações para a microencapsulação de EP foi analisado, juntamente com as propriedades físicas, morfológicas e de estabilidade térmica das micropartículas. Além disso, as micropartículas com maior eficiência de encapsulação foram incorporadas em bolo, o qual foi avaliado em diversos

parâmetros sensoriais. Das três formulações testadas usando diferentes concentrações de PCE, as micropartículas com PCE 2% apresentaram a maior eficiência de encapsulação e maior estabilidade térmica em relação ao EP puro. Apesar do *spray drying* ter causado redução no total de compostos fenólicos analisados, a atividade antioxidante das micropartículas não foi afetada. Porém, ocorreu redução no teor de compostos fenólicos e na atividade antioxidante das micropartículas após o forneamento. A formulação PCE 2% foi adicionada na elaboração de bolo, sendo que as características de cor, sabor, odor e textura deste foram semelhantes as do bolo controle.

Palavras-chave: extrato de própolis; atividade antioxidante; atividade antimicrobiana; compostos fenólicos; *spray drying*; aplicação em alimentos; proteínas.

Abstract

JANSEN-ALVES, Cristina. **Microencapsulation of propolis uses protein matrices for application as a functional ingredient in foods**. 2018. 132 f. Thesis (Doctorate) – Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

Propolis has health benefits that are attributed to the presence of phenolic compounds, but due to its strong taste and odor and low solubility in water, its application in food is limited. The encapsulation technique protects the bioactive compounds from degradation, in addition makes possible their release under specific conditions and increase their solubility. This technique was used to minimize the undesirable properties of propolis and its application in varied products, maintaining its biological activities. This study aimed at microencapsulate extract of propolis (EP) using as wall material rice, pea, soybean and egg albumin proteins, with a spray-drying technique, intending apply the microparticles in foods. In Chapter I the EP was characterized for the phenolic compounds and antioxidant capacity. The microparticles of EP produced were characterized in terms of efficiency, antioxidant capacity, morphology, thermal behavior, functional groups, crystal, yield and physical properties, and the gastrointestinal digestion was evaluated in vitro after application of the microparticles in pudding and cheese mines Frescal. The EP presented high concentration of apigenin and luteolin, and the microparticles presented encapsulation efficiency superior to 70%. The antioxidant activity of propolis was maintained in the microparticles. The DSC, ATR-FTIR and X-ray diffraction techniques confirmed the encapsulation. As the microparticles varied in shapes, equipment and physical characteristics, they could be stored in a low-unit environment. The microparticle of concentrated protein of pea (PCE) demonstrated the best results in the gastrointestinal release when it was incorporated in cheese, since they present a greater liberation without intestine, whereas like other microparticles would be for pudding production. In chapter II it was used as wall material PCE, which one presented the best results in the preliminary study (chapter I). Microparticles were produced by the spray-drying method, using different concentrations of EP and PCE as the wall material. Afterwards, it were characterized and evaluated the antioxidant and antimicrobial activities of the microparticles produced. The best EP concentration was 5% (w / v) and PCE was 2% (w / v), due to its higher encapsulation efficiency, higher antioxidant activity and better yield. The increase in the concentration of PE and PCE in the microparticles did not influence the morphology of the microparticles, as they presented a rounded surface with folds and concavities. ATR-FTIR and an X-ray diffraction confirmed encapsulation of PE and demonstrated that a microencapsulation protected the EP. The EP presented antimicrobial activity against Gram-positive and Gram-negative bacteria, and as microparticles with 2% PCE and with 2.5% and 5% of EP presented bacteriostatic and bactericidal effect against *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*. In Chapter III, the use of concentrated pea protein (PCE) at different concentrations for microencapsulation of PE was analyzed, along with the physical, morphological and thermal stability properties of the microparticles. In addition, microparticles with higher encapsulation efficiency were incorporated in cake, which was evaluated in several sensory parameters. Of the three formulations tested using different concentrations of PCE, the microparticles with PCE 2% presented higher encapsulation efficiency and greater thermal stability over pure EP. Despite spray

drying caused reduction of phenolic compounds content, the antioxidant activity of the microparticles was not affected. However, there was a reduction in the content of phenolic compounds and in the antioxidant activity of the microparticles after cooking process. A 2% PCE formulation was added in cake making the color, flavor, odor and texture characteristics similar as for control cake.

Keywords: propolis extract; antioxidant activity; antimicrobial activity; phenolic compounds; food application; proteins.

Lista de Figuras

Figura 1	Esquema do funcionamento de um <i>spray dryer</i>	27
Figura 2	Ligação peptídica entre aminoácidos	30
Capítulo 1	Microencapsulação de própolis em matrizes proteicas por <i>spray drying</i> para aplicação em alimentos	
Figura 1	Termogramas de DSC: a1) extrato de própolis, b1) proteína de arroz, c1) micropartícula de extrato de própolis com proteína de arroz. a2) extrato de própolis, b2) proteína de ervilha, c2) micropartícula de extrato de própolis com proteína de ervilha. a3) extrato de própolis, b3) proteína de soja, c3) micropartícula de extrato de própolis com proteína de soja. a4) extrato de própolis, b4) proteína ovoalbumina, c4) micropartícula de extrato de própolis com proteína ovoalbumina	50
Figura 2	Espectros de ATR-FTIR para a) MPA: micropartícula de extrato de própolis (EP) com proteína de arroz (PA); b) ME: micropartícula de EP com proteína de ervilha (PE); c) MS: micropartícula de EP com proteína de soja (PS); d) MO: micropartícula de EP com proteína de ovoalbumina (PO). EPL: Extrato de própolis liofilizado	51
Figura 3	Espectros de difração de raios-X de extrato de própolis liofilizado (EPL), das micropartículas vazias (MV), e das micropartículas de extrato de própolis (MP). MVA: micropartícula vazia com proteína de arroz; MA: micropartícula de extrato de própolis com proteína de arroz; MVE: micropartícula vazia com proteína de ervilha; ME: micropartícula de extrato de própolis com proteína de ervilha; MVS: micropartícula vazia com proteína de soja; MS: micropartícula de extrato de própolis com proteína de soja; MVO: micropartícula vazia com proteína ovoalbumina; MO: micropartícula de extrato de própolis com ovoalbumina.....	53

Figura 4	Imagens da morfologia das micropartículas de extrato de própolis com proteína de arroz (A- 700× e B- 4000×); micropartícula de extrato de própolis com proteína de ervilha (C- 700× e D- 4000×); micropartícula de extrato de própolis com proteína de soja (E- 700× e F- 4000×); micropartícula com extrato de própolis com proteína ovoalbumina (G- 700× e H- 4000×).....	55
Figura 5	Liberação dos compostos fenólicos de queijo e pudim adicionados de micropartículas de extrato de própolis, durante a simulação do trato gastrointestinal, onde os primeiros 120 minutos correspondem à fase gástrica (estômago) e dos 180 minutos até os 360 minutos à fase intestinal (intestino delgado). (As barras verticais representam os intervalos de confiança a 95%).....	59
Capítulo 2	Produção de micropartículas de própolis revestidas com proteína de ervilha: caracterização e avaliação das atividades antioxidante e antimicrobiana	
Figura 1	Curvas de viscosidade das soluções de proteína concentrada de ervilha e extrato de própolis a 25 °C.....	74
Figura 2	Morfologia de micropartículas com diferentes concentrações de extrato de própolis (EP) e de proteína concentrada de ervilha (PCE): A) 1% de EP e 2% de PCE e; B) 2,5% de EP e 2% de PCE; C) 5% de EP e 2% de PCE; D) 1% de EP e 4% de PCE; E) 2,5% de EP e 4% de PCE; F) 5% de EP e 4% de PCE; G) 1% de EP e 6% de PCE; H) 2,5% de EP e 6% de PCE; I) 5% de EP e 6% de PCE. (ampliação de 3000×).....	77
Figura 3	Espectro ATR-FTIR de micropartículas de extrato de própolis (EP) revestidas com proteína concentrada de ervilha (PCE). EPL: extrato de própolis liofilizado. MV: Micropartícula Vazia. A) Tratamento 1: 1% de EP e 2% de PCE; Tratamento 2: 2,5% de PE e 2% de PCE; Tratamento 3: 5% de EP e 2% de PCE; B) Tratamento 4: 1% de EP e 4% de PCE; Tratamento 5: 2,5% de	

	EP e 4% de PCE; Tratamento 6: 5% de EP e 4% de PCE; C) Tratamento 7: 1% de EP e 6% de PCE; Tratamento 8: 2,5% de EP e 6% de PCE; Tratamento 9: 5% de EP e 6% de PCE.....	80
Figura 4	Espectros de difração de raios-X de extrato de própolis liofilizado (EPL), das micropartículas vazias (MV), e das micropartículas de extrato de própolis revestidas com proteína concentrada de ervilha (PCE): A) Tratamento 1: 1% de EP e 2% de PCE; B) Tratamento 2: 2,5% de EP e 2% de PCE; Tratamento 2: 2,5% de EP e 2% de PCE; Tratamento 3: 5% de EP e 2% de PCE. B) Tratamento 4: 1% de EP e 2% de PCE; Tratamento 5: 2,5% de EP e 4% de PCE; Tratamento 6: 5% de EP e 4% de PCE. C) Tratamento 7: 1% de EP e 6% de PCE; Tratamento 8: 2,5% de EP e 6% de PCE; Tratamento 9: 5% de EP e 6% de PCE.....	82
Capítulo 3	Produção de micropartículas de extrato de própolis com proteína concentrada de ervilha por spray drying para aplicação alimentícia	
Figura 1	Micrografias de micropartículas de extrato de própolis por <i>spray drying</i> produzidas com: (A) Proteína concentrada de ervilha 2 % (PCE 2 %), (B) Proteína de concentrada de ervilha 4 % (PCE 4 %), e (C) Proteína de concentrada de ervilha 6 % (PCE 6 %) (ampliação 1500 ×).....	105

Lista de Tabelas

Tabela 1	Tipos de própolis produzidas por abelhas (<i>Apis mellifera</i>) e seus respectivos estados no Brasil, origens botânicas e compostos químicos mais abundantes.....	23
Tabela 2	Vantagens e desvantagens da técnica de <i>spray drying</i> para encapsulação.....	29
Capítulo 1	Microencapsulação de própolis em matrizes proteicas por <i>spray drying</i> para aplicação em alimentos	
Tabela 1	Composição dos fluídos gástrico e intestinal utilizados na digestão <i>in vitro</i>	44
Tabela 2	Compostos fenólicos no extrato de própolis, analisados por LC-ESI-qTOF-MS.....	46
Tabela 3	Eficiência de encapsulação e capacidade antioxidante das micropartículas de própolis.....	48
Tabela 4	Rendimento e propriedades físicas das micropartículas de própolis.....	57
Capítulo 2	Produção de micropartículas de própolis revestidas com proteína de ervilha: caracterização e avaliação das atividades antioxidante e antimicrobiana	
Tabela 1	Eficiência de encapsulação (EE), capacidade de redução férrica (FRAP) e rendimento (R) das micropartículas de extrato de própolis (EP) com proteína concentrada de ervilha (PCE), em diferentes concentrações.....	75
Tabela 2	Atividade antimicrobiana, concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) de extrato de própolis ^a contra diferentes bactérias.....	83
Tabela 3	Atividade antimicrobiana, concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) das micropartículas de extrato de própolis contra <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Listeria monocytogenes</i>	85
Capítulo 3	Produção de micropartículas de extrato de própolis com proteína concentrada de ervilha por <i>spray drying</i> para aplicação alimentícia	
Tabela 1	Percentual de ingredientes das formulações dos bolos.....	97

Tabela 2	Compostos fenólicos (mg g ⁻¹) presentes no extrato de própolis (EP) e nas micropartículas de própolis (MP), utilizando diferentes concentrações de proteína concentrada de ervilha (PCE) por LC-ESI-qTOF-MS.....	100
Tabela 3	Eficiência de encapsulação (%) das micropartículas de extrato de própolis com diferentes concentrações de proteína concentrada de ervilha (PCE) como material de parede.....	102
Tabela 4	Análise termogravimétrica dos constituintes das micropartículas (MP) com extrato de própolis (EP), e das MP com diferentes concentrações de proteína concentrada de ervilha (PCE)	106
Tabela 5	Total de compostos fenólicos e atividade antioxidante (DPPH) do extrato de própolis, das micropartículas de própolis e dos bolos.....	107
Tabela 6	Características físicas de bolos adicionados de extrato de própolis e micropartículas de extrato de própolis produzidas com proteína concentrada de ervilha (PCE) em diferentes concentrações (2, 4, e 6%).....	109
Tabela 7	Avaliação sensorial do bolo controle e dos bolos adicionados de extrato de própolis e micropartículas de extrato de própolis.....	110
Apêndice A	Tabela de liberação de compostos fenólicos do extrato de própolis microencapsulado em condições gastrointestinais simuladas após aplicação em matrizes alimentares	
Tabela 1	Digestão <i>in vitro</i> dos compostos fenólicos do extrato de própolis microencapsulado por <i>spray drying</i>	131

Sumário

1. Introdução	20
1.2 Objetivos	21
1.2.1 Objetivo geral	21
1.2.2 Objetivos específicos.....	21
2. Revisão da Literatura	22
2.1. Própolis	22
2.1.2. Propriedades biológicas da própolis.....	24
2.1.3. Compostos fenólicos e voláteis da própolis.....	25
2.2. Microencapsulação de própolis	26
2.2.1. Uso de proteínas como material de parede na microencapsulação	29
2.2.1.1. Proteína de origem animal: ovoalbumina	30
2.2.1.2 Proteínas de origem vegetal: arroz, ervilha e soja	31
2.2.2. Aplicação de microcápsulas em alimentos.....	33
3 Capítulo 1: Microencapsulação de própolis em matrizes proteicas por <i>spray drying</i> para aplicação em alimentos.....	34
3.1. Introdução	34
3.2. Material e métodos	36
3.2.1. Materiais.....	36
3.2.2. Obtenção do extrato de própolis	37
3.2.3. Identificação e quantificação dos compostos fenólicos por LC-ESI-qTOF-MS.....	37
3.2.4. Preparo das proteínas	38
3.2.5. Microencapsulação do extrato de própolis	39
3.2.8. Eficiência de encapsulação	40
3.2.9. Rendimento	40
3.2.10. Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC)	40
3.2.11. Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)	41
3.2.12. Difração de Raios-X	41
3.2.13. Capacidade de eliminação do radical DPPH	41
3.2.14. Determinação das propriedades físicas das micropartículas	41
3.2.14.1 Morfologia das micropartículas.....	41
3.2.14.2. Índice de solubilidade em água e índice de absorção de água	42
3.2.14.3. Higroscopicidade	42
3.2.14.4. Atividade de água.....	42
3.2.15. Aplicação das micropartículas de própolis em produtos alimentícios.....	43
3.2.15.1. Aplicação das micropartículas de própolis em pudim.....	43
3.2.15.2. Aplicação das micropartículas de própolis em queijo Minas Frescal.....	43
3.2.17. Digestão in vitro.....	44
3.2.18. Análise estatística	45
3.3. Resultados e discussão.....	45
3.3.1. Identificação e quantificação dos compostos fenólicos por LC-ESI-qTOF-MS.....	45
3.3.2. Eficiência de encapsulação e capacidade antioxidante das micropartículas de própolis.....	47
3.3.3. Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC)	49
3.3.4. Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)	51
3.3.5. Difração de Raios-X	53
3.3.6. Morfologia das micropartículas.....	54
3.3.8. Digestão in vitro.....	58
3.4. Conclusão	60
Agradecimentos	61

Referências	61
4 Capítulo 2: Produção de micropartículas de própolis revestidas com proteína de ervilha: caracterização e avaliação das atividades antioxidante e antimicrobiana	66
4.1. Introdução	66
4.2. Material e métodos	68
4.2.1. Material.....	68
4.2.2. Obtenção do extrato de própolis	68
4.2.3. Preparo das soluções com proteína concentrada de ervilha (PCE)	69
4.2.4. Produção de micropartículas de própolis (MP) por spray drying	69
4.2.5. Viscosidade	69
4.2.6. Determinação do total de compostos fenólicos (TCF) e Eficiência de encapsulação (EE)	70
4.2.7. Capacidade antioxidante por FRAP	71
4.2.8. Rendimento (R)	71
4.2.9. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	71
4.2.10. Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)	72
4.2.11. Difração de Raios-X	72
4.2.12. Atividade antimicrobiana do extrato de própolis e das micropartículas	72
4.2.12.1. Concentração mínima inibitória (CIM)	72
4.2.12.2. Concentração bactericida mínima (CBM)	73
4.2.13. Análise estatística	73
4.3. Resultados e discussão.....	73
4.3.1. Viscosidade das formulações de proteína concentrada de ervilha com extrato de própolis.....	73
4.3.2. Eficiência de encapsulação	74
4.3.3. Capacidade antioxidante	75
4.3.4. Rendimento	76
4.3.5. Morfologia.....	77
4.3.6. Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier	78
4.3.7. Difração de Raios-X	81
4.3.8. Atividade antimicrobiana	83
4.4. Conclusão	86
Agradecimentos	86
Referências:	86
5 Capítulo 3: Produção de micropartículas de extrato de própolis com proteína concentrada de ervilha por <i>spray drying</i> para aplicação alimentícia	92
5.1. Introdução	92
5.2. Material e métodos	93
5.2.1. Materiais.....	93
5.2.2. Obtenção do extrato de própolis	94
5.2.3. Produção de micropartículas de própolis por spray drying	94
5.2.4. Identificação dos compostos fenólicos por LC-ESI-qTOF-MS.....	95
5.2.5. Análise quantitativa de compostos fenólicos e eficiência de encapsulação	95
5.2.6. Análise do teor de umidade e da atividade de água.....	96
5.2.7. Microscopia Eletrônica de Varredura	96
5.2.8. Análise termogravimétrica	96
5.2.9. Fortificação dos bolos com micropartículas de própolis	97
5.2.9.1. Análise do crescimento e coloração dos bolos.....	98
5.2.9.2. Determinação do total de compostos fenólicos do extrato de própolis, das micropartículas e dos bolos.....	98

5.2.9.3. Atividade antioxidante do extrato, das micropartículas e dos bolos	99
5.2.9.4. Análise sensorial dos bolos	99
5.2.10. Análise estatística	100
5.3. Resultados e discussão.....	100
5.3.1. Identificação dos compostos fenólicos por LC-ESI-qTOF-MS.....	100
5.3.2. Eficiência de encapsulação	102
5.3.3. Umidade e atividade de água das micropartículas	104
5.3.4. Microscopia Eletrônica de Varredura	104
5.3.5. Análise termogravimétrica	105
5.3.6. Total de compostos fenólicos e atividade antioxidante das MP e dos bolos ..	106
5.3.7. Características físicas dos bolos	108
5.3.7.1. Índice de crescimento dos bolos	108
5.3.7.2. Coloração dos bolos.....	109
5.3.8. Análise sensorial dos bolos	110
5.4. Conclusão	112
Agradecimentos	112
Referências	112
6. Considerações finais	118
Referências	119
Apêndice	130
Apêndice A - Tabela de liberação de compostos fenólicos do extrato de própolis microencapsulado em condições gastrointestinais simuladas após aplicação em matrizes alimentares	131
Apêndice B – Teste de comparação múltipla utilizado para avaliação sensorial de bolos com adição de extrato de própolis e de micropartículas com extrato de própolis	132
Apêndice C: Termo de consentimento livre e esclarecido utilizado na análise sensorial dos bolos.....	133

1. Introdução

A própolis é uma substância resinosa e balsâmica, coletada pelas abelhas a partir de brotos, flores e exsudatos de plantas. É parcialmente digerida por enzimas presentes nas secreções salivares das abelhas, que ainda acrescentam cera e pólen (SHANG-JUNG et al. 2014). Apresenta em sua composição química 50% de resina, 30% de cera, 10% de óleo essencial, 5% de pólen e 5% de outros compostos orgânicos (PELLATI et al. 2013).

Os principais compostos bioativos presentes na própolis são os compostos fenólicos (flavonoides e ácidos fenólicos e os seus ésteres), terpenoides e esteroides (PELLATI et al., 2013). Em função dos seus constituintes, a própolis apresenta diversas ações farmacológicas, destacando-se as propriedades antioxidante e antimicrobiana. Porém, seu uso na indústria de alimentos é restrito, sendo que a maior parte do seu consumo ocorre na forma de extrato etanólico. O baixo consumo está relacionado ao intenso sabor e odor, atribuído a grande quantidade de resinas, de compostos voláteis, ao alto teor de cera e a baixa solubilidade em água (NORI et al., 2011; da SILVA et al., 2013). Além disso, apresenta compostos bioativos, como os compostos fenólicos, os quais são susceptíveis à degradação pela exposição ao calor, à luz ou ao oxigênio, fatores comuns durante o processamento e o armazenamento de um produto (GONÇALVES et al., 2017).

Uma técnica que pode permitir maior exploração das propriedades antioxidante e antimicrobiana da própolis como ingrediente funcional e/ou fortificação de alimentos é a microencapsulação. Seu objetivo é formar uma barreira física que possa proteger o composto encapsulado das condições do meio (interação ou reação) e, quando bem planejada, pode controlar sua liberação a taxas e locais específicos (BRUSCHI et al., 2003; DURÁN et al., 2007; NORI et al., 2011; da SILVA et al., 2013). Essa técnica pode ser utilizada para minimizar as características indesejáveis da própolis e facilitar sua aplicação como ingrediente em alimentos.

O uso de proteínas como material de parede na encapsulação tem se intensificado, pois estes polímeros naturais são biocompatíveis, biodegradáveis, anfífilos, além de apresentarem importantes propriedades funcionais, como solubilidade em água, emulsificante e a capacidade de formação de espuma (SHAPIRA, 2012; BOCHAR, 2012; NESTERENKO et al., 2013).

Apesar de todos os efeitos benéficos que o consumo da própolis pode trazer a população e do grande interesse para aplicação como ingrediente em alimentos, seu consumo ainda é restrito. Assim, objetivou-se com o estudo microencapsular o extrato de própolis por *spray drying*, utilizando proteínas de origem animal e vegetal como material de parede, e após adicionar as micropartículas em alimentos avaliando seu comportamento em relação às propriedades físicas, sensoriais, de liberação *in vitro*, antioxidante e antimicrobiana. Com isto, desejou-se mascarar o sabor e odor da própolis, e desta forma melhorar suas características sensoriais, para aplicar as micropartículas em sistemas alimentícios.

1.2 Objetivos

1.2.1 Objetivo geral

Preservar a atividade antioxidante e antimicrobiana do extrato de própolis, através da microencapsulação utilizando diferentes matrizes proteicas como material de parede, e testar a liberação dos seus compostos fenólicos em fluídos gastrointestinais simulados e em sistemas alimentícios.

1.2.2 Objetivos específicos

Caracterizar o extrato de própolis quanto ao perfil de compostos fenólicos.

Microencapsular o extrato de própolis, pelo método de *spray drying*, utilizando como material de parede proteína concentrada de arroz, proteína concentrada de ervilha, proteína isolada de soja e ovoalbumina.

Testar a encapsulação o extrato de própolis na melhor das proteínas avaliadas, em diferentes concentrações, tanto do material de parede, como do extrato de própolis, e associar seu uso ao manitol.

Determinar a atividade antioxidante do extrato de própolis, das micropartículas e dos alimentos em que foram aplicadas.

Determinar a atividade antimicrobiana do extrato de própolis e das micropartículas contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.

Testar a liberação do extrato de própolis em fluidos gastrointestinais simulados e em sistemas alimentícios.

2. Revisão da Literatura

2.1. Própolis

A própolis é uma substância resinosa, gomosa e balsâmica produzida pelas abelhas através da coleta de resinas, flores e brotos de plantas. As abelhas misturam a resina coletada com suas secreções salivares, digerindo-a parcialmente e adicionando cera de abelha, formando assim a própolis (SILVA et al. 2012; NETO et al. 2017).

As abelhas elaboram a própolis com o objetivo de evitar a entrada de insetos na colmeia, protegendo-a pela selagem dos orifícios; prevenir a contaminação da colmeia por bactérias, vírus ou parasitas devido ao seu efeito antisséptico; cobrir os insetos mortos para evitar sua decomposição; além de manter a temperatura no interior da colmeia (SALATINO et al. 2005; NETO et al. 2017).

A própolis é produzida através do uso de diversas plantas e por isso sua composição química é complexa, estando presente além do material resinoso, compostos fenólicos (flavonoides e ácidos fenólicos), compostos voláteis, e em menor proporção terpenos, açúcares, proteínas e aminoácidos, vitaminas e minerais (CAO et al., 2017).

A produção da própolis é realizada principalmente pelas abelhas africanizadas (*Apis mellífera*), embora existam própolis brasileiras produzidas por outras espécies de abelhas, como as abelhas sem ferrão (Meliponini) (FRANCHIN et al., 2017).

Ao contrário de outros países, que têm pouca variabilidade na composição química e na origem botânica da própolis, o Brasil tem até o momento 13 grupos diferentes de própolis classificados com base em características físico-químicas e composição de fitoquímicos, devido a biodiversidade do Brasil (Tabela 1) (PARK et al., 2000; FRANCHIN et al., 2017). A característica de cada tipo de própolis é dependente de alguns fatores como, por exemplo, fonte de plantas e condições edafoclimáticas (NETO et al. 2017).

Park et al. (2002) foram os primeiros a descrever os perfis químicos da própolis brasileira e comparar com suas respectivas fontes de plantas. Os autores identificaram a origem botânica de três tipos de própolis: tipo 3 (própolis de álamo), que é quimicamente semelhante a Poplar (*Populus L.*, família *Salicaceae*); tipo 6 (própolis marrom), que é quimicamente similar à árvore de *Hyptis divaricate*; e tipo

12 (própolis verde), que é semelhante à árvore *Baccharis dracunculifolia* (FRANCHIN et al. 2017). Em 2007 foi identificada a própolis tipo 13 (própolis vermelha) produzida em Alagoas. A composição química das amostras de própolis vermelha foi semelhante ao das árvores *Dalbergia ecastophyllum*. No entanto, alguns autores identificaram compostos de benzofenona prenilados em amostras de própolis vermelha do Brasil. Esses compostos são comumente encontrados em espécies de *Clusia*, o que indica que outras plantas podem também ser fonte da própolis vermelha (FRANCHIN et al. 2017). Porém, segundo o trabalho de Andrade et al. (2017), o perfil bioativo dos compostos fenólicos é equivalente nos 3 tipos de própolis brasileira (marrom, verde e vermelho), mas diferem quantitativamente.

Tabela 1. Tipos de própolis produzidas por abelhas (*Apis mellifera*) e seus respectivos estados brasileiros, origens botânicas e compostos químicos mais abundantes

Tipo de própolis	Estado do Brasil	Cor	Compostos químicos em abundância
1	RS	Amarelo	Triterpenoides
2	RS	Castanho claro	Flavonoides e derivados de ácido cinâmico
3	PR	Castanho escuro	Flavonoides (crisina, pinocembrina, pinobanksin, apigenina e galangina)
4	PR	Castanho claro	Ácido cinâmico e derivados
5	PR	Marrom esverdeado	Flavonoides e derivados de ácido cinâmico
6	BA	Marrom avermelhado	Benzofenona prenilada
7	BA	Marrom esverdeado	Flavonoides e derivados de ácido benzoico
8	PE	Castanho escuro	Flavonoides e derivados de ácido benzoico
9	PE	Amarelo	Derivados de ácido cinâmico
10	CE	Amarelo escuro	Sesquiterpenos
11	PI	Amarelo	Diterpênios
12	SP	Verde ou marrom esverdeado	Ácidos cinâmicos prenilados e flavonoides
13	AL	Vermelha	Principalmente isoflavonoides (formononetina, vestitol, neovestitol e daidzeína) e chalconas

Fonte: adaptado de Franchin et al. (2017).

Nos últimos anos, o mercado da própolis está aumentando, e segundo os últimos dados publicados no Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) (2013), o Brasil é o terceiro maior produtor mundial de própolis, com uma produção estimada em 100 toneladas anuais, sendo produzida por mais de 10 mil produtores, e tendo grande parte destinada à exportação. De acordo com estudos recentes, espera-se que, até 2021, o mercado mundial de própolis aumente 3,5%, com estimativa de que a produção de 2300 toneladas no ano de 2015 passe para 2900 toneladas em 2021 (FUTURE, 2016; De FRANCISCO et al. 2018).

2.1.2. Propriedades biológicas da própolis

A própolis tem sido utilizada há muitos anos no tratamento de diversas doenças, como alergias, diabetes, infecções, além de exibir proteções contra doenças de pele como dermatites e queimaduras, e de doenças gástricas e hepáticas (SFORCIN, 2007; TRUSHEVA et al. 2006; BUSCH et al. 2017; CAO et al. 2017). Vários estudos relatam que a própolis brasileira demonstra atividades antioxidante, antimicrobiana, anti-inflamatória, antifúngica, antiviral, citotóxica e antitumoral (BRUSCHI et al. 2007; TIVERON et al. 2016; FRANCISCO et al. 2018).

Dentre as atividades biológicas atribuídas à própolis, sua atividade antioxidante é amplamente estudada. A literatura existente aponta uma correlação positiva entre a capacidade antioxidante e o teor de compostos fenólicos na própolis (CABRAL et al. 2009), principalmente com o teor de flavonoides (ALENCAR et al. 2007), e de alguns compostos específicos, como do ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico (Artepillin C) (MATSUDA; ALMEIDA-MURADIAN, 2008) e do ácido cafeico (GREGORIS; STEVANATO, 2010). Segundo Castro et al. (2014), amostras de própolis do Chile que continham os compostos crisina e pinocembrina, porém não havia quercetina e CAPE, apresentaram baixa atividade antioxidante.

A capacidade antioxidante vem sendo relacionada ao número e à disposição dos grupos hidroxila nos compostos fenólicos (GREGORIS; STEVANATO, 2010). Firuzi et al. (2005) estudaram os flavonoides e a atividade antioxidante pelo método de FRAP, e estabeleceram que o anel B, o grupo 3-hidroxi e a insaturação do anel (posições 2 e 3) são aspectos estruturais necessários para uma boa atividade antioxidante.

Em relação as propriedades antimicrobianas, diversos estudos relataram a atividade do extrato de própolis e de seus constituintes frente a bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (das NEVES et al. 2016; ANDRADE et al. 2017; ALMEIDA et al. 2017). O efeito antimicrobiano da própolis está correlacionado com sua composição complexa, compreendendo a presença dos flavonoides (PATEL et al. 2015), além de alguns compostos apolares, como os ácidos graxos e benzofenona prenilada (CASTRO et al. 2014).

Os flavonoides foram apontados como responsáveis por afetar a membrana citoplasmática e inibir a mobilidade bacteriana. Embora o mecanismo de ação para seu efeito antimicrobiano ainda não seja claramente compreendido, alguns estudos sugerem que os constituintes da própolis interferem na divisão celular bacteriana, e participam na desorganização do citoplasma, na inibição da síntese proteica e na lise celular.

2.1.3. Compostos fenólicos e voláteis da própolis

A própolis brasileira é muito prestigiada e estudada devido ao alto teor de compostos fenólicos. Dentre os compostos fenólicos presentes estão os flavonoides artepelin C, luteolina, apigenina, kaempferide, kaempferol, pinocembrina e os ácidos fenólicos, como o p-cumárico, clorogênico, ferúlico e ácido cafeico. Os compostos bioativos como a apigenina, o artepilin C, a galangina e pinocembrina presentes na própolis brasileira foram apontados como os responsáveis pelo mecanismo anti-inflamatório (FRANCHIN et al. 2017).

Tiveron et al. (2016) ao analisarem 78 amostras de própolis orgânicas da região sul do Brasil, utilizando a cromatografia em camada líquida de alta eficiência (CLAE), encontraram poucos dos compostos comumente identificados em própolis do Brasil ou de regiões de clima temperado, podendo estas serem tratadas como outro tipo de própolis brasileira. Dentre os compostos fenólicos presentes estavam três ácidos fenólicos (ácido gálico, ácido cafeico e ácido p-cumárico), um derivado prenilado do ácido cinâmico (artepilin C) e um flavonoide (pinocembrina). As variações podem ser decorrentes das diferenças dos locais de produção da própolis orgânica, as quais foram produzidas em áreas nativas e de reflorestamento, que abrigam uma grande diversidade de plantas produtoras de resinas.

Em amostras de própolis de outros países há relatos da presença de alguns compostos não encontrados na própolis brasileira, apesar de algumas composições

serem similares e variarem apenas na concentração. Kasote et al. (2017) ao analisarem amostras de própolis provindas da Índia, identificaram os seguintes compostos: ácido gálico, naringina, ácido cafeico, ácido p-cumárico, ácido ferúlico, quercetina, ácido cinâmico, kaempferol, chrisina, éster fenético do ácido cafeico (CAPE) e galanginina.

Além destes, também são encontrados compostos voláteis, os quais são os responsáveis pelo sabor e odor característico da própolis. A presença desses compostos pode variar de acordo com a região da coleta; no entanto, dentre as classes de compostos voláteis identificadas em amostras de própolis, as mais abundantes são ácidos (ácido benzóico e seus ésteres), álcoois, ésteres, aldeídos, terpenos e hidrocarbonetos (olefinas e aromáticos) (PELLATI et al. 2013).

Porém, a aplicação de própolis em alimentos é ainda limitada, isto por ela ser extraída em meio alcoólico e, portanto insolúvel em água, além de apresentar sabor e aroma acentuados (NORI et al. 2011; da SILVA et al. 2013).

2.2. Microencapsulação de própolis

A técnica de atomização também conhecida por *spray drying* surgiu em 1930, sendo utilizada para encapsular flavours (SHAHIDI et al. 1993). Além do mais, é o método mais utilizado para a encapsulação de substâncias bioativas (CAI; CORKE, 2000), devido às baixas despesas operacionais, sendo 4-5 vezes mais barata do que a liofilização. Isso se deve ao menor consumo de energia e ao curto tempo de secagem (5-100 s) (Figura 1).

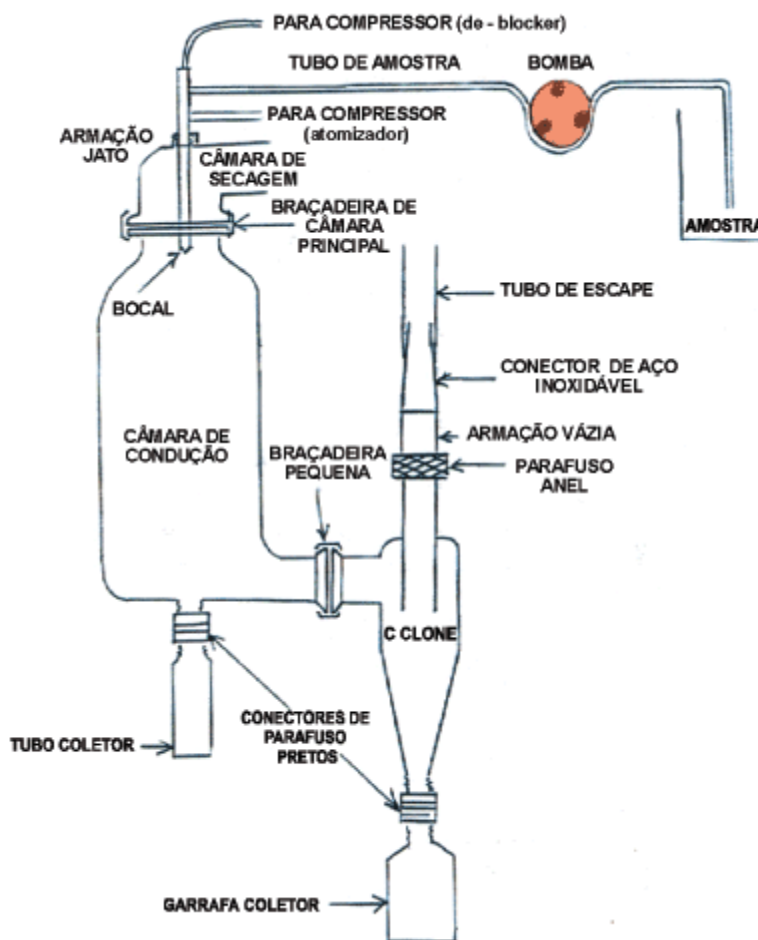


Figura 1. Esquema do funcionamento de um *spray dryer*

A microencapsulação é uma tecnologia em que pequenas partículas sólidas, líquidas ou gasosas, conhecidas como material de recheio ou ativo são revestidas por um material de parede, formando partículas denominadas microcápsulas, micropartículas, ou microesferas, apresentando diferenças na morfologia e estrutura interna. A microcápsula é idealmente esférica com estrutura fortemente influenciada pelo material original e pelos métodos de preparação e com tamanho que pode oscilar desde frações de micron a alguns milímetros (SUAVE et al., 2006).

A encapsulação é conhecida por propiciar proteção dos compostos bioativos instáveis da degradação pela luz, oxigênio, pH, umidade ou da interação com outros componentes da matriz alimentar, e por transformar extratos líquidos em formas sólidas (pós), facilitando assim sua aplicação e seu armazenamento. Outro aspecto importante da microencapsulação é permitir a liberação gradual do composto bioativo no local onde será absorvido (SAUVANT et al. 2012; YUN; CHUAN-HE, 2016). É importante ressaltar que a técnica é normalmente aplicada a produtos que

apresentam baixa biodisponibilidade como, por exemplo, substâncias hidrofóbicas e material resinoso como a própolis (BRASILEIRO, 2011). A microencapsulação também pode aumentar a solubilidade do composto de interesse, além disto, pode minimizar os efeitos indesejáveis do sabor, odor e da coloração (TRIFKOVIĆ et al. 2014; GÓMEZ-ESTACA; GAVARA; HERNÁNDEZ-MUÑOZ, 2015; KLEIN et al. 2015).

Na área farmacêutica os trabalhos desenvolvidos tiveram como propósito avaliar o efeito da própolis microencapsulada no tratamento contra diabetes tipo II, em ratos (LI et al. 2012); aplicação tópica nasal da própolis nanoencapsulada (RASSU et al. 2015); desenvolver uma base com niossomas e extrato de própolis para melhorar sua eficácia terapêutica através de aplicação tópica, aumentando sua retenção na pele e mantendo a ação antimicrobiana frente a *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans* (PATEL et al. 2015); e de produzir nanopartículas lipídicas de subprodutos de própolis para cicatrização de feridas tanto *in vitro* quanto e *in vivo* (ROSSETO et al. 2017).

Diferentes substâncias têm sido avaliadas como material de parede na encapsulação da própolis, por distintas técnicas como: utilização de gelatina e manitol e encapsulação por *spray drying* para manter a propriedade antimicrobiana frente a *S. aureus* (BRUSCHI et al. 2003); de poli (ϵ -caprolactona) por emulsificação/evaporação de solventes para promover a liberação controlada e manter a atividade antimicrobiana frente a bactéria *Streptococcus mutans* (DURÁN et al. 2007); de proteína isolada de soja e pectina por coacervação complexa para manter a atividade antioxidante e a estabilidade dos compostos fenólicos e dos flavonoides em diferentes temperaturas pelo período de seis meses (NORI et al. 2011); e de goma arábica e amido OSA por *spray drying* para produzir microcápsulas estáveis (da SILVA et al. 2013).

Por esses fatores o processo de secagem por atomização é amplamente empregado nas indústrias alimentares (SHISHIR; CHEN, 2017). De um modo geral, o processo de *spray drying* consiste numa operação unitária na qual um produto líquido é atomizado numa corrente de gás quente, obtendo-se as micropartículas por secagem das gotas. O líquido utilizado pode ser uma solução, emulsão ou suspensão. Essa técnica permite diminuir o teor e a atividade de água, assegurando assim a estabilidade microbiológica do produto e redução dos custos de armazenamento e de transporte (GHARSALLAOUI et al. 2007).

Entretanto, por mais que a atomização seja um método de baixo custo e adaptado às condições industriais, pela necessidade da utilização de altas temperaturas pode ocasionar o comprometimento da integridade de compostos bioativos (GONNET; LETHUAUT; BOURY, 2010) (Tabela 2).

Tabela 2. Vantagens e desvantagens da técnica de *spray drying* para encapsulação

Vantagens	Desvantagens
Processo rápido e contínuo	Microcápsulas podem não ser uniformes
Produto com as mesmas características mesmo em grande produção	Limitação do material de revestimento (baixa viscosidade, mas com alta concentração de sólidos)
Controle automático	Não é o melhor método para material sensível ao calor *
Baixo custo	
Elevada qualidade e estabilidade	
Produção de microcápsulas de pequeno tamanho	

*Para alguns autores esse método pode ser usado para materiais sensíveis ao calor, já que o tempo de exposição a altas temperaturas é curto.

Fonte: adaptado de Chen et al. (2008).

2.2.1. Uso de proteínas como material de parede na microencapsulação

As proteínas são macromoléculas constituídas por diversos aminoácidos e são de fundamental importância para a nutrição e formação de tecidos. As proteínas são biopolímeros formados por até 20 diferentes tipos de aminoácidos, ligados covalentemente em uma cadeia peptídica. Os aminoácidos que formam a estrutura proteica são caracterizados pela existência de um átomo de carbono central ao qual estão ligados um átomo de hidrogênio, um grupo amina (NH_2), um grupo carboxila (COOH) e um radical. A formação da ligação peptídica ocorre entre o grupo carboxila de um aminoácido e o grupamento amino de outro, ocorrendo a liberação de uma molécula de água (Fig. 2). A diferenciação entre os aminoácidos ocorre pelas suas cadeias laterais (radical), ligadas ao carbono central, as quais variam em estrutura, tamanho, carga elétrica e solubilidade (DEVI et al. 2016).

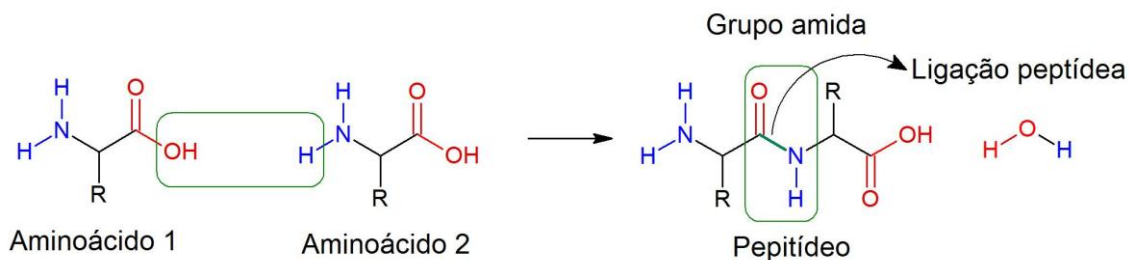


Figura 2. Ligação peptídica entre aminoácidos

Esses polímeros naturais apresentam várias vantagens para sua utilização na microencapsulação. Na indústria farmacêutica, por exemplo, as proteínas são utilizadas para melhorar a liberação dos fármacos em sítios alvos. Sua principal vantagem é por serem polímeros naturais considerados seguros, principalmente quanto à sua toxicologia. Outras vantagens também justificam o uso de proteínas em sistemas de distribuição de bioativos, como o fato de agregar o seu valor nutricional e suas propriedades funcionais, além de conferir propriedades físico-químicas desejáveis para uma boa biodisponibilidade de compostos ativos (SHAPIRA, 2012; BOCHAR, 2012).

No entanto, para a microencapsulação de compostos fenólicos utilizando como material de parede proteínas, a capacidade de ligação de ambos depende da estrutura química tanto dos compostos fenólicos como da proteína. Isto porque nem todos compostos fenólicos tem a capacidade de interagir e formar ligações com a matriz proteica para formar as micropartículas, sendo que moléculas com alto peso molecular, geralmente, tem maior capacidade de interação com as proteínas (JIA et al. 2016).

2.2.1.1. Proteína de origem animal: ovoalbumina

A ovoalbumina é a principal proteína presente na clara de ovo (54%), caracteriza-se como uma glicoproteína de caráter ácido (ponto isoelétrico = 4,7). Cerca de um quarto dos aminoácidos desta proteína são ácidos, enquanto que 15% dos aminoácidos possuem pH básico. Essa proteína apresenta atividades antibacterianas que desempenham a função de proteção durante o desenvolvimento embrionária da ave (WOLF et al. 2011). Trabalhos recentes têm demonstrado que o uso dessa proteína é eficaz na encapsulação de compostos, como do ácido fólico, de ácidos graxos poli-insaturados, do retinol (ARZENI; PÉREZ; PILOSOFF, 2015), da

curcumina (VISENTINI et al. 2017) e do ácido linoleico (SPONTON et al. 2017). Sua eficácia tem sido atribuída à capacidade de ligação aos compostos, atuando por meio de um processo de adsorção que ocorre entre as regiões hidrofóbicas da proteína (SPONTON et al. 2016), o que também foi observado em outras proteínas globulares (SPONTON et al. 2017).

2.2.1.2 Proteínas de origem vegetal: arroz, ervilha e soja

Apesar da grande procura por proteínas animais, a utilização de proteínas vegetais como material de parede na encapsulação merece destaque por causarem menos alergias quando comparadas as proteínas animais (NESTERENKO et al. 2013; JIA; DUMONT; ORSAT, 2016), além do fato de poderem ser consumidas por vegetarianos.

Dentre as proteínas de origem vegetal, além da proteína isolada de soja que já vem sendo amplamente estudada, as proteínas isoladas de ervilha e proteínas de cereais, entre elas a de arroz, apresentam grande potencial para aplicação na encapsulação.

A soja possui entre 35-40% de proteínas, sendo que a proteína isolada de soja (PIS) apresenta grande fração do aminoácido glicinina, e dentre suas propriedades podem ser citadas: solubilidade em água, capacidade de formar emulsão e de gelificação, características que a tornam adequadas para encapsulação. Essas características são fortemente dependentes do pH, do tratamento térmico e da presença e concentração de sais ou outros ingredientes (óleo, carboidratos, tensoativos). A PIS já tem sido estudada isolada ou de forma combinada com polissacarídeos na microencapsulação de caseína hidrolisada, extrato de própolis, α -tocoferol, ácido ascórbico, entre outros (MENDANHA et al. 2009; NORI et al. 2011; NESTERENKO et al. 2014).

O farelo de arroz possui de 12 a 20% de proteínas, enquanto o teor de proteínas no grão de arroz varia de 6 a 15%. Pelo fato do farelo de arroz ser removido do grão durante o processo de moagem, para produzir o arroz branco, este subproduto pode se tornar uma fonte potencial de proteínas de qualidade e baixo custo para ser utilizada como material de parede na encapsulação. Seu uso é de relevância, pois sua composição possui aminoácidos essenciais, além dessas proteínas serem hipoalergênicas e hipocolesterolêmicas. Dentre as propriedades físico-químicas exibidas pela proteína de arroz, tem-se a formação de espuma e a

capacidade emulsionante (NESTERENKO et al. 2013). Os principais aminoácidos presentes na proteína do arroz são semelhantes aos das proteínas de soja, e a temperatura de desnaturação das proteínas isoladas do arroz é cerca de 83,4°C (NESTERENKO et al. 2013). Alguns trabalhos utilizaram a albumina extraída do farelo de arroz para encapsular a curcumina (LIU et al. 2017); o farelo de arroz e pectina para encapsulação de *Lactobacillus plantarum* (CHOTIKO; SATHIVEL, 2016), mas não há relatos com a proteína concentrada de arroz como material de parede na microencapsulação.

O uso da proteína de ervilha (*Pisum sativum* L.) na encapsulação tem sido considerado como uma alternativa à utilização de proteína isolada de soja. A proteína isolada de ervilha possui uma grande fração de globulinas e frações minoritárias de albuminas e glutelinas. As proteínas de ervilha apresentam em sua composição um perfil de aminoácidos bem equilibrado (SHAO; TANG, 2016), estando presentes aminoácidos essenciais como leucina, isoleucina, fenilalanina e valina (LETERME; MONMART; BAUDART, 1990). As proteínas extraídas de grãos de ervilha possuem propriedades gelificantes e emulsionantes. Sua utilização já foi citada para microencapsular diferentes compostos, como óleo de linhaça, ácido linoleico conjugado (CLA), ácido ascórbico, α -tocoferol e a bactéria *Bifidobacterium adolescentis*, e são empregados isoladamente ou associados com polissacarídeos (PIERUCCI et al. 2006; PIERUCCI et al. 2007; BAJAJ; TANG; SABALNI, 2015; COSTA et al. 2015; VARANKOVICH et al. 2015).

Entretanto, a utilização somente de proteínas no processo de encapsulação por atomização pode provocar a agregação das partículas e baixo rendimento (BRUSCHI et al. 2003; NESTERENKO et al. 2013).

Para superar esse entrave e produzir pós estáveis, evitando a agregação das partículas, o uso de excipientes, como o manitol, tem se mostrado necessário (JAFARINEJAD et al., 2012). Além disso, o uso de proteínas associadas a polissacarídeos na encapsulação tem com o objetivo a obtenção de características favoráveis para utilização como material de parede na microencapsulação (FABIAN; HUYNH; JU, 2010; NESTERENKO et al., 2013).

O manitol é um poliálcool de baixo peso molecular e apresenta boa propensão para ser utilizado na atomização como auxiliar de secagem. Alguns trabalhos relatam resultados satisfatórios quando o manitol foi utilizado juntamente com o material de parede na atomização, com melhorias na morfologia e porosidade

das partículas, na distribuição de tamanho e agregação, além de melhorar o rendimento da atomização (BRUSCHI et al. 2003; TEWA-TAGNE; BRIANÇON; FESSI, 2007; JAFARINEJAD et al. 2012).

2.2.2. Aplicação de microcápsulas em alimentos

Há grande demanda de consumo por alimentos com propriedades antioxidantes, ácidos graxos poli-insaturados, probióticos, vitaminas e minerais. Porém, muitos desses componentes são instáveis em condições normais ou exibem um sabor residual, o que limita sua aplicação. Assim, a técnica de encapsulação é uma alternativa para a aplicação desses compostos em matrizes alimentares diversas. Porém, o principal desafio no uso de alimentos fortificados é obter produtos estáveis e manter suas propriedades funcionais durante o processamento e armazenamento, até o seu consumo (DIAS et al., 2017).

Muitos trabalhos têm utilizado a encapsulação com diversas finalidades, como por exemplo, em microcápsulas de óleo de linhaça para manter estabilidade quando adicionadas em pão (GALLARDO et al., 2013); microcápsulas de óleo de tomilho como ingrediente antimicrobiano em bolo (GONÇALVES et al., 2017); e a adição de microcápsulas de resveratrol em bala de goma e barra de cereal para atenuar o seu amargor e instabilidade a luz (KOGA; SOO-YEUN; YOUNGSOO, 2016). Além do uso da encapsulação para proteção da estabilidade térmica, manutenção das propriedades e mascaramento do sabor e odor, outros trabalhos realizaram a coencapsulação de xilitol e mentol para aplicação em goma de mascar com o objetivo de intensificar a sensação refrescante de hortelã e controlar a liberação desses compostos (SANTOS et al., 2014); e a microencapsulação de carotenoides do óleo de palma para promover a estabilidade e liberação controlada em condições específicas quando aplicadas em iogurte e pão (RUTZ et al., 2016).

Alguns autores realizaram a microencapsulação de própolis e após, adicionaram as micropartículas em produtos cárneos. Bernardi et al. (2013) aplicaram microcápsulas de extrato de própolis em salame tipo italiano para atenuar o aroma da própolis. Spinelli et al. (2015) e dos Reis et al. (2017) adicionaram microcápsulas de extrato de própolis em hambúrguer de peixe para manter a atividade antioxidante e mascarar suas propriedades sensoriais. Porém, ainda são poucos os trabalhos que realizam a etapa de aplicação das micropartículas em sistemas alimentícios, e tampouco avaliam suas propriedades sensoriais.

3 Capítulo 1: Microencapsulação de própolis em matrizes proteicas por *spray drying* para aplicação em alimentos

Resumo: A própolis proporciona vários benefícios para a saúde, devido à presença de compostos bioativos, principalmente compostos fenólicos; no entanto, a sua aplicação em alimentos é limitada devido ao forte odor e baixa solubilidade em água. Os componentes bioativos são geralmente suscetíveis a degradação por exposição à luz, calor ou oxigênio, ou por interação com outros compostos, o que pode limitar sua ação biológica. Este estudo objetivou caracterizar e microencapsular o extrato de própolis utilizando como material de parede as proteínas de arroz, ervilha, soja e ovoalbumina por *spray drying*, com posterior aplicação em alimentos para avaliar a digestão *in vitro*. O extrato de própolis apresentou alta concentração de apigenina (9,20 mg g⁻¹), seguido da luteolina (4,00 mg g⁻¹). A eficiência da encapsulação foi superior a 70%, sendo mantida a atividade antioxidante da própolis (88% de inibição da DPPH para o extrato de própolis e > 73% para as micropartículas). As técnicas de Calorimetria Diferencial de varredura, infravermelho e difração de raios-X confirmaram a encapsulação. As micropartículas variaram em formas, tamanhos e características físicas, podendo serem armazenadas em um ambiente de baixa umidade. As micropartículas de proteína de ervilha podem ser utilizada para a produção de queijo Minas Frescal, uma vez que apresentaram maior liberação dos compostos fenólicos no intestino durante digestão gastrointestinal, enquanto que as outras micropartículas apresentam melhores resultados para utilização em pudim.

Palavras-chave: extrato de própolis; compostos fenólicos; proteína concentrada de arroz; proteína concentrado de ervilha; digestão gastrointestinal simulada; queijo; pudim.

3.1. Introdução

A própolis é uma substância resinosa e balsâmica, coletada pelas abelhas a partir de brotos, flores e exsudatos de plantas. Sua composição é majoritariamente constituída de resina (aproximadamente 60%), e na fração minoritária encontram-se

ceras, óleos essenciais, vitaminas e microelementos como os compostos fenólicos, terpenoides e compostos voláteis (Dos REIS et al., 2017). Dentre os microelementos, principalmente aos compostos fenólicos, atribui-se às ações farmacológicas da própolis, destacando-se as propriedades: antioxidante, anti-inflamatória, antitumoral e antimicrobiana (SHANG-JUNG et al., 2014; GRAIKOU et al., 2016). O Brasil possui condições climáticas, geográficas e vegetação com características favoráveis ao sistema de produção de própolis, condições que o tornaram o terceiro maior produtor mundial de própolis. A produção de própolis no Brasil é estimada em 100 toneladas anuais, sendo produzida por mais de 10 mil produtores, e tendo grande parte destinada à exportação (IBGE, 2013).

Apesar dos inúmeros benefícios que o consumo da própolis proporciona, dificilmente são encontrados alimentos com sua adição, sendo sua aplicação mais explorada na área farmacológica. A limitação da adição da própolis em alimentos se deve ao seu sabor e aroma acentuados, o que é atribuído aos compostos voláteis, e também a sua insolubilidade em água (NORI et al., 2011; da SILVA et al., 2013).

A técnica de encapsulação tem sido utilizada para mascarar sabor e odor da própolis (SPINELLI et al., 2015; Dos REIS et al., 2017), melhorar sua solubilidade (da SILVA et al., 2013; SHANG-JUNG et al., 2014; ELBAZ et al., 2016), preservar as propriedades antimicrobiana (BRUSCHI et al., 2003; NORI et al., 2011; da SILVA et al., 2013; MASCHERONI et al., 2014), antioxidante (NORI et al., 2011; da SILVA et al., 2013; SPINELLI et al., 2015) e anticancerígena (ELBAZ et al., 2016), além de promover a proteção dos compostos bioativos (NORI et al., 2011; BUSCH et al., 2017) e aumentar sua absorção através da liberação controlada (ELBAZ et al., 2016). Devido à possibilidade de permitir a liberação controlada do composto ativo sob condições específicas (local e momento ideal), a encapsulação pode melhorar a biodisponibilidade destes compostos no organismo humano (RAY; RAYCHAUDHURI; CHAKRABORTY, 2016).

O uso de proteínas como material de parede na microencapsulação de própolis tem sido relatado quando associadas com carboidratos, mas até o momento não foram encontrados trabalhos que utilizem somente proteínas. A utilização das proteínas como material de parede na encapsulação apresenta vantagens por serem consideradas seguras para o consumo humano (GRAS) (JIA; DUMONT; ORSAT, 2016), possuírem um alto valor nutritivo e serem digeridas pelo trato gastrointestinal dos humanos (JOYE; MCCLEMENTS, 2014). Além disso, a utilização de proteínas

vegetais como material de parede na encapsulação apresenta vantagens por causarem menos alergias, quando comparadas as proteínas animais (NESTERENKO et al., 2013). As proteínas de origem vegetal são interessantes para serem utilizadas na microencapsulação como material de parede para uma variedade de compostos ativos (NESTERENKO et al., 2013). Seu uso é uma alternativa abundante às fontes de proteínas animais e aos polímeros derivados do petróleo, obtidas de matéria-prima renovável e biodegradável com propriedades funcionais e físico-químicas interessantes.

As proteínas extraídas de ervilha e soja já foram estudadas como materiais de parede para micropartículas de extrato de própolis. Além dessas, outra proteína vegetal, como a do arroz, possui propriedades funcionais interessantes, e com potencial para microencapsulação (NESTERENKO et al., 2013).

Apesar de vários estudos relatarem o desenvolvimento e caracterização das micropartículas, apenas parte deles aborda a aplicação das micropartículas em sistemas alimentícios (ÇAM; IÇYER; ERDOĞNA, 2014; DONHOWE et al., 2014), necessitando de estudos adicionais sobre seu comportamento durante o processamento e a interação com os demais componentes da matriz alimentar.

A encapsulação proporciona o estudo da liberação gastrointestinal *in vitro*, o que viabiliza a análise do local de liberação dos compostos encapsulados, visando uma micropartícula que libere a maior parte dos compostos no intestino. Os compostos bioativos, como os polifenóis, são melhor absorvidos no fluido intestinal (Jia et al., 2016).

Com base nestes dados, este estudo foi desenvolvido para obter maiores informações sobre a encapsulação de própolis utilizando diferentes proteínas como materiais de parede, e para avaliar o perfil de liberação de compostos fenólicos microencapsulados em condições gastrointestinais *in vitro* através da sua aplicação em pudim e queijo Minas Frescal.

3.2. Material e métodos

3.2.1. Materiais

A própolis foi obtida de um apicultor da cidade de Rio Grande, Rio Grande do Sul, Brasil, (latitude: 32°02'06.2"S e longitude: 52°05'56.4"W), com as características: 5,78% de umidade, 36% de substâncias insolúveis, 64% de

substâncias solúveis, condutividade elétrica de $2,45 \text{ mS cm}^{-1}$, 5,55 pH, 12,90% de cera, 2,26% de cinzas e coloração marrom, sendo classificada como própolis do tipo 2. Os materiais de parede utilizados para a encapsulação do extrato de própolis foram: proteína concentrada de arroz (PCA) (73%) (Growth Supplements, Brasil), proteína concentrada de ervilha (PCE) (73%) Growth Supplements, Brasil), proteína isolada de soja (PIS) (81%) (Labonathus, Brasil) e ovoalbumina (83%) (NaturOvos, Brasil). O DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazila), 2,4,6-tris (2-piridil)-s-triazina (TPTZ), ácido gálico e quercetina foram obtidos da Sigma Aldrich. A enzima pepsina foi obtida da Merck, a pancreatina e os sais biliares foram obtidos da Sigma Aldrich. Os demais reagentes de grau analítico.

3.2.2. Obtenção do extrato de própolis

O extrato de própolis foi preparado de acordo com o descrito por Silva et al. (2012). Inicialmente, as amostras de própolis bruta foram trituradas com auxílio de nitrogênio líquido em moinho de bola (Marconi 350, Brasil). Cerca de 10 g de própolis foram submetidas ao processo de extração com 100 mL de etanol (80%), obtendo-se um extrato a 10% (1:10 m/v). A extração foi mantida sob agitação, a temperatura ambiente por 24 h. Após, o extrato foi filtrado em papel filtro Quali®, para a remoção de ceras e de substâncias menos solúveis. O sobrenadante foi colocado sob refrigeração por três dias, sendo submetido a centrifugação (Eppendorf 5430 R, Alemanha) a 260 g, 5 °C por 15 min, diariamente, para a retirada da cera presente no extrato. Os filtrados finais foram submetido a evaporador rotativo (Laborota 4000, Alemanha) sob pressão reduzida a 40 °C, e, em seguida, liofilizados (Liobras L101, Brasil), obtendo assim o extrato de própolis liofilizado (EPL).

3.2.3. Identificação e quantificação dos compostos fenólicos por LC-ESI-qTOF-MS

O EPL ($250 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$) foi resuspendido em metanol grau HPLC (Sigma-Aldrich®, EUA), sendo 10 μL injetados em cromatógrafo líquido (UFLC, Shimadzu, Japão) acoplado a espectrômetro de massas de alta resolução do tipo quadrupolo-tempo de voo (Maxis Impact, Bruker Daltonics, Alemanha). Para a separação cromatográfica foi utilizada a pré-coluna C18 (2,0 x 4 mm) e coluna Luna C18 (2.0 x 150 mm, 100 Å, 3 μm) (Phenomenex Torrance, EUA) utilizando as fases móveis: água acidificada com 0,1% de ácido fórmico (eluente A) e acetonitrila acidificada

com 0,1% de ácido fórmico (eluente B). Para separação foi utilizado um gradiente: 0–2 min, 10% B; 2–15 min, 10–75% B; 15-18 min, 90% B; 18-21 min 90% B; 21-23 min, 10% B; 23-30 min, 10% B; fluxo de 0,2 mL min⁻¹ e temperatura da coluna a 40 °C. O espectrômetro de massas foi operado nos modos ESI negativo (ácidos fenólicos e flavonoides) com espectros adquiridos ao longo de uma faixa de massa de m/z 50 a 1200, com voltagem capilar em 3.5 kV, pressão do gás de nebulização (N₂) de 2 bar, gás de secagem em 8 L min⁻¹, temperatura da fonte de 180 °C, colisão de RF de 150 Vpp; transfer 70 mS e armazenamento pré-pulso de 5 mS. O equipamento foi calibrado com formiato de sódio 10 mM, cobrindo a faixa de aquisição de m/z 50 até 1200. Experimentos automáticos de MS/MS foram realizados ajustando os valores de energia de colisão como se segue: m/z 100, 15 eV; m/z 500, 35 eV; m/z 1000, 50 eV, usando nitrogênio como gás de colisão. Os dados de MS e MS/MS foram processados por meio do software Data analysis 4.0 (BrukerDaltonics, Alemanha).

Os ácidos fenólicos e flavonoides foram caracterizados pelo espectro de UV/Vis (210-800 nm) e massa exata, padrões de fragmentação MSⁿ em comparação com os dados da biblioteca do equipamento, bases de dados (padões, Metlin, MassBank, KeggCompound, ChemSpider) e em comparação com padrão isotópico. A quantificação dos ácidos fenólicos e flavonoides foi realizada através de curva de calibração externa com padrões de cada composto e os resultados foram expressos em mg g⁻¹.

3.2.4. Preparo das proteínas

Foram preparadas soluções proteicas de cada proteína na concentração de 1% (m/v), como descrito por Costa et al. (2015), com poucas modificações. As proteínas de arroz, ervilha e soja foram dissolvidas em água destilada aquecida a 50 °C e mantidas sob agitação durante 1 h, após foram submetidas ao banho de ultrassom (Quimis Q335D Brasil) por 30 min. A ovoalbumina foi diluída em água com agitação magnética. Após todas as soluções foram submetidas à filtração em papel filtro.

3.2.5. Microencapsulação do extrato de própolis

As soluções das proteínas e o extrato de própolis na proporção de 1:1 (v/v) foram dispersos em homogeneizador (Ultra-Turrax T18, IKA, Alemanha) durante 2 min a 15000 rpm, conforme descrito por da Silva et al. (2013). Também foram preparadas micropartículas vazias (MV) somente com as soluções proteicas (proteínas de arroz, ervilha, soja e ovoalbumina), sem a adição do extrato de própolis para ser utilizada como o controle. As formulações foram atomizadas em *spray drying* (Labmaq MSDi 1.0, Brasil), nas seguintes condições operacionais: temperatura de entrada 120 °C; temperatura de saída de 72 ± 3 °C; fluxo de ar de $0,40 \text{ m}^3 \text{ min}^{-1}$; caudal de alimentação de $0,40 \text{ m}^3 \text{ min}^{-1}$; e diâmetro do bico de 3 mm. No final de cada atomização, as micropartículas de extrato de própolis (MEP) foram acondicionados em frasco plástico de polipropileno e mantido em dessecador até a realização das análises.

3.2.6. Ruptura das micropartículas

Primeiramente, 20 mg das MEP foram misturadas com 10 mL de etanol P.A. e centrifugada (Eppendorf 5430 R, Alemanha) a 4200 g por 15 min, a 25 °C, sendo realizada conforme descrito por Ghorbanzade et al. (2017). Após a separação das fases, foi coletado 1 mL do sobrenadante e realizado a análise do total de compostos fenólicos para avaliar os compostos que não foram encapsulados. Os 9 mL restantes foram sonicados (Quimis Q335D, Brasil) por 10 min, homogeneizados em homogeneizador (Ultra-Turrax T18, IKA, Alemanha) por 1 min a 12000 rpm e mantidos sob agitação por 24 h, a 25 °C em banho com água, para que houvesse a liberação dos compostos das micropartículas.

3.2.7. Determinação do teor total de compostos fenólicos

Para a determinação dos compostos fenólicos no extrato de própolis e nas MEP (do item 3.2.6.), foi utilizado o método de Folin-Ciocalteu (ALVES; KUBOTA, 2013). Para isto, 0,5 mL das amostras foram misturados com 2,5 mL de reagente de Folin-Ciocalteu 0,2 M, e após 5 min, adicionados 2 mL de solução de carbonato de sódio (7,5%). As amostras foram incubadas, à temperatura ambiente, no escuro por 2 h, e após a absorbância foi medida a 725 nm em espectrofotômetro (JENWAY 6705 UV/Vis, Espanha). A quantificação foi realizada utilizando a curva de calibração

realizada com o ácido gálico nas concentrações de 30 a 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ($y=0,014x + 0,0169$, $R^2=0,999$). Os resultados foram expressos em mg EAG g^{-1} em base seca, sendo a análise realizada em triplicata.

3.2.8. Eficiência de encapsulação

A eficiência da encapsulação foi calculada conforme descrito por Alishahi et al. (2011), de acordo com a equação 1, onde o total de compostos fenólicos na MEP corresponde ao total de compostos que foram analisados, estando dentro e fora das micropartículas (item 3.2.6.), e os compostos fenólicos na superfície são os compostos fenólicos que estão por fora, ou seja, que não foram encapsulados. Os resultados foram expressos em porcentagem de compostos fenólicos microencapsulados, sendo a análise realizada em triplicata (item 3.2.7.).

$$EE (\%) = \frac{(Total\ de\ compostos\ fenólicos) - (Compostos\ fenólicos\ na\ superfície)}{Total\ de\ compostos\ fenólicos} * 100 \quad (eq.1)$$

3.2.9. Rendimento

O rendimento de micropartículas obtidas por *spray drying* foi calculado de acordo com Çam et al. (2014), utilizando a equação 2. Os resultados foram expressos em porcentagem de rendimento das micropartículas, sendo a análise realizada em triplicata.

$$R (\%) = \frac{Peso\ das\ microcápsulas}{Peso\ da\ proteína + peso\ do\ extrato\ de\ própolis} * 100 \quad (eq.2)$$

3.2.10. Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC)

O comportamento a alta temperatura do EPL, das MV e das MEP obtidos por *spray drying* foi investigado usando a Calorimetria Diferencial de Varredura, DSC (Q20, Instrumento T.A, EUA), conforme descrito por Elbaz et al. (2016). As amostras (4 mg) foram aquecidas em uma panela de alumínio a uma taxa de $10\ ^\circ\text{C min}^{-1}$. O comportamento térmico foi avaliado entre uma faixa de temperatura de $30\ ^\circ\text{C}$ a $300\ ^\circ\text{C}$, sendo utilizado como veículo gás nitrogênio com fluxo de $25\ \text{mL min}^{-1}$.

3.2.11. Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

Foram analisados o EPL, das MV e das MEP obtidos por *spray drying* para a avaliação dos grupamentos funcionais em espectrômetro FTIR IRAffinity-1 (Shimadzu, Japão), na resolução de 4000 – 800 cm⁻¹, com 60 varreduras.

3.2.12. Difração de Raios-X

O EPL, as MV e as MEP foram analisados usando um difratômetro de Raios-X (Bruker D-8 Advance, EUA), sob radiação monocromática de Cu ($\lambda = 1,5418 \text{ \AA}$), alimentado a 40 kV e 40 mA. Os dados de difração foram coletados em temperatura ambiente, sob o ângulo 2θ variando de 1 a 90°, com intervalos de 0,05° a cada 1 s.

3.2.13. Capacidade de eliminação do radical DPPH

A capacidade antioxidante de eliminar os radicais 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo (DPPH) do extrato de própolis, das MV e das MEP foram avaliadas segundo o método descrito por Brand-Williams, Cuvelier e Berset (1995). Adicionou-se 0,1 mL de extrato de própolis e da solução com as partículas após ruptura (conforme item 3.2.6.) e 3,9 mL do DPPH em etanol (0,06 mM). A análise foi realizada em triplicata e a absorbância foi medida a 515 nm após 30 min de reação, utilizando um espectrofotômetro UV-vis (JENWAY6705 UV/Vis, Espanha). A capacidade de eliminação do DPPH do extrato e das micropartículas foi calculada usando a equação 3.

Em que, $Abs_{amostra}$ é a absorbância do extrato de própolis e da solução das micropartículas abertas; Abs_{branco} é a absorbância da solução sem a adição do DPPH; e $Abs_{controle}$ é somente a solução de DPPH em etanol. Os resultados foram expressos em porcentagem de inibição dos radicais DPPH, sendo calculados em base seca.

$$Inibição\ do\ DPPH\ (\%) = 100 - \frac{(Abs_{amostra} - Abs_{branco}) \times 100}{Abs_{controle}} \quad (eq.3)$$

3.2.14. Determinação das propriedades físicas das micropartículas

3.2.14.1 Morfologia das micropartículas

A morfologia foi determinada em microscópio eletrônico de varredura (JEOL JSM-6060 LV, Japão), com fixação das amostras em suporte metálico com fita de

carbono, após as amostras foram recobertas com uma fina camada de ouro (Elbaz et al., 2016). A visualização foi realizada com ampliação de 700 e 1500 X e voltagem de excitação de 15 kV.

3.2.14.2. Índice de solubilidade em água e índice de absorção de água

Estas propriedades foram determinadas de acordo com o método descrito por Maruf et al. (2010). Para a análise de solubilidade, cerca de 1 g das MEP e 30 mL de água foram agitados em agitador de tubos por 1 min. Logo após, a mistura foi incubada em banho (Quimis Q304M, Brasil) a 30 °C por 30 min, e na sequência centrifugada a 2090 g durante 15 min. O sobrenadante foi seco em estufa (Nova ética, Brasil) a 105 °C por 5 h. A quantidade de sólidos no sobrenadante seco, com uma percentagem dos sólidos secos totais na amostra original de 1 g, foi um indicador do índice de solubilidade em água.

A absorção de água foi calculada pela equação 4, onde o peso dos sólidos consiste no sedimento restante após centrifugação e a retirada da água. Os resultados foram expressos em porcentagem de absorção de água das micropartículas. A análise foi realizada em triplicata.

$$AA (\%) = \frac{\text{Peso dos sólidos umedecidos}}{\text{Quantidade inicial de micropartículas}} \quad (\text{eq.4})$$

3.2.14.3. Higroscopicidade

Cerca de 1 g das MEP foram incubadas a 25 °C em um recipiente hermético com uma solução saturada de NaCl (75% HR). Após 7 dias, a higroscopicidade foi avaliada através da pesagem das amostras, a cada 24 h até o equilíbrio ser atingido. Os resultados foram expressos em porcentagem, referentes a gramas de água absorvida por 100 g⁻¹ de amostra seca e a análise foi realizada em triplicata (BUSCH et al., 2017).

3.2.14.4. Atividade de água

A atividade de água (a_w) foi medida por leitura direta de, aproximadamente, 1 g de amostra das MEP no equipamento (Aqualab Novasina, Brasil) de acordo com a AOAC (1995). A análise foi realizada em triplicata.

3.2.15. Aplicação das micropartículas de própolis em produtos alimentícios

As micropartículas foram adicionadas em pudim e em queijo Minas Frescal; alimentos escolhidos por não conterem a presença de compostos fenólicos em sua composição.

3.2.15.1. Aplicação das micropartículas de própolis em pudim

Para o preparo do pudim foi utilizado 25 g de pó para pudim (Lowçúcar, Brasil), 500 mL de leite UHT integral e $0,01 \text{ g g}^{-1}$ pudim de partículas. O pó do pudim foi misturado ao leite e aquecido até a fervura, após mantido por 2 min sob aquecimento em temperatura de $85 \pm 3 \text{ }^{\circ}\text{C}$ e agitação manual, momento em que as micropartículas foram adicionadas. Após o resfriamento, o pudim foi mantido sob refrigeração ($6 - 8 \text{ }^{\circ}\text{C}$) por 24 h para a realização da análise de digestão *in vitro*.

3.2.15.2. Aplicação das micropartículas de própolis em queijo Minas Frescal

Para avaliação da digestão das micropartículas foi preparado queijo Minas Frescal, segundo Malheiros et al. (2012) com a adição de 1% de micropartículas (p/p) em relação à matéria seca (contendo aproximadamente 6 mg de compostos fenólicos da própolis). No preparo foram utilizados leite pasteurizado (Pomerano, Brasil), cloreto de cálcio ($0,2 \text{ g L}^{-1}$) e coagulante líquido quimosina (Ha-La, Brasil). Após a adição do cloreto de cálcio em 1 L de leite a $38 \text{ }^{\circ}\text{C}$, 1 mL do coagulante quimosina foi previamente diluído em água fria e adicionado ao leite, sendo o leite homogeneizado e mantido em repouso por 50 min a temperatura de $31 \text{ }^{\circ}\text{C}$ até obter-se o ponto da coalhada. A coalhada foi então cortada em cubos e homogeneizada por 30 min, até obter-se pequena firmeza nos grãos, que se tornaram arredondados. Posteriormente, a massa coalhada foi enformada em formas perfuradas e deixadas escorrer em superfície limpa por 30 min. Ao final do dessoramento, as micropartículas ($0,01 \text{ g g}^{-1}$ queijo) foram adicionadas ao queijo para evitar perdas com a dessoradora, juntamente com a adição de 2 g L^{-1} de cloreto de sódio. A massa foi levemente homogeneizada e deixada em repouso para a obtenção da união dos grãos. Após a viragem, os queijos foram desenformados e mantidos sob refrigeração ($6-8 \text{ }^{\circ}\text{C}$) por 24 h para a realização da análise de digestão *in vitro*.

3.2.17. Digestão *in vitro*

Foram realizados ensaios de digestão *in vitro* com 8 g dos produtos alimentícios (queijo e pudim) nos quais foram adicionadas as micropartículas. As simulações do meio digestivo utilizando o suco gástrico e intestinal foram realizadas segundo procedimentos descritos por Donhowe et al. (2014), com algumas modificações (Tabela 1). A digestão gástrica foi iniciada adicionando 12 mL de suco gástrico em banho com água a 37 °C com agitação orbital a 120 rpm (Dubnoff, Nova ética, Brasil), o qual foi mantido por 2 h, após simulou-se a digestão intestinal pela adição de 12 mL de suco intestinal e 6 mL de sais biliares ao mesmo frasco, sendo mantido por mais 4 h. O tempo total de reação foi de 360 min, sendo retiradas alíquotas a cada 60 minutos para a realização da análise do total de compostos fenólicos (item 3.2.7.). A porcentagem de liberação dos compostos fenólicos foi calculada de acordo com a equação 5, onde o total de compostos fenólicos microencapsulados (equivalente a 100 % de liberação) foi analisado após a ruptura das micropartículas (conforme item 3.2.6.).

$$\text{Liberação (\%)} = \frac{\text{Compostos fenólicos liberados} \times 100}{\text{Total de compostos fenólicos microencapsulados}} \quad (\text{eq. 5})$$

Tabela 1. Composição dos fluídos gástrico e intestinal utilizados na digestão *in vitro*

Suco Gástrico	Suco Intestinal	Sais Biliares
5,5 mg mL ⁻¹ NaCl	14 mg mL ⁻¹ NaCl	10,58 mg mL ⁻¹ NaCl
1,6 mg mL ⁻¹ KCl	1,1 mg mL ⁻¹ KCl	0,75 mg mL ⁻¹ KCl
0,5 mg mL ⁻¹ NaH ₂ PO ₄	6,8 mg mL ⁻¹ NaHCO ₃	11,57 mg mL ⁻¹ NaHCO ₃
0,8 mg mL ⁻¹ CaCl ₂ .2H ₂ O	0,16 mg mL ⁻¹ KH ₂ PO ₄	
0,6 mg mL ⁻¹ NH ₄ Cl	0,1 mg mL ⁻¹ MgCl ₂	
6,5 mL HCl	180 µL HCl	150 µL HCl
0,2 mg mL ⁻¹ ureia	0,2 mg mL ⁻¹ ureia	0,5 mg mL ⁻¹ ureia
5 mg mL ⁻¹ pepsina	18 mg mL ⁻¹ pancreatina	60 mg mL ⁻¹ sais biliares
pH: 1,3 ± 0,2	pH: 8,1 ± 0,2	pH: 8,2 ± 0,2

3.2.18. Análise estatística

Os valores obtidos foram expressos em médias $\pm$ desvio padrão, e todas as análises foram realizadas em triplicata e posteriormente submetidas a análise de variância usando S.A.S 9.1 (Cary, NC).

O teste de Tukey ($p \leq 0,05$) foi utilizado na comparação dos resultados dos materiais de parede quanto à eficiência, capacidade antioxidante, rendimento, solubilidade, absorção, higroscopicidade, a_w e digestão *in vitro*. O teste de Dunnet ($p \leq 0,05$) foi utilizado na comparação dos resultados da capacidade antioxidante do extrato de própolis e das micropartículas com

3.3. Resultados e discussão

3.3.1. Identificação e quantificação dos compostos fenólicos por LC-ESI-qTOF-MS

Foram identificados 13 compostos fenólicos nos extratos de própolis, sendo que a apigenina ($9,21 \text{ mg g}^{-1}$) foi o principal componente, seguido da luteolina ($4,00 \text{ mg g}^{-1}$) (Tabela 2).

Tabela 2. Compostos fenólicos no extrato de própolis, analisados por LC-ESI-qTOF-MS

RT [min]	<i>m/z</i> Experimental [M-H]	<i>m/z</i> Teórica [M-H]	Erro [ppm]	mSigma [£]	Fórmula molecular	Identificação	Quantificação o (mg g ⁻¹)*
3,84	169,0123	169,0142	11,4	24,7	C ₇ H ₆ O ₅	Ácido gálico	0,05±0,01
8,04	353,0865	353,0878	3,7	14,7	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	Ácido clorogênico	0,40±0,07
8,06	137,0236	137,0244	6,2	0,9	C ₇ H ₆ O ₃	Ácido 4-hidroxibenzóico	0,90±0,02
8,49	179,0339	179,0350	6,2	4,5	C ₉ H ₈ O ₄	Ácido cafeico	0,91±0,6
8,81	609,1453	609,1461	1,3	33,4	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	Rutina	0,01±0,00
9,36	163,0394	163,0401	3,9	0,2	C ₉ H ₈ O ₃	Ácido p-cumárico	0,90±0,07
9,70	193,0499	193,0506	3,9	16,1	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	Ácido ferúlico	2,5±0,21
10,73	301,0351	301,0354	0,9	24,9	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	Quercetina	0,54±0,05
11,03	285,0408	285,0405	1,6	24,2	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	Luteolina	4,00±0,33
11,43	285,0405	285,0405	-0,3	40,0	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	Kaempferol	1,33±0,12
12,91	253,0496	253,0506	4,2	29,5	C ₁₅ H ₁₀ O ₄	Crisina	0,25±0,05
12,97	255,0653	255,0663	3,8	26,6	C ₁₅ H ₁₂ O ₄	Pinocembrina	1,06±0,20
13,15	269,0465	269,0455	-3,7	15,2	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	Apigenina	9,21±1,02

Confirmado com MS / MS; RT = tempo de retenção; £ mSigma, se encaixa entre o padrão isotópico medido e teórico (menor o valor mSigma, melhor o ajuste isotópico).

Estes resultados estão próximos aos encontrados por Neto et al. (2017), ao analisarem própolis vermelha oriunda do estado de Pernambuco (Brasil); porém, a luteolina (7,51 mg g⁻¹) foi o composto fenólico predominante. Andrade et al. (2017) analisaram própolis marrom do estado de Alagoas (Brasil) e encontraram em maiores concentrações, os flavonoides artepelin C (3,72 mg g⁻¹), kaempferide (3,48 mg g⁻¹), kaempferol (0,61 mg g⁻¹) e pinocembrina (1,66 mg g⁻¹); e dentre os ácidos fenólicos, p-cumárico (2,64 mg g⁻¹), clorogênico (1,76 mg g⁻¹) e cafeico (0,59 mg g⁻¹). A luteolina (0,04 mg g⁻¹) e a apigenina (0,03 mg g⁻¹) estavam presentes em baixas quantidades quando comparado aos dados encontrados no presente estudo. Waller

et al. (2017) analisaram própolis marrom da cidade de Pelotas, Rio Grande do Sul (Brasil) e encontraram o ácido p-cumárico ($3,39 \text{ mg g}^{-1}$) como sendo o composto majoritário. No entanto, neste estudo analisando a própolis da cidade de Rio Grande (RS, Brasil) os flavonoides foram encontrados em maiores concentrações, mas dentre os ácidos fenólicos, o ácido ferúlico esteve presente em maior concentração ($2,5 \text{ mg g}^{-1}$).

A própolis apresenta uma composição química muito variada, mas em se tratando de compostos fenólicos, a literatura demonstra que são frequentemente relatados os ácidos cafeico, ácido p-cumárico, ácido ferúlico, a quercetina, apigenina, luteolina, galangina, miricetina, pinocembrina e rutina, com variações quantitativas (AHN et al., 2007; Dos REIS et al, 2017; BUSCH et al., 2017). Os compostos fenólicos identificados neste trabalho (Tabela 2) possuem grupos hidroxila ligados ao anel aromático, que os tornam capazes de formar ligações do tipo pontes de hidrogênio, dipolo-dipolo e íon-dipolo com os aminoácidos polares presentes nas proteínas.

Os resultados obtidos evidenciam as diferenças quantitativas nos compostos fenólicos de amostras de própolis de mesma coloração marrom, mas produzidas em regiões diferentes. Alguns fatores como, a diversidade na vegetação das regiões, o período de coleta e a matéria-prima utilizada pelas abelhas, são alguns dos fatores que influenciam na diversificação da composição química da própolis (NETO et al., 2017).

3.3.2. Eficiência de encapsulação e capacidade antioxidante das micropartículas de própolis

Todas as micropartículas avaliadas mostraram alta retenção (de 70,21 a 90,20%) do total de componentes fenólicos do extrato de própolis que era de $43,82 \text{ mg g}^{-1}$ (Tabela 3). Os resultados de eficiência de encapsulação variaram de acordo com o material de parede, sendo que a utilização das proteínas de arroz e de ervilha possibilitou à obtenção de valores de eficiência significativamente superior em relação a utilização das demais proteínas.

A afinidade de um determinado composto com a proteína pode estar relacionada ao perfil de aminoácidos da proteína, que, por sua vez, depende da fonte a partir da qual a proteína provém, além disso, também exercem influência a

estrutura e a conformação da proteína e as propriedades do composto que se deseja encapsular (TARHINIA; GREIGE-GERGES; ELAISSARIA, 2017).

Embora tenham sido observadas perdas de compostos fenólicos, que foram atribuídas em parte à adesão das micropartículas ao atomizador e também pela degradação destes compostos devido às altas temperaturas utilizadas no processo por *spray drying* sob a exposição ao oxigênio, quando comparado ao extrato de própolis puro, a obtenção das micropartículas aumenta as perspectivas para que a própolis se torne um ingrediente natural para aplicação em produtos alimentares.

Tabela 3. Eficiência de encapsulação e capacidade antioxidante das micropartículas de própolis

Materiais de parede	Eficiência de encapsulação (%)	Inibição do DPPH (%)
EP	—	88,37 ± 1,32
PCA	90,20 ± 1,90 ^a	86,93 ± 0,52 ^a
PCE	89,25 ± 1,46 ^a	81,85 ± 0,65b*
PIS	70,21 ± 0,94c	80,98 ± 0,92b*
O	73,36 ± 0,03b	73,41 ± 0,14c*

Médias acompanhadas por mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$), avaliando o extrato de própolis microencapsulado, dentro de cada material de parede. * Significativo em relação ao controle (Extrato de Própolis) pelo teste de Dunnett ($p \leq 0,05$). Média de três repetições ± desvio padrão. PCA: proteína concentrada de arroz; PCE: proteína concentrada de ervilha; PIS: proteína isolada de soja; O: ovoalbumina.

A proteína de arroz possui quatro frações majoritárias na sua composição: albumina (5-10%), globulina (7-17%), glutelina (75-81%) e prolamina (3-6%) (AMAGLIANI et al., 2017), enquanto as proteínas de armazenamento das dicotiledôneas, como as proteínas de ervilha e de soja, apresentam na sua constituição, principalmente, as albuminas (18-25%) e as globulinas (55-80%) (STONE et al., 2015). A ovoalbumina por sua vez, sendo uma proteína de origem animal apresenta como frações majoritárias a albumina (60-68%) e globulinas (8-12%) (VISENTINI et al., 2017). Assim, as proteínas de ervilha, soja e a ovoalbumina, apresentam alta proporção de frações polares (albumina e/ou globulina), o que justifica os valores de eficiência de encapsulação obtidos, já que grande parte dos compostos fenólicos da própolis também apresentam caráter polar. A proteína de arroz apresenta em maior proporção a glutelina, que é insolúvel em água, no

entanto, com esta proteína foram obtidos altos valores de eficiência de encapsulação.

Quanto à capacidade antioxidante (Tabela 3), as micropartículas de extrato de própolis, independente do material de parede, mantiveram a alta atividade de eliminação dos radicais livres DPPH (73,41 a 86,93%), sendo que as obtidas com a proteína de arroz e de apresentaram os maiores percentuais na inibição do radical DPPH. Além disso, não foi observada diferença significativa na atividade antioxidante das micropartículas com proteína de arroz em relação ao extrato de própolis, pelo teste de Dunnett ($p \leq 0,05$). A própolis desperta grande interesse por ser uma fonte de antioxidantes naturais devido a presença de compostos fenólicos, os quais protegem o organismo humano (AHN et al., 2007).

Constatou-se que o material de parede exerceu influencia na capacidade antioxidante das partículas, sendo que, a micropartícula com proteína de arroz apresentou o valor mais alto (86,93%). Por ser uma característica marcante na própolis, considera-se de grande relevância a microencapsulação preservar esta característica. Esses resultados demonstram que a microencapsulação aumenta as perspectivas para que a própolis se torne um ingrediente natural para aplicação em produtos alimentares.

3.3.3. Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC)

No termograma de DSC do extrato de própolis (figura 1: a1, a2, a3 e a4), foi identificado como sendo os principais os eventos endotérmicos nas temperaturas de 55 °C, 170 °C, 182 °C, 220 °C e 230 °C. De acordo com Elbaz et al. (2016), os eventos endotérmicos no extrato de própolis são referentes a eventos de fusão de compostos.

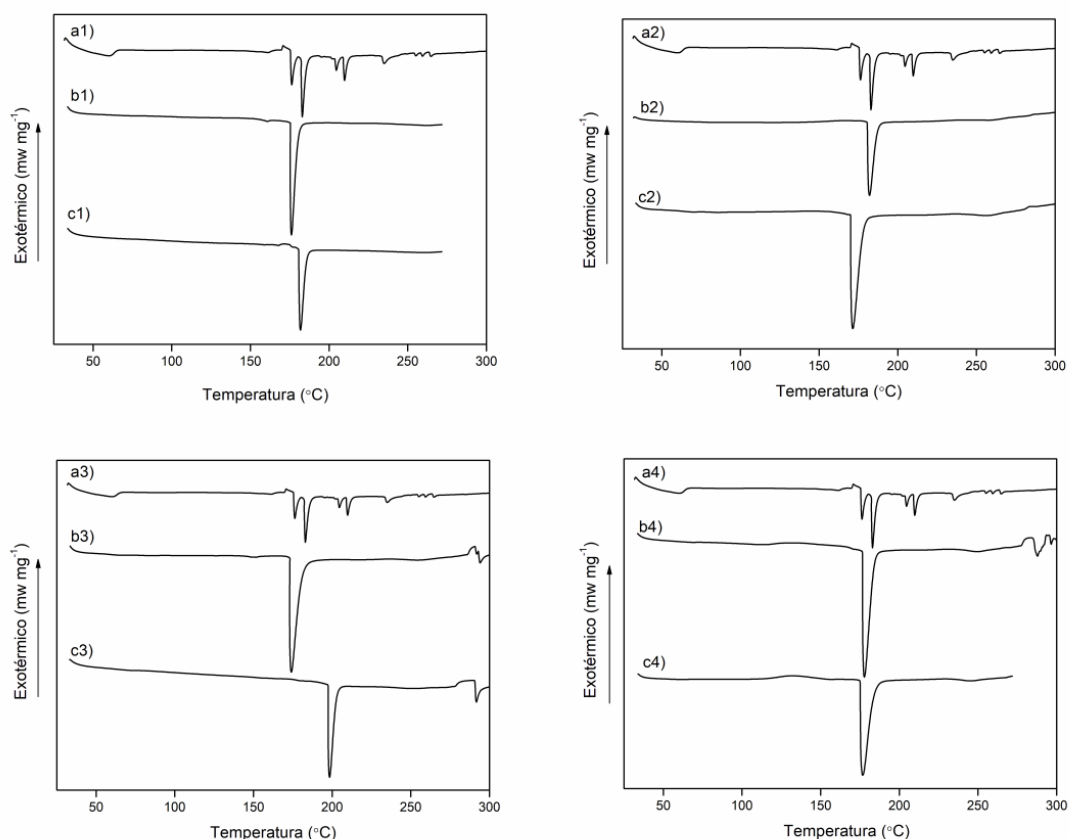


Figura 1. Termogramas de DSC: a1) extrato de própolis, b1) proteína de arroz, c1) micropartícula de extrato de própolis com proteína de arroz. a2) extrato de própolis, b2) proteína de ervilha, c2) micropartícula de extrato de própolis com proteína de ervilha. a3) extrato de própolis, b3) proteína de soja, c3) micropartícula de extrato de própolis com proteína de soja. a4) extrato de própolis, b4) proteína ovoalbumina, c4) micropartícula de extrato de própolis com proteína ovoalbumina.

No geral, foi observado um único pico endotérmico a 182 °C, 172 °C, 170 °C e 175 °C, para as proteínas de arroz, de ervilha, de soja e a albumina, respectivamente (Figura 1: b1, b2, b3, b4). Esse pico acredita-se estar associado à temperatura final de desnaturação proteica (AMAGLIANI et al., 2017; VISENTINI et al., 2017). Para as proteínas de soja e ovoalbumina nas temperaturas de 290 °C e 280 °C, respectivamente, pode-se visualizar o início de eventos exotérmicos, os quais são referentes à degradação térmica da proteína (ELBAZ et al., 2016).

Nos termogramas das micropartículas pode-se observar eventos endotérmicos nas temperaturas de 170 °C, 184 °C, 200 °C e 179 °C, respectivamente, para as micropartículas com arroz, com ervilha, com soja e com a ovoalbumina (Figura 1: c1, c2, c3, c4). Os eventos endotérmicos presentes no extrato de própolis não foram observados nos termogramas de nenhuma das micropartículas analisadas, o que sugere que ocorreu a microencapsulação dos

compostos presentes no extrato de própolis (ELBAZ et al., 2016). Além disso, pode-se observar o deslocamento do evento endotérmico para temperaturas superiores, das micropartículas em que as proteínas de ervilha e de soja (Figura 1- c2, c3) foram utilizadas como material de parede, o que indica maior estabilidade térmica dessas micropartículas.

3.3.4. Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

Na figura 2 estão demonstrados os espectros ATR-FTIR das proteínas, do EPL e das MEP.

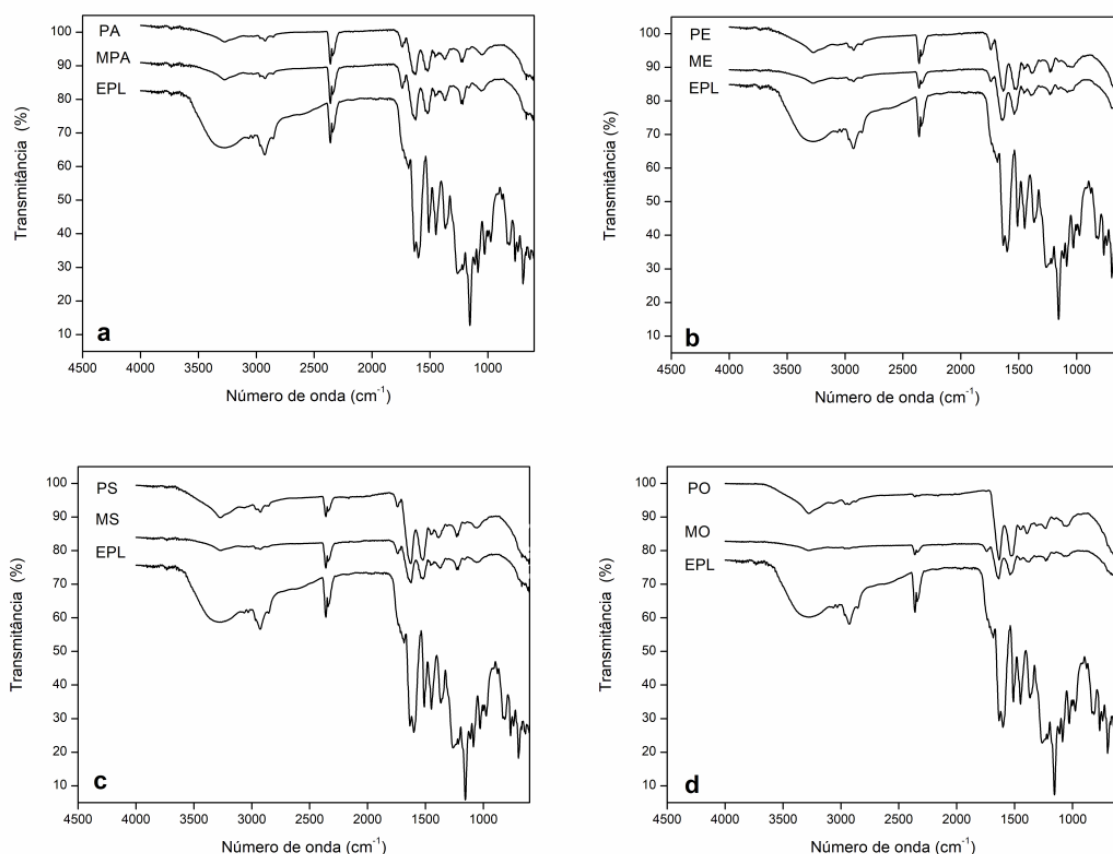


Figura 2. Espectros de ATR-FTIR para a) MPA: micropartícula de extrato de própolis (EP) com proteína de arroz (PA); b) ME: micropartícula de EP com proteína de ervilha (PE); c) MS: micropartícula de EP com proteína de soja (PS); d) MO: micropartícula de EP com ovoalbumina (PO). EPL. Extrato de própolis liofilizado.

No espectro do EPL foi encontrada uma banda larga entre 3560 cm^{-1} – 3100 cm^{-1} que é característica do estiramento O-H, o qual está presente nos compostos fenólicos. As bandas na região entre 2946 cm^{-1} - 2834 cm^{-1} são vibrações características de ligação C-H de grupos alifáticos (CH_2 , CH_3). As vibrações entre

1700 cm^{-1} - 1584 cm^{-1} correspondem aos alongamentos C=C do anel aromático, e, além disso, foi observado um estiramento em 1148 cm^{-1} , o qual é característico do grupamento do éter presente nos flavonoides (C-O).

Resultados semelhantes foram encontrados no trabalho de Nascimento et al. (2016), os quais relatam espectros ATR-FTIR do extrato de própolis em 3336 cm^{-1} atribuídos ao grupamento hidroxila (O-H) de compostos fenólicos, além das absorções em 1617, 1496 e 1450 cm^{-1} correspondentes aos trechos C = C de anel aromático e a banda em 1045 cm^{-1} atribuída ao estiramento da ligação C-O de éter aromático (para flavonoides). No trabalho de Ballasteros et al. (2017) foi analisado o espectro FTIR dos compostos fenólicos antioxidantes do café, e a banda em 2930 cm^{-1} também foi identificada como sendo um estiramento CH_2 e CH_3 , relacionado com compostos aromáticos semelhante a estrutura do anel dos compostos fenólicos, como os flavonoides.

Os espectros de todas as proteínas apresentaram uma banda forte referente ao estiramento axial em 3270 cm^{-1} , associado às ligações O-H sobreposta à banda de estiramento da ligação N-H. As bandas fracas de estiramento axial em 2940 cm^{-1} - 2922 cm^{-1} são atribuídas à ligação C-H. Todos os espectros também apresentaram bandas médias a fortes entre 1623 cm^{-1} – 1516 cm^{-1} , o que é característico da deformação angular simétrica de grupamentos amina presente nas proteínas. Costa et al. (2015) microencapsularam ácido linoleico conjugado utilizando proteína de ervilha como material de parede e encontraram resultados semelhantes para o espectro FTIR da proteína de ervilha.

Os espectros de FTIR das MEP demonstraram similaridade, com a maioria das bandas características das proteínas, mas com diferentes intensidades de transmitância em determinados picos. Os espectros demonstraram bandas características da proteína entre 1632 cm^{-1} - 1526 cm^{-1} , porém, pode ser observado que houve uma intensa redução das bandas em 3261 cm^{-1} e 1642 cm^{-1} - 1545 cm^{-1} , quando comparado ao espectro das referidas proteínas, indicando que estas ligações estão envolvidas na formação das micropartículas. Além disto, não foi possível detectar o perfil do extrato de própolis nos espectros das MEP, o que sugere a encapsulação.

Siripatrawan et al. (2016) ao realizarem filmes de quitosana incorporados de extrato de própolis observaram além da diminuição na intensidade das bandas no extrato de própolis em 1700 cm^{-1} (C=O do grupo carboxílico) e em 1660 cm^{-1} (C=C

do anel aromático), o surgimento de uma nova banda em 1257 cm^{-1} a qual foi atribuída à vibração de flexão de grupamentos OH do fenol presente no extrato de própolis.

Dessa forma, a técnica ATR-FTIR demonstrou ter ocorrido a encapsulação do extrato de própolis por *spray drying*, evidenciando que as proteínas foram eficazes como material de parede na encapsulação.

3.3.5. Difração de Raios-X

O difratograma da própolis demonstrou picos em torno de 21° e 23° (Fig. 3), pontiagudos e estreitos, característico de material cristalino. Outros autores também encontraram resultados semelhantes em extrato de própolis, sendo relatado como material cristalino (SHANG-JUNG et al., 2014; ROSSETO et al., 2017).

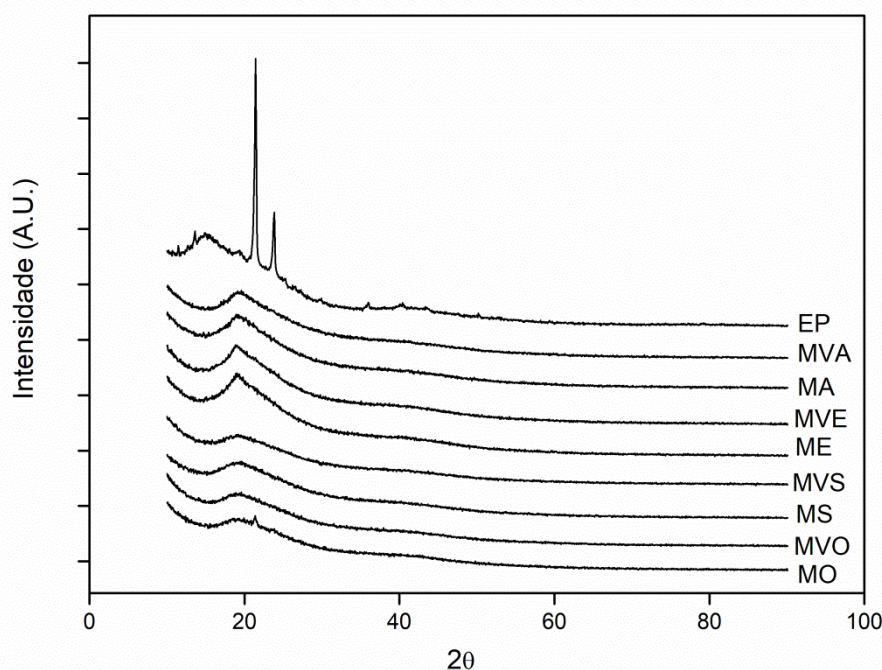


Figura 3. Espectros de difração de raios-X de extrato de própolis liofilizado (EPL), das micropartículas vazias (MV), e das micropartículas de extrato de própolis (MP). MVA: micropartícula vazia com proteína de arroz; MA: micropartícula de extrato de própolis com proteína de arroz; MVE: micropartícula vazia com proteína de ervilha; ME: micropartícula de extrato de própolis com proteína de ervilha; MVS: micropartícula vazia com proteína de soja; MS: micropartícula de extrato de própolis com proteína de soja; MVO: micropartícula vazia com proteína ovoalbumina; MO: micropartícula de extrato de própolis com ovoalbumina.

Por outro lado, os difratogramas das MV e das MEP apresentaram halos difusos, com bases alargadas, sendo característico de materiais no estado amorfo. Trabalhos relatam melhora na digestão e na solubilidade dos compostos amorfos,

além do possível aumento na solubilidade dos pós (BOTREL et al., 2014; GÓMEZ-ESTACA; GAVARA; HERNÁNDEZ-MUÑOZ, 2015).

Ao comparar os difratogramas do EPL com o das MEP obtidas, é observado que todas as MEP obtidas independente da proteína utilizada, ocorreu uma redução nos sinais, com o desaparecimento dos picos em 21,0 ° e 23 °C do EPL, o que pode indicar uma interação dos compostos presentes no EPL com as proteínas utilizadas como material de parede.

3.3.6. *Morfologia das micropartículas*

A microencapsulação do extrato de própolis com as proteínas vegetais (Figura 4 - A, B, C, D, E, F) resultou em micropartículas com formato e superfície desuniforme e com rugosidades, além de tamanhos variados, sendo que a utilização da proteína de arroz possibilitou a formação de micropartículas de tamanhos superiores às obtidas com as demais proteínas. As micropartículas produzidas com a ovoalbumina como material de parede resultaram em formato esférico, superfície com concavidades e tamanhos variados (figura 4 – G, H), além de apresentar dimensões inferiores às demais.

Foi observado maior agregação nas micropartículas produzidas com proteína de arroz e soja, as quais apresentaram também os maiores valores de higroscopicidade (22,93 e 13,45% respectivamente), evidenciando a influência desta característica física na morfologia das micropartículas.

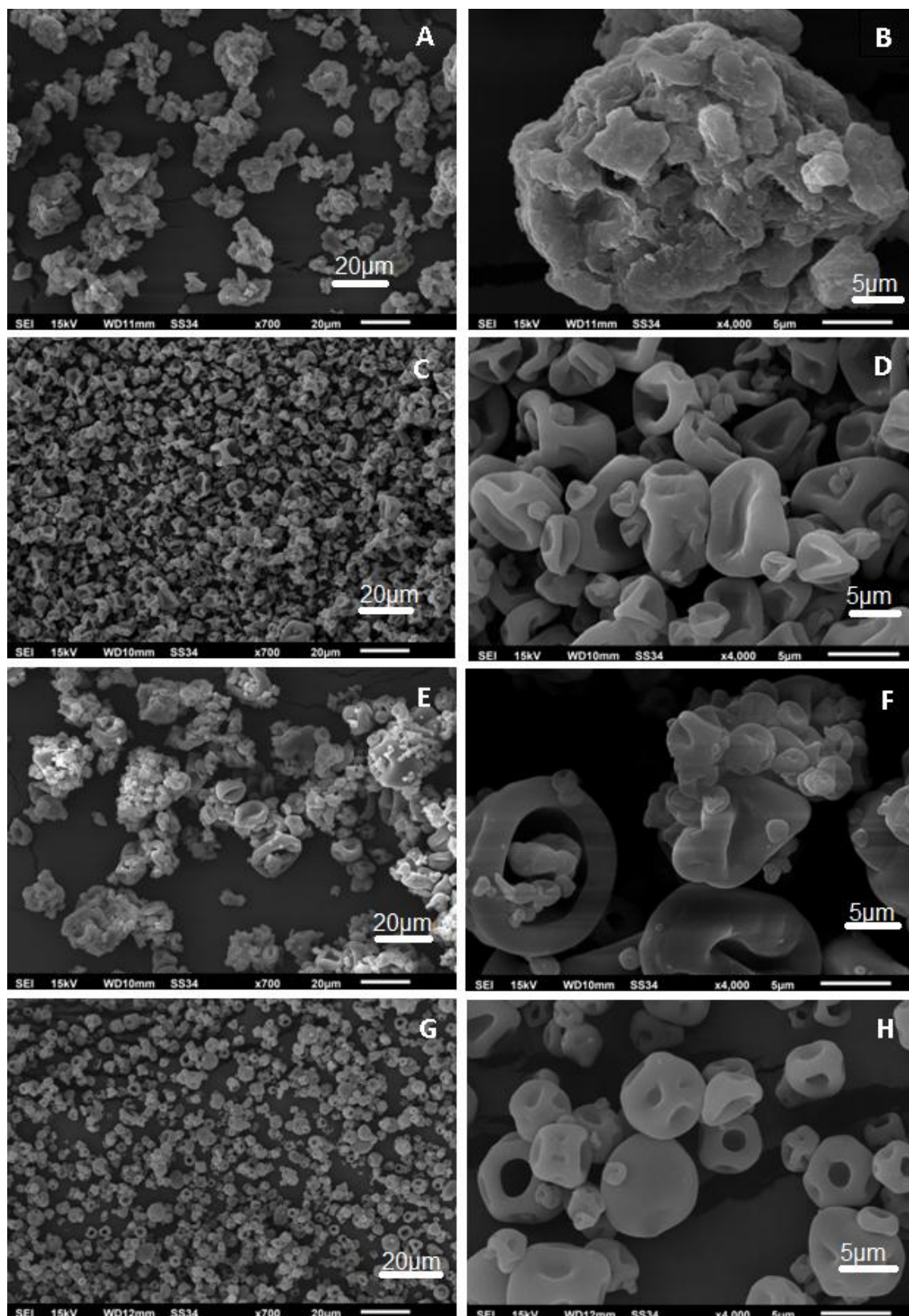


Figura 4. Imagens da morfologia das micropartículas de extrato de própolis com proteína de arroz (A- 700 × e B- 4000 ×); micropartícula de extrato de própolis com proteína de ervilha (C- 700 × e D- 4000 ×); micropartícula de extrato de própolis com proteína de soja (E- 700 × e F- 4000 ×); micropartícula com extrato de própolis com ovoalbumina (G- 700 × e H- 4000 ×)

Os materiais secos por *spray drying* geralmente apresentam um formato esférico, porém sabe-se que a natureza dos materiais de parede, a sua composição, os parâmetros de secagem e as condições de armazenamento podem influenciar nas características de superfície das micropartículas (PIERUCCI et al., 2007; COSTA et al., 2015).

A formação de rugosidades ou invaginações nas micropartículas tem sido atribuída à velocidade de secagem e propriedades viscoelásticas do material de parede. Essa característica não é considerada adequada, pois micropartículas com superfícies irregulares podem apresentar rápida liberação do material encapsulado (COSTA et al., 2015). Entretanto, as características observadas nas micropartículas avaliadas no presente trabalho, como rugosidades e agregação das micropartículas, também foram relatadas por outros autores que produziram partículas utilizando proteínas como material de parede e a encapsulação por *spray drying* (BRUSCHI et al., 2003; PIERUCCI et al., 2007; CHOI et al., 2010; COSTA et al., 2015).

No entanto, neste trabalho não foram observados fissuras e rachaduras em nenhuma das micropartículas obtidas, o que é considerado como importante característica para uma apropriada encapsulação do extrato de própolis. Segundo Busch et al. (2017), tais características garantem uma barreira do material de parede e uma melhor proteção do núcleo.

Há pesquisas indicando que as interações entre os carboidratos e as proteínas influenciam na textura da superfície das partículas atuando como plastificantes, possibilitando formatos uniformes e de superfície lisa (BRUSCHI et al., 2003; COSTA et al., 2015).

3.3.7. *Rendimento e propriedades físicas das micropartículas de própolis*

O rendimento das micropartículas variou conforme a proteína utilizada, mas no geral foi considerado baixo (Tabela 4), sendo que a utilização da ovoalbumina e da proteína de ervilha como materiais de parede proporcionaram rendimento de micropartículas significativamente superior, em relação às proteínas de arroz e soja.

Tabela 4. Rendimento e propriedades físicas das micropartículas de própolis

Materiais de parede	Rendimento (%)	Solubilidade (%)	Absorção de água (%)	Higroscopicidade (%)	a_w
Proteína de Arroz	27,90±6,68 ^b	1,55±0,34 ^d	3,45±0,11 ^b	22,93±2,5 ^a	0,27± 0,04 ^a
Proteína de Ervilha	41,33±4,71 ^a	35,62±3,15 ^b	4,81±0,16 ^b	7,35±0,3 ^c	0,29± 0,05 ^a
Proteína de Soja	20,09±5,00 ^b	22,49±2,76 ^c	4,63±1,07 ^b	13,45±0,5 ^b	0,26± 0,03 ^a
Ovoalbumina	52,67±2,36 ^a	81,47±3,34 ^a	8,81±2,07 ^a	10,95±0,1 ^b	0,31± 0,04 ^a

Médias acompanhadas por mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$), avaliando o extrato de própolis microencapsulado, dentro de cada material de parede. Média de três repetições $\pm$ desvio padrão.

O processo de microencapsulação utilizando o por *spray drying* é considerado simples, rápido e de baixo custo. No entanto, conforme relatado por Nesterenko et al. (2013), o rendimento do produto obtido é baixo, devido à adesão do pó ao secador de pulverização. Além disso, quando utilizado altas concentrações de proteínas, ocorre menor recuperação do pó, pois as proteínas formam películas, que se tornam rapidamente pegajosas (MOSER et al., 2017). Estudos demonstraram que a utilização de carboidratos associados a proteínas, possibilita o aumento do rendimento de micropartículas obtidas por *spray drying*, devido à redução do comportamento adesivo (viscosidade) entre as partículas e a parede do *spray drying* (FANG; BHANDARI, 2012). Bruschi et al. (2003), observaram que pela adição de manitol a gelatina foi possível aumentar o rendimento de encapsulação de 28,46% para 51,48%, utilizando a técnica de *spray drying*.

A solubilidade e a absorção de água das micropartículas foram dependentes do material de parede utilizado (Tabela 4). A utilização da ovoalbumina como material de parede resultou em micropartículas com solubilidade e absorção de água significativamente superiores (81,47% e 8,81%); possivelmente, em função da presença majoritária de aminoácidos polares na constituição desta proteína. Choi et al. (2010) encontraram alta solubilidade (86,90%) ao utilizar uma proteína de origem animal (proteína concentrada do soro do leite) como material de parede em micropartículas de ácido linoleico conjugado. No entanto, a micropartícula com a proteína de arroz apresentou resultados de solubilidade significativamente inferiores às demais, o que segundo Kuck e Noreña (2016), estaria relacionado ao tamanho de partícula obtida, pois, quanto menor o tamanho de partícula maior a área da partícula que será hidratada, o que pode ser observado na Figura 4, onde a

micropartícula com proteína de arroz exibiu tamanho superior às demais micropartículas.

As micropartículas apresentaram grande variabilidade em higroscopicidade (Tabela 4), onde as micropartículas de proteína concentrada de arroz apresentaram-se significativamente mais higroscópicas em relação às demais. Portanto, para o armazenamento por longos períodos, recomenda-se ambiente com baixa umidade ou a utilização de embalagens com baixa permeabilidade ao vapor de água. Por outro lado, as micropartículas de proteína de soja e ovoalbumina apresentaram valores intermediários e aquelas formadas com proteína de ervilha, valores baixos de higroscopicidade foram obtidos.

O material de parede não afetou a a_w das micropartículas, não havendo diferenças significativas ($p \leq 0,05$) entre as micropartículas elaboradas com os diferentes materiais de parede. Os valores obtidos estão condizentes com os relatados na literatura para micropartículas de própolis com gelatina e manitol (BRUSCHI et al., 2003) e para micropartículas de própolis com amido e goma arábica (da SILVA et al., 2013), ambas obtidas por atomização. Estes resultados garantem a estabilidade microbiológica do material (da SILVA et al., 2011).

3.3.8. Digestão *in vitro*

Na digestão *in vitro* são simulados os fluidos gástrico e intestinal para que ocorra a liberação dos compostos fenólicos encapsulados. Durante as duas primeiras horas analisadas, é simulada a fase gástrica (estômago), e às quatro horas posteriores corresponderam à fase intestinal (intestino delgado) (DONHOWE et al., 2014).

O perfil de liberação dos compostos fenólicos variou de acordo com o material de parede e com o alimento no qual as micropartículas foram aplicadas (figura 5). No geral, não houve diferença significativa na liberação dos compostos fenólicos das micropartículas em relação ao tempo de liberação analisado ($p \leq 0,05$), sendo o comportamento de liberação das micropartículas dependente do fluido e material de parede avaliado.

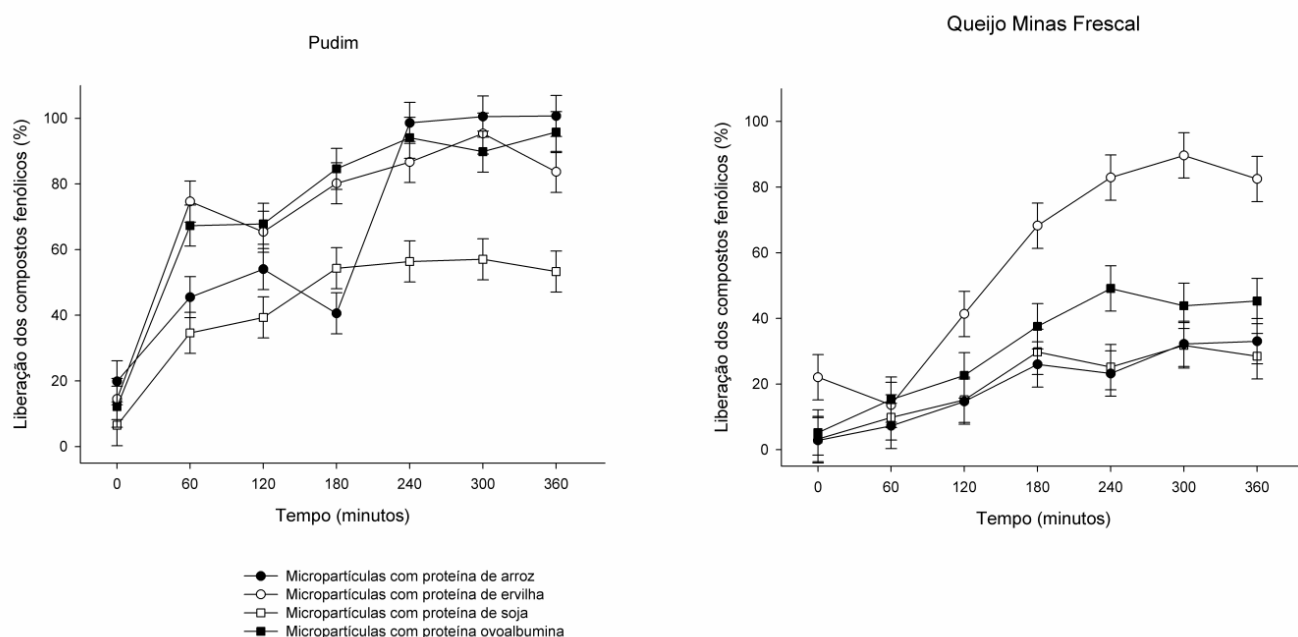


Figura 5. Liberação dos compostos fenólicos de queijo e pudim adicionados de micropartículas de extrato de própolis, durante a simulação do trato gastrointestinal, onde os primeiros 120 minutos correspondem à fase gástrica (estômago) e dos 180 minutos até os 360 minutos à fase intestinal (intestino delgado). (As barras verticais representam os intervalos de confiança a 95%).

Conforme a Figura 5, a aplicação das micropartículas em queijo Minas Frescal possibilitou a liberação dos compostos fenólicos no fluido gástrico (até 120 minutos) de, em média, 8,28%, 25,70%, 9,45%, 14,39% para as micropartículas com a utilização dos materiais de parede: proteínas de arroz, de ervilha, de soja e de ovoalbumina, respectivamente. Na fase intestinal, a liberação foi de, em média, 28,79%, 80,82%, 28,82% e 43,96%, para as micropartículas com proteínas de arroz, de ervilha, de soja e de ovoalbumina, respectivamente. Portanto, as micropartículas com proteína de ervilha demonstraram o perfil mais adequado de liberação dos compostos fenólicos, pois a maior concentração destes foi liberado nas condições intestinais, alcançando 89,64% de liberação após 300 min da digestão *in vitro*. Esse perfil é considerado ideal devido aos compostos fenólicos serem absorvidos no intestino (JIA et al., 2016). A liberação adequada é fundamental para que ocorra evolução na biodisponibilidade do composto ativo, assegurando que a quantidade ideal seja absorvida no local desejado (JIA et al., 2016). A absorção dos compostos fenólicos ocorre após a hidrólise enzimática no intestino ou pela microflora do cólon (KUCK; WESOLOWSKI; NOREÑA, 2017).

Quando as micropartículas foram aplicadas no pudim, observou-se rápida liberação dos compostos fenólicos durante a fase gástrica (primeiros 120 min). As quantidades liberadas nessa fase foram em média, 39,80%, 51,51%, 26,82% e 49,10%, para micropartículas com proteína de arroz, de ervilha, de soja e de ovoalbumina, respectivamente. Durante a fase intestinal (180 aos 360 min), houve liberação de, em média, de 100%, 86,47%, 55,26% e 91,07%, para micropartículas com proteína de arroz, de ervilha, de soja e de ovoalbumina, respectivamente. Assim, das micropartículas avaliadas para a aplicação no pudim, àquela formada com a proteína de arroz possibilitou a obtenção dos melhores resultados, ocorrendo na fase intestinal 100% de liberação dos compostos fenólicos.

O aquecimento (abaixo de 90 °C) e a agitação empregados no preparo do pudim, além do maior teor de água, proporcionaram maior liberação dos compostos fenólicos nas condições gástricas; porém, também maiores concentrações foram observadas no fluido intestinal. Portanto, com exceção das micropartículas formadas com a proteína de ervilha, para as demais micropartículas a melhor aplicação seria no pudim.

Desta forma, os resultados demonstram que o tipo de processamento e a composição do alimento são fatores decisivos para a melhor aplicação das micropartículas, de forma a afetar a biodisponibilidade dos compostos encapsulados.

3.4. Conclusão

O extrato de própolis apresentou alta concentração de flavonoides, sendo a apigenina o composto majoritário. As micropartículas de extrato de própolis com proteína concentrada de arroz e proteína concentrada de ervilha apresentaram alta eficiência de encapsulação e atividade antioxidante. As técnicas de DSC, ATR-FTIR e difração de raios-X confirmaram a encapsulação. Além disso, maior estabilidade térmica foi observada para as micropartículas produzidas com proteína de ervilha e de soja.

As micropartículas obtidas apresentaram diferentes formas, tamanhos e características da superfície, independente do material de parede utilizado. As micropartículas são adequadas para o armazenamento devido à baixa higroscopicidade (proteína de ervilha) a moderada (proteína de soja e albumina de ovo) e baixa a_w . Maiores precauções devem ser tomadas ao armazenar a micropartícula com proteína concentrada de arroz. As micropartículas produzidas

com proteína de ervilha foram mais adequadas para a produção de queijo Minas Frescal, por apresentarem maior liberação no intestino, enquanto que as outras micropartículas foram mais adequadas para a aplicação em pudim.

Agradecimentos

À CAPES pela concessão da bolsa de doutorado, a FAPERGS pelo apoio financeiro, ao CEME-SUL (FURG) pela análise de MEV e difração de Raios-X e ao Centro de Desenvolvimento e Controle de Biomateriais (CDC-Bio/UFPel) pela análise de ATR-FTIR.

Referências

AHN, M. R.; KUMAZAWA, S.; USUI, Y.; NAKAMURA, J.; MATSUKA, M.; ZHU, F.; NAKAYAMA, T. Antioxidant activity and constituents of propolis collected in various areas of China. **Food Chemistry**, v. 101, p. 1383–1392, 2007.

ALISHAHI, A.; MIRVAGHEFI, A.; TEHRANI, M. R.; FARAHMAND, H.; SHOJAOSADATI, S.A.; DORKOOSH, F.A.; ELSABEE, M. Z. Shelf life and delivery enhancement of vitamin C using chitosan nanoparticles. **Food Chemistry**, v. 126, p. 935–940, 2011.

ALVES, E.; KUBOTA, E. H. Conteúdo de fenólicos, flavonoides totais e atividade antioxidante de amostras de própolis comerciais. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 34, 1, p. 37-41, 2013.

AMAGLIANI, L.; O'REGAN, J.; KELLY, A. L.; O'MAHONY, J. A. Composition and protein profile analysis of rice protein ingredients. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 59, p. 18–26, 2017.

AOAC. Official method of analysis of AOAC International. 16th ed. Virginia, USA: AOAC International, 1995.

BALLESTEROS, L. F.; RAMIREZ, M. J.; ORREGO, C. E.; TEIXEIRA, J. A.; MUSSATTO, S. I. Encapsulation of antioxidant phenolic compounds extracted from spent coffee grounds by freeze-drying and spray-drying using different coating materials. **Food Chemistry**, v. 237, p. 623–631, 2017.

BUSCH, V. M.; PEREYRA-GONZALEZ, A.; SEGATIN, N.; SANTAGAPITA, P. R.; ULRIH N. P.; BUERA, M. P. Propolis encapsulation by spray drying: Characterization and stability. **LWT - Food Science and Technology**, v. 75, p. 227-235, 2017.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. **LWT - Food Science and Technology**, v. 28, p. 25-30, 1995.

BRUSCHI, M. L.; CARDOSO, M. L. C.; LUCCHESI, M. B.; GREMIÃO, M. P. D. Gelatin microparticles containing propolis obtained by spray-drying technique: preparation and characterization. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 264, p. 45–55, 2003.

ÇAM, M.; İÇYER, N. C.; ERDOĞAN, F. Pomegranate peel phenolics: Microencapsulation, storage stability and potential ingredient for functional food development. **LWT - Food Science and Technology**, v. 55, p. 117-123, 2014.

CHOI, K. O.; RYU, J.; KWAK, H. S.; KO, S. Spray-dried conjugated linoleic acid encapsulated with Maillard reaction products of whey proteins and maltodextrin. **Food Science and Biotechnology**, v. 19(4), p. 957–965, 2010.

COSTA, A. M. M.; NUNES, J. C.; LIMA, B. N. B.; PEDROSA, C.; CALADO, V.; TORRES, A. G.; PIERUCCI, A. P. T. R. Effective stabilization of CLA by microencapsulation in pea protein. **Food Chemistry**, v. 168, p. 157–166, 2015.

DONHOWE, E. G.; FLORES, F. P.; KERR, W. L.; WICKER, L.; KONG, F. Characterization and in vitro bioavailability of b-carotene: Effects of microencapsulation method and food matrix. **LWT - Food Science and Technology**, v. 57, p. 42-48, 2014.

DURÁN, N.; MARCATO, P. D.; BUFFO, C. M. S.; AZEVEDO, M. M. M. DE; ESPOSITO, E. Poly(ϵ -caprolactone)/propolis extract: microencapsulation and antibacterial activity evaluation. **Pharmazie**, v. 62, p. 287–290, 2007.

ELBAZ, N. M.; KHALIL, I. A.; ABD-RABOU, A. A.; EL-SHERBINY, I. M. Chitosan-based nano-in-microparticle carriers for enhanced oral delivery and anticancer activity of própolis. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 92, p. 254–269, 2016.

FANG, Z.; BHANDARI, B. Comparing the efficiency of protein and maltodextrin on spray drying of bayberry juice. **Food Research International**, v. 48, p. 478–483, 2012.

GHORBANZADE, T.; JAFARI, S. M.; AKHAVAN, S.; HADAVI, R. Nano-encapsulation of fish oil in nano-liposomes and its application in fortification of yogurt. **Food Chemistry**, v. 216, p. 146–152, 2017.

GRAIKOU, K.; POPOVA, M.; GORTZI, O.; BANKOVA, V.; CHINOUE, I. Characterization and biological evaluation of selected Mediterranean propolis samples. Is it a new type? **LWT - Food Science and Technology**, v. 65, p. 261–267, 2016.

HOFFMANN, J. F.; ZANDONÁ, G. P.; SANTOS, P. S. DOS; DALLMANN, C. M.; MADRUGA, F. B.; ROMBALDI, C. V.; CHAVES, F. C. Stability of bioactive compounds in butiá (*Butia odorata*) fruit pulp and nectar. **Food Chemistry**, v. 237, p. 638–644, 2017.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e estatística. Apicultura, 2013. [online] Disponível na internet via WWW URL: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/pesquisas/sintese.php> Acesso em 22 de agosto de 2016.

JIA, Z.; DUMONT, M-J.; ORSAT, V. Encapsulation of phenolic compounds present in plants using protein matrices. **Food Bioscience**, v. 15, p. 87–104, 2016.

JOYE, I. J.; MCCLEMENTS, D. J. Biopolymer-based nanoparticles and microparticles: fabrication, characterization, and application. **Current Opinion in Colloid Interface Science**, v. 19, n. 5, p. 417–427, 2014.

KUCK, L. S.; NOREÑA, C. P. Z. Microencapsulation of grape (*Vitis labrusca* var. Bordo) skin phenolic extract using gum Arabic, polydextrose, and partially hydrolyzed guar gum as encapsulating agents. **Food Chemistry**, v. 194, p. 569–576, 2016.

KUCK, L. S.; WESOLOWSKI, J. L.; NOREÑA, C. P. Z. Effect of temperature and relative humidity on stability following simulated gastro-intestinal digestion of microcapsules of Bordo grape skin phenolic extract produced with different carrier agents. **Food Chemistry**, v. 230, p. 257–264, 2017.

MALHEIROS, P. DA S.; SANT'ANNA, V.; BARBOSA, M. DE S.; BRANDELLI, A.; FRANCO, B. D. G. DE M. Effect of liposome-encapsulated nisin and bacteriocin-like

substance P34 on *Listeria monocytogenes* growth in Minas frescal cheese. **International Journal of Food Microbiology**, v. 156, p. 272–277, 2012.

MARUF, A.; MST. S. A.; JIN-CHEOL L.; JONG-BANG, E. Encapsulation by spray drying of bioactive components, physicochemical and morphological properties from purple sweet potato. **LWT - Food Science and Technology**, v. 43, p. 1307-1312, 2010.

MASCHERONI, E.; FIGOLI, A.; MUSATTI, A.; LIMBO, S.; DRIOLI, E.; SUEVO, R.; TALARICO, S.; ROLLINI, M. An alternative encapsulation approach for production of active chitosan–propolis beads. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 49, p. 1401–1407, 2014.

MOSER, P.; TELIS, V. R. N.; NEVES, N. DE A.; GARCÍA-ROMERO, E.; GÓMEZ-ALONSO, S.; HERMOSÍN-GUTIÉRREZ, I. Storage stability of phenolic compounds in powdered BRS Violeta grape juice microencapsulated with protein and maltodextrin blends. **Food Chemistry**, v. 214, p. 308–318, 2017.

NESTERENKO, A.; ALRIC, I.; SILVESTRE, F.; DURRIEU, V. Review. Vegetable proteins in microencapsulation: A review of recent interventions and their effectiveness. **Industrial Crops and Products**, v. 42, p. 469– 479, 2013.

NORI, M. P.; FAVARO-TRINDADE, C. S.; ALENCAR, S. M.; THOMAZINI, M., BALIEIRO, J. C. C.; CASTILLO, C. J. C. Microencapsulation of propolis extract by complex coacervation. **LWT- Food Science Technology**, v. 44, p. 429–435, 2011.

PIERUCCI, P. T. R.; ANDRADE, L. R.; FARINA, M.; PEDROSA, C.; ROCHA-LEÃO, M. H. M. Comparison of α -tocopherol microparticles produced with different wall materials: pea protein a new interesting alternative. **Journal of Microencapsulation**, v. 24(3): p. 201–213, 2007.

RAY, S.; RAYCHAUDHURI, U.; CHAKRABORTY, R. An overview of encapsulation of active compounds used in food Products by drying technology. **Food Bioscience**, v. 13, p. 76–83, 2016.

Dos REIS, A. S. DOS; DIEDRICH, C.; MOURA, C. DE; PEREIRA, D.; ALMEIDA, J. DE F.; SILVA, L. D. DA; PLATA-OVIEDO, M. S. V.; TAVARES, R. A. W., CARPES, S. T. Physico-chemical characteristics of microencapsulated propolis co-product extract and its effect on storage stability of burger meat during storage at 15 °C. **LWT - Food Science and Technology**, v. 76 p. 306-313, 2017.

SHANG-JUNG, Y.; JIA-JIUAN, W.; YUAN-CHUEN, W.; CHIH-FENG, H.; TZONG-MING, W.; CHWEN-JEN, S.; CHIEH-MING, J. C. Encapsulation of propolis flavonoids in a water soluble polymer using pressurized carbon dioxide anti-solvent crystallization. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 94, p.138–146, 2014.

SILVA, F. C. DA; FONSECA, C. R. DA; ALENCAR, S. M. DE; THOMAZINI, M.; BALIEIRO, J. C. DE C.; PITTIA, P.; FAVARO-TRINDADE, C. S. Assessment of production efficiency, physicochemical properties and storage stability of spray-dried propolis, a natural food additive, using gum Arabic and OSA starch-based carrier systems. **Food and Bioproducts Processing**, v. 91, p. 28–36, 2013.

SILVA, J. C.; RODRIGUES, S.; FEÁS, X.; ESTEVINHO, L. M. Antimicrobial activity, phenolic profile and role in the inflammation of propolis. **Food and Chemical Toxicology**, v. 50, p. 1790–1795, 2012.

SIRIPATRAWAN, U.; VITCHAYAKITTI, W. Improving functional properties of chitosan films as active food packaging by incorporating with propolis. **Food Hydrocolloids**, v. 61, p. 695-702, 2016.

SPINELLI, S.; CONTE, A.; LECCE, L.; INCORONATO, A. L.; NOBILE, A. D. M. Microencapsulated propolis to enhance the antioxidant properties of fresh fish burgers. **Journal of Food Process Engineering**, v. 38, p. 527–535, 2015.

STONE, A. K.; KARALASH A.; TYLER, R. T.; WARKENTIN, T. D.; NICKERSON, M. T. Functional attributes of pea protein isolates prepared using different extraction methods and cultivars. **Food Research International**, v. 76, p. 31–38, 2015.

TARHINIA, M.; GREIGE-GERGES, H.; ELAISSARIA, A. Review. Protein-based nanoparticles: From preparation to encapsulation of active molecules. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 522, p. 172–197, 2017.

VISENTINI, F. F.; SPONTON, O. E.; PEREZ, A. A.; SANTIAGO, L. G. Formation and colloidal stability of ovalbumin-retinol nanocomplexes. **Food Hydrocolloids**, v. 67, p. 130-138, 2017.

4 Capítulo 2: Produção de micropartículas de própolis revestidas com proteína de ervilha: caracterização e avaliação das atividades antioxidante e antimicrobiana

Resumo: A própolis possui alto teor de compostos bioativos, o que lhe confere atividades antioxidante e antimicrobiana. Entretanto, a utilização da própolis em alimentos é limitada pela sensibilidade desses compostos as condições de processamento e além disto, seu sabor e odor são demasiadamente intensos. Assim, a microencapsulação pode proteger os compostos bioativos e facilitar a aplicação da própolis em alimentos por mascarar atributos sensoriais negativos. Objetivou-se com este estudo produzir micropartículas, pelo método de *spray drying*, utilizando diferentes concentrações de extrato de própolis (EP) e da proteína de ervilha (PCE) como material de parede. Após, realizou-se a avaliação das atividades antioxidante (FRAP) e antimicrobiana das micropartículas contra bactérias patogênicas. A melhor concentração de EP foi de 5% (p/v) e de PCE foi de 2% (p/v), apresentando a maior eficiência de encapsulação, maior atividade antioxidante e melhor rendimento. O aumento na concentração do EP e da PCE nas micropartículas não influenciou na morfologia das micropartículas, as quais apresentaram superfície arredondada com dobras e concavidades. As técnicas ATR-FTIR e difração de Raios-X demonstraram que a microencapsulação com a PCE possibilitou a proteção do EP. O EP apresentou atividade antimicrobiana frente a bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. As micropartículas onde foram utilizados 2,5% de EP e 2% de PCE, bem como onde utilizou-se 5% de EP e 2% de PCE, apresentaram efeito bacteriostático, e mesmo bactericida, contra *Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes*. Verificou-se que as micropartículas utilizando PCE como material de parede e própolis como componente bioativo, apresentam potencial para serem utilizadas como ingrediente em alimentos.

Palavras-chave: Compostos fenólicos, extrato de própolis, *spray drying*, atividade antioxidante, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*.

4.1. Introdução

A própolis é uma substância resinosa formada por gomas e materiais balsâmicos coletados pelas abelhas a partir de partes de plantas, flores e pólen. Em função da presença de compostos bioativos, apresenta importantes atividades biológicas como propriedades antioxidantes, antimicrobianas, antivirais, antitumorais, anti-inflamatórias e anticancerígenas (FALCÃO et al., 2010; TIVERON et al., 2016; ANDRADE et al., 2017; ZANCANELA et al., 2017).

Compostos fenólicos, flavonoides e ácidos aromáticos são os compostos bioativos de maior relevância na própolis. Além desses, a própolis também

apresenta em sua composição os terpenoides, esteroides, carboidratos simples, aminoácidos, vitaminas e minerais (ANDRADE et al., 2017).

A própolis apresenta importante atividade antioxidante, sendo capaz de proteger o corpo humano de danos celulares causados pelos radicais livres, reduzindo a frequência de reações químicas oxidativas (Do NASCIMENTO et al., 2016; ANDRADE et al., 2017). Além disso, a própolis tem sido avaliada por demonstrar atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, uma propriedade importante para ser utilizada como um conservante em alimentos (SILICI; KUTLUCA, 2005; TIVERON et al., 2016; ALMEIDA et al., 2017). Entretanto, a utilização direta da própolis em alimentos tem como grande limitação seu sabor e odor indesejáveis, assim, a encapsulação é uma alternativa para reduzir os efeitos sensoriais negativos e possibilitar a sua utilização como ingrediente alimentar. Porém, estudos têm demonstrado que a encapsulação da própolis pode alterar suas características antimicrobianas e antioxidantes, em função do tipo de material de parede e da concentração da própolis nas microcápsulas (BRUSCHI et al., 2003; NORI et al., 2011; MASCHERONI et al., 2014; ALMEIDA et al., 2017).

Proteínas obtidas a partir de fontes vegetais representam um crescente mercado para a indústria alimentar devido às preferências dos consumidores por produtos de baixa alergenicidade, de alto valor nutricional, que atuam na redução da ocorrência de várias doenças (câncer de cólon, diabetes tipo 2, colesterol LDL e doenças cardíacas) (ROY; BOYE; SIMPSON, 2010; STONE et al., 2015).

A ervilha (*Pisum sativum* L.) contém entre 20-30% de proteína, sendo principalmente albuminas (18-25%) e globulinas (55-80%) (STONE et al., 2015). As globulinas possuem, geralmente, elevadas quantidades de arginina, fenilalanina, leucina e isoleucina, enquanto que a fração de albumina apresenta maiores quantidades de triptofano, lisina e treonina (STONE et al., 2015). Devido ao seu baixo custo, ampla disponibilidade, e excelente perfil de aminoácidos, o uso da proteína de ervilha vem sendo explorado em bebidas à base de leite e em formulações de alimentos diversos (CUEVAS-BERNARDINO et al., 2018). A proteína de ervilha também foi utilizada na microencapsulação de ácido ascórbico (PIERUCCI et al., 2006), de α -tocoferol (PIERUCCI et al., 2007) e de ácido linoleico conjugado (CLA) (COSTA et al., 2015), apresentando resultados eficazes.

Assim, este estudo tem como objetivo avaliar a influência de diferentes concentrações de extrato de própolis, bem como de material de parede proteína

concentrada de ervilha) sobre a atividade antioxidante e antimicrobiana das micropartículas produzidas por *spray drying*.

4.2. Material e métodos

4.2.1. Material

A amostra de própolis foi coletada em novembro de 2015, na cidade de Rio Grande – RS, Brasil (latitude: 32°02'06.2"S e longitude: 52°05'56.4"W). A proteína concentrada de ervilha (PCE) (73%) (Growth Supplements, Brasil) foi utilizada como material encapsulante. O manitol P.A. (Synth, Brazil) foi utilizado com o objetivo de aumentar o rendimento do processo no *spray drying*. Para a determinação da atividade antioxidante foram utilizados: ácido 2-carboxílico-6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano (Trolox) (Sigma-Aldrich®, EUA) e 2,4,6-tripiridil-1,3,5-triazina (TPTZ) (Fluka®, Brasil). Os meios de cultura utilizados na avaliação da atividade antimicrobiana foram caldo Mueller Hinton (MH) (Difco®, Alemanha), Agar tripton de soja (TSA) (Kasvi®, Brasil) e extrato de levedura (YE) (Himedia®, França).

4.2.2. Obtenção do extrato de própolis

O extrato própolis (EP) foi preparado como descrito por Silva et al. (2012), com algumas modificações. A própolis foi triturada em moinho de bola (Marconi 350, Brasil), e 10 g foram homogeneizadas com 100 mL de álcool etílico (80%) para a obtenção de extrato com 0,1 g mL⁻¹ de sólidos, em agitador incubador (Quimis 255, Brasil), na temperatura ambiente por 24 h e, após, o EP foi filtrado em papel filtro Whatman No. 1. O sobrenadante foi mantido sob refrigeração e centrifugado a cada 24 h (Eppendorf 5430 R, Alemanha) a 260 g, 5 °C, 15 min por 3 dias consecutivos, para a eliminação da cera presente na própolis. Os filtrados foram submetidos a evaporador rotativo (Laborota 4000, Alemanha) sob pressão reduzida a 40 °C, e, em seguida, liofilizados (Liobras L101, Brasil), obtendo assim o extrato de própolis liofilizado (EPL). O EPL apresentou 13 compostos fenólicos, totalizando 22,10 mg de compostos fenólicos por g⁻¹ de EPL, pela soma de todos os compostos identificados por LC-ESI-qTOF-MS, sendo os flavonoides apigenina (9,21 mg g⁻¹) e luteolina (4,00 mg g⁻¹) encontrados em maiores concentrações (dados não mostrados).

4.2.3. *Preparo das soluções com proteína concentrada de ervilha (PCE)*

Foram preparadas soluções de 2, 4 e 6% (p/v) de PCE em água destilada aquecida a 50 °C, como descrito por Costa et al. (2015). As soluções foram mantidas sob agitação durante 1 h, e após, submetidas ao banho de ultrassom (Quimis Q335D Brasil) por 30 min.

Após o preparo da PCE, foram adicionados três concentrações de EP (1,0, 2,5 e 5,0% v/v) para cada solução proteica, totalizando nove formulações.

4.2.4. *Produção de micropartículas de própolis (MP) por spray drying*

As nove formulações preparadas para encapsular EP em três concentrações (1,0, 2,5 e 5,0% v/v), utilizando diferentes concentrações proteicas (2, 4, e 6% p/v) como material encapsulante (Tabela 1) foram homogeneizadas (Turratec, T2-102, Brasil) durante 2 min a 14000 rpm. Após, foi adicionado o manitol (20% p/p em relação ao peso da PCE). Como controle, foram preparadas micropartículas vazias (MV) somente com as soluções proteicas (2, 4 e 6%) e o manitol, sem a adição do material a ser encapsulado (EP).

As formulações de MP e MV foram atomizadas em *spray drying* (Labmaq MSDi 1.0, Brasil), nas seguintes condições operacionais: temperatura de entrada de 120 °C; temperatura de saída de 72 ± 3 °C; fluxo de ar de 40 L h⁻¹; taxa de alimentação de 40 L h⁻¹ e diâmetro do bico de 3 mm. Ao final de cada secagem, o pó resultante foi acondicionado em frasco plástico de polipropileno e mantido congelado ($-18 \text{ °C} \pm 2 \text{ °C}$) até a realização das análises.

4.2.5. *Viscosidade*

A viscosidade foi medida utilizando um reômetro (Brookfield RS-CPS, EUA) em todas as soluções de PCE e EP (após 24h do preparo e armazenamento a 6 ± 2 °C, antes da passagem no *spray drying*). Foi utilizado sistema cilindro coaxial (spindle RC3-50) e taxa de cisalhamento na faixa de 5-100 s⁻¹. Todas as medidas foram realizadas a 25 °C.

4.2.6. Determinação do total de compostos fenólicos (TCF) e Eficiência de encapsulação (EE)

Primeiramente, 50 mg de micropartículas foram misturadas com 10 mL de álcool etílico P.A. para a lavagem dos compostos fenólicos não encapsulados, e após foi realizada a centrifugação (Eppendorf 5430 R, Alemanha) a 4200 g por 15 min, a 25 °C, conforme descrito por Ghorbanzade et al. (2017). Após a separação das fases, 1 mL do sobrenadante foi coletado para proceder a análise de compostos fenólicos. Os 9 mL restantes foram sonicados (Unique, 1400A, Brasil) por 10 min, homogeneizados em homogeneizador (Turrtec, T2-102, Brasil) por 1 min a 12000 rpm e mantidos sob agitação por 24 h, a 25 °C em banho com água, para que houvesse a ruptura e liberação dos compostos de interesse das micropartículas.

Para a determinação dos compostos fenólicos no EP foi utilizado o método de Folin-Ciocalteu (SINGLETON et al., 1999). Para isto, 0,5 mL das amostras (EP diluído 1:50 v/v, na concentração de 0,4 mg mL⁻¹) foram adicionadas a 2,5 mL de reagente de Folin-Ciocalteu 0,2 M, e após 5 min a adição de 2 mL de solução de carbonato de sódio (7,5%). A leitura da absorbância foi realizada após 2 h a 725 nm em espectrofotômetro (JENWAY 6705 UV/Vis, Espanha). A quantificação foi realizada a partir de uma curva padrão de ácido gálico nas concentrações de 30 a 500 µg mL⁻¹ ($y=0,014x + 0,0169$, $R^2=0,999$). Os resultados foram expressos em mg equivalentes de ácido gálico por grama de amostra (mg EAG g⁻¹) em peso seco, sendo a análise realizada em triplicata.

A eficiência de encapsulação foi calculada conforme descrito por Alishahi et al. (2011), de acordo com a equação 1. Os resultados foram expressos em porcentagem de compostos fenólicos microencapsulados:

$$EE (\%) = \frac{(TCF)-(CFS)}{TCF} \times 100 \quad \text{eq. 1}$$

Em que, TCF corresponde ao total de compostos fenólicos da micropartícula, estando por dentro ou por fora; e CFS corresponde aos compostos fenólicos na superfície, ou seja, por fora da micropartícula.

4.2.7. Capacidade antioxidante por FRAP

A capacidade redutora de ferro (FRAP) foi determinada de acordo com o método descrito por da Silva et al. (2013), com algumas modificações. O reagente FRAP (solução complexante de Fe^{3+}) foi preparado na proporção 1:1:10 com solução de TPTZ 10 mM, solução de cloreto férrico 20 mM e solução tampão de acetato de sódio 0,25 M, pH = 3,5, respectivamente. Foram homogeneizados 100 μL do EP (1 mg mL^{-1}) ou MP (50 mg) em 300 μL de água e 3,0 mL do reagente FRAP, após foi mantido em banho-maria a 37 °C por 30 min. As MV também foram analisadas e sua absorbância foi subtraída dos valores obtidos para as MP. A redução do complexo de Fe^{3+} para Fe^{2+} foi verificada através da leitura da absorbância no comprimento de onda a 595 nm em espectrofotômetro (JENWAY 6705 UV/Vis, Espanha). A quantificação foi baseada em uma curva de calibração obtida usando com Trolox ($y = 0,0016x + 0,2025$ $R^2 = 0,9954$), e os resultados foram expressos como μmol equivalentes de Trolox (TE) por g de amostra em peso seco.

4.2.8. Rendimento (R)

O conteúdo sólido (em g) do material de parede (SMP) e de sólidos do manitol (SM) adicionado durante a elaboração das micropartículas foi utilizado para calcular o R (ÇAM et al., 2014). Os resultados foram expressos em porcentagem de R das micropartículas.

$$R (\%) = \frac{PM}{SMP+SM} \times 100 \quad \text{eq. 2}$$

Onde PM corresponde ao peso das micropartículas obtidas.

4.2.9. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A morfologia das micropartículas foi examinada por MEV (JEOL JSM-6060 LV, Japão), conforme Elbaz et al. (2016). Uma pequena quantidade de cada amostra foi espalhada em suporte metálico com fita de carbono. Subsequentemente, todas as amostras foram revestidas com ouro e examinadas sob uma voltagem de aceleração de 15 kV e ampliação de 3000 x.

4.2.10. Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

A análise de FTIR foi realizada em conjunto com a Reflexão total atenuada (ATR), onde não é necessária nenhuma preparação adicional das amostras, as quais foram examinadas diretamente no estado sólido. Foram analisados o EP, as MP e as MV para a avaliação dos grupamentos funcionais em espectrômetro FTIR IRAffinity-1 (Shimadzu, Japão), na resolução de $4000 - 1000 \text{ cm}^{-1}$, com 60 varreduras e, posteriormente, tratados no programa IRSolution.

4.2.11. Difração de Raios-X

O EPL, as MP e as MV foram analisados usando um difratômetro de Raios-X (Bruker D-8 Advance, Billerica, EUA), sob radiação monocromática de Cu ($\lambda = 1,5418 \text{ \AA}$), alimentado a 40 kV e 40 mA. Os dados de difração foram coletados em temperatura ambiente, sob o ângulo 2θ variando de 1 a 90° , com intervalos de $0,05^\circ$ a cada 1 s.

4.2.12. Atividade antimicrobiana do extrato de própolis e das micropartículas

Para avaliar a atividade antimicrobiana do EPL e das MP, foram testadas 4 bactérias, sendo duas Gram-positivas (*S. aureus* ATCC 25923 e *L. monocytogenes* ATCC 7644) e duas Gram-negativas (*Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 e *Escherichia coli* O157:H7 NCTC 12900). Para a execução dos experimentos as cepas padrão, congeladas a -80°C em TSB-YE com crioprotetor foram repicadas em triplicata para TSA-YE e incubadas a 37°C por 24 h.

4.2.12.1. Concentração mínima inibitória (CIM)

A CIM do EPL e das MP foi determinada pelo ensaio de microdiluição em placa, adaptado de Almeida et al. (2017). O EPL (100 mg) foi dissolvido em 1 mL de dimetilsulfóxido (DMSO) e as MP (tratamentos 1 a 6) que apresentaram os melhores resultados de EE e R, foram preparadas na mesma concentração, porém, dissolvidas em 1 mL de caldo MH. A diluição em série (1:1) das soluções de EPL e das MP, previamente solubilizadas em DMSO e em caldo MH, foi realizada em microplacas de 96 poços, utilizando o caldo MH até obter concentrações de 0,625, 1,25, 2,5, 5, 10, 20, 40, 80 mg mL^{-1} .

Trinta microlitros da suspensão celular bacteriana padronizada na escala 0,5 de McFarland ($1,5 \times 10^8 \text{ UFC mL}^{-1}$) foram adicionados aos poços contendo 100 μL de

caldo MH. As microplacas foram incubadas a 37 °C por 24 h. Após, houve a adição de 40 µL de solução de resazurina (100 µg mL⁻¹) e então foram re-incubadas a 37 °C durante 2 h. A CIM foi definida como a menor concentração que inibiu a multiplicação bacteriana.

4.2.12.2. Concentração bactericida mínima (CBM)

A CBM foi determinada inoculando-se alíquotas de 100 µL de cada poço da microplaca onde houve inibição no teste de CIM para placas de Petri contendo TSA-YE, e incubando-se a 37 °C por 24 h. A CBM foi considerada como a menor concentração na qual 99,9% das células inoculadas inicialmente foram mortas.

4.2.13. Análise estatística

As avaliações foram realizadas em triplicata, sendo os resultados expressos em médias ± desvio padrão. Foi realizada análise de variância e o teste de Tukey ($p \leq 0,05$) usando SAS 9.1 (Cary, NC), para a comparação dos resultados dos materiais de parede quanto à EE e a atividade antioxidante.

4.3. Resultados e discussão

4.3.1. Viscosidade das formulações de proteína concentrada de ervilha com extrato de própolis

Na Figura 1 estão apresentadas as curvas de viscosidade das nove formulações de PCE e EP utilizadas para a produção das micropartículas no *spray drying*. Para todas as formulações a viscosidade diminui com o aumento da taxa de cisalhamento. O comportamento das soluções foi pseudoplástico, sendo que a partir da taxa de cisalhamento de 40 s⁻¹, os valores foram semelhantes, independente da formulação. Comportamento semelhante foi observado por Bajaj, Tang e Sablani (2015) ao analisarem emulsões contendo óleo de linhaça e diferentes isolados de proteína de ervilha.

Assim, as diferentes concentrações de PCE e de EP não influenciaram nos resultados de viscosidade. Segundo Premi e Sharma (2017), a viscosidade das soluções é um parâmetro importante na formação de micropartículas por atomização, pois pode afetar o seu tamanho.

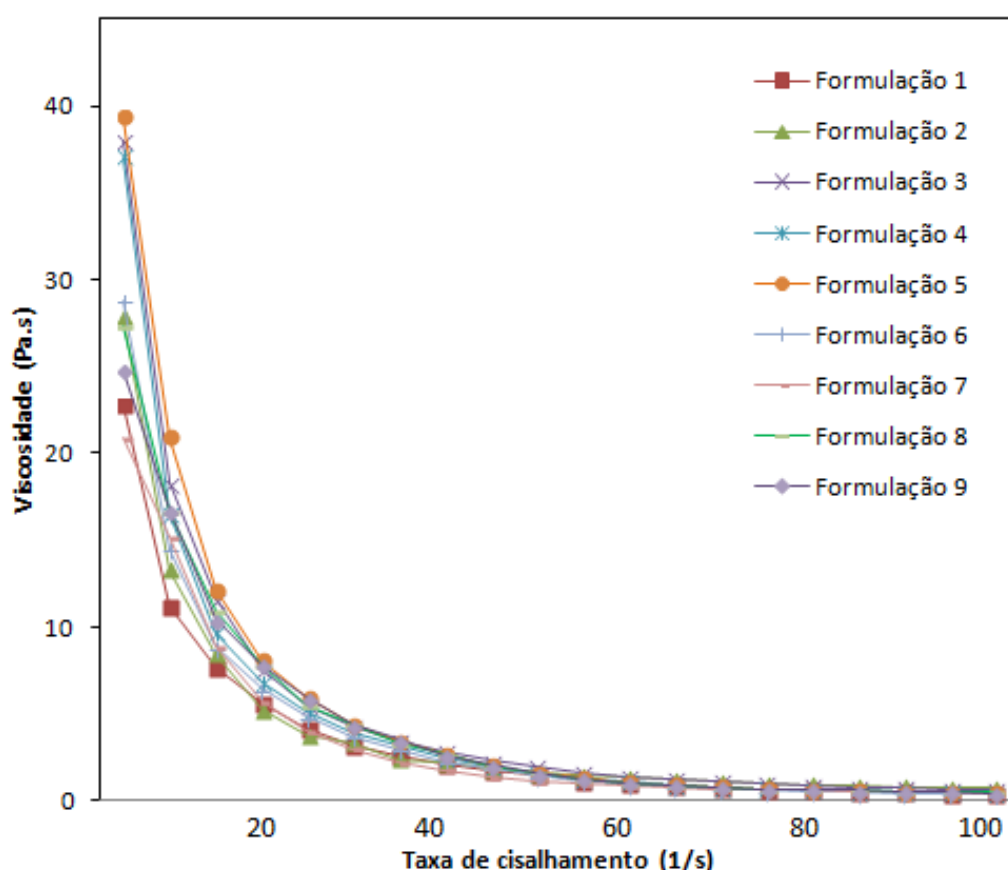


Figura 1. Curvas de viscosidade das soluções de proteína concentrada de ervilha e extrato de própolis a 25 ° C.

Formulação 1: 1% de extrato de própolis (EP) e 2% de proteína concentrada de ervilha (PCE); Formulação 2: 2,5% de EP e 2% de PCE; Formulação 3: 5% de EP e 2% de PCE; Formulação 4: 1% de EP e 4% de PCE; Formulação 5: 2,5% de EP e 4% de PCE; Formulação 6: 5% de EP e 4% de PCE; Formulação 7: 1% de EP e 6% de PCE; Formulação 8: 2,5% de EP e 6% de PCE; Formulação 9: 5% de EP e 6% de PCE.

4.3.2. Eficiência de encapsulação

Observou-se que o incremento na concentração do EP proporcionou aumento significativo da EE (Tabela 1). Porém, foi obtido um aumento significativo da EE com a utilização de até 4% de PCE, sendo observada uma redução na EE com a utilização de concentração de PCE superior. As maiores eficiências foram observadas com a utilização de 5% de EP e 2 ou 4% de PCE.

Tabela 1. Eficiência de encapsulação (EE), capacidade de redução férrica (FRAP) e rendimento (R) das micropartículas de extrato de própolis (EP) com proteína concentrada de ervilha (PCE), em diferentes concentrações

	Tratamentos		EE (%)	FRAP ($\mu\text{mol TE g}^{-1}$)	R (%)
	PCE (%)	EP (%)			
1	2	1	73,55 $\pm$ 4,21 ^d	46,47 $\pm$ 7,05 ^{ef}	54,00
2	2	2,5	77,95 $\pm$ 1,76 ^{cd}	75,01 $\pm$ 2,15 ^{bc}	38,46
3	2	5	97,00 $\pm$ 0,18 ^a	129,31 $\pm$ 2,79 ^a	36,51
4	4	1	80,98 $\pm$ 1,60 ^c	34,14 $\pm$ 5,38 ^f	25,32
5	4	2,5	87,28 $\pm$ 1,87 ^b	54,08 $\pm$ 3,37 ^{de}	22,67
6	4	5	95,28 $\pm$ 0,93 ^a	83,12 $\pm$ 1,47 ^b	27,58
7	6	1	49,40 $\pm$ 0,83 ^f	39,72 $\pm$ 5,62 ^f	22,35
8	6	2,5	65,53 $\pm$ 2,39 ^e	64,92 $\pm$ 0,95 ^{cd}	20,57
9	6	5	73,81 $\pm$ 3,03 ^d	71,90 $\pm$ 5,41 ^{bc}	18,82

Médias acompanhadas por mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). Média de três repetições $\pm$ desvio padrão. mg EAG g^{-1} = miligrama equivalente de ácido gálico por grama de amostra seca. $\mu\text{mol TE g}^{-1}$ = micrograma equivalente de trolox por grama de amostra seca.

Possivelmente, a menor EE observada quando utilizado 6% de proteína ocorreu em função da degradação dos compostos fenólicos. Conforme relatado por Moser et al. (2017), altas concentrações de proteínas formam películas no interior do *spray drying*, o que acaba aumentando o tempo de exposição das micropartículas no interior do equipamento. O maior período de exposição à alta temperatura do *spray drying* resulta em perdas de compostos instáveis a altas temperaturas, como os compostos fenólicos.

A proteína de ervilha já foi empregada na microencapsulação de óleos e apresentou resultados satisfatórios. Tamm et al. (2016) obtiveram resultado semelhante de EE (94,47%) ao microencapsular óleo de canola utilizando 2% de proteína isolada de ervilha por *spray drying*. Gharsallaoui et al. (2012) utilizaram proteína isolada de ervilha e amido hidrolisado na encapsulação óleo, e relataram alta EE (84,95%) das emulsões após a secagem por *spray drying*.

4.3.3. Capacidade antioxidante

O EP apresentou alta capacidade antioxidante (815,75 $\mu\text{mol TE g}^{-1}$), o que era esperado devido a relatos prévios na literatura. Andrade et al. (2017) analisaram a atividade antioxidante de amostras de própolis marrom, verde e vermelha

provenientes do Brasil, e encontraram valores inferiores aos obtidos neste estudo, de 471,51; 604, 20 e 633,18 $\mu\text{mol TE g}^{-1}$, respectivamente, pelo método de FRAP.

Comportamento semelhante ao obtido para a EE foi observado para a atividade antioxidante, ou seja, o aumento na concentração do EP propiciou o aumento significativo da atividade antioxidante. De uma forma geral, o aumento da concentração da PCE esteve associado à redução da atividade antioxidante, sendo obtido a maior atividade antioxidante utilizando 2% de material de parede (129,31 $\mu\text{mol TE g}^{-1}$).

As micropartículas apresentaram diminuição na atividade antioxidante, em relação ao EP, o que pode ser atribuído a menor concentração do EP nas micropartículas, levando a menores teores de compostos fenólicos. Além disso, o processo de encapsulação por *spray drying* inferiu na degradação de parte dos compostos fenólicos responsáveis pela atividade antioxidante do EP. Resultado semelhante foi obtido por Do Nascimento et al. (2016), os quais observaram que houve redução na atividade antioxidante de nanopartículas de extrato de própolis vermelha (EPV) revestidas com policaprolactona, de 76,22 a 81,40% percentual de inibição do DPPH, quando comparadas ao EPV que era de 98%.

4.3.4. Rendimento

Não foi constatada relação direta entre rendimento (R) e concentração do EP (Tabela 1), no entanto, o aumento da concentração do material de parede ocasionou uma redução do rendimento. A utilização de 2% de proteína proporcionou a obtenção dos maiores valores de rendimento. As formulações com baixas concentrações do material de parede (tratamentos 1, 2 e 3), levaram à menor concentração de micropartículas por mililitro em relação aos demais tratamentos, o que pode explicar a baixa aderência do pó às paredes do equipamento durante a secagem, contribuindo para o maior R dessas micropartículas.

Baixos valores de R também foram relatados por outros autores ao utilizarem proteínas por *spray drying* para a encapsulação de compostos (BRUSCHI et al., 2003; PEANPARKDEE et al., 2016). Esse comportamento pode ser ocasionado pela adesão das micropartículas no atomizador do *spray drying* (NESTERENKO et al., 2013), o que segundo Moser et al. (2017), aumenta conforme o aumento da concentração de proteína utilizada.

4.3.5. Morfologia

Observou-se que, independente do tratamento, houve a formação de micropartículas com superfície externa arredondada, com a presença de dobras e concavidades e de distintos tamanhos (Figura 2). O aspecto de dobras na superfície é atribuído à rápida evaporação da água da solução líquida durante o processo de secagem no atomizador, o que proporciona o encolhimento durante a secagem e posterior resfriamento das partículas (ROCHA; FÁVARO-TRINDADE; GROSSO, 2012). Imagens semelhantes foram demonstradas por outros autores que utilizaram *spray drying* na elaboração de micropartículas (BRUSCHI et al., 2003; PIERUCCI et al., 2007; ROCHA et al., 2012; BOTREL et al., 2014; COSTA et al., 2015).

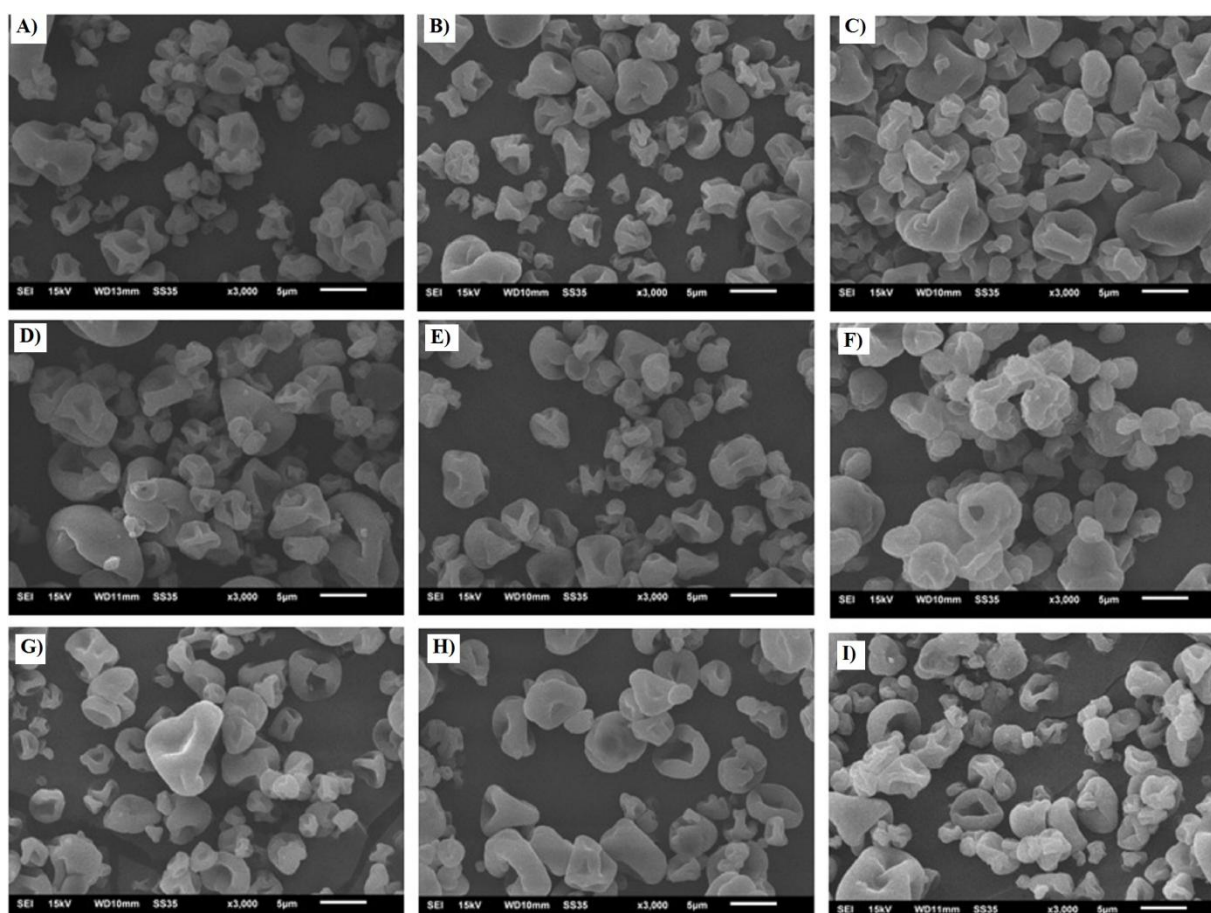


Figura 2. Morfologia de micropartículas com diferentes concentrações de extrato de própolis (EP) e de proteína concentrada de ervilha (PCE): A) 1% de EP e 2% de PCE e; B) 2,5% de EP e 2% de PCE; C) 5% de EP e 2% de PCE; D) 1% de EP e 4% de PCE; E) 2,5% de EP e 4% de PCE; F) 5% de EP e 4% de PCE; G) 1% de EP e 6% de PCE; H) 2,5% de EP e 6% de PCE; I) 5% de EP e 6% de PCE. (ampliação de 3 000 ×)

Não houve influência das diferentes concentrações de extratos de própolis e de proteína concentrada de ervilha na morfologia das MP obtidas por *spray drying*, ou seja, a concentração do material de parede e do composto encapsulado não

proporcionaram alteração na morfologia das micropartículas. Os resultados de viscosidade das formulações corroboram para este resultado, visto que foram semelhantes. Segundo Masters (1991), o tamanho da gota atomizada varia diretamente com a viscosidade do líquido, a uma velocidade de atomização constante, ocorrendo formação de partículas maiores na medida em que aumenta a viscosidade da solução durante a atomização.

Em outros trabalhos também foram descritos resultados semelhantes, como de Rocha et al. (2012), os quais avaliaram a morfologia de microcápsulas obtidas com diferentes concentrações de licopeno utilizando amido modificado (Capsul) como material de parede, através de *spray drying*, e verificaram que a concentração do núcleo das microcápsulas não interferiu na sua morfologia, que apresentaram superfície externa arredondada com a formação de concavidades e tamanhos variados. Ortiz et al. (2009) também observaram, por meio de secagem por atomização, que a concentração do hidrolisado de caseína não interferiu na morfologia das partículas em que a proteína isolada de soja foi utilizada como material de parede.

Nenhuma das micropartículas obtidas neste estudo apresentaram fissuras ou poros, o que é relevante para uma proteção adequada, garantindo a retenção do agente encapsulado.

4.3.6. Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier

Os resultados das análises de ATR-FTIR do EPL, das MP e das MV são demonstrados na Figura 3, abrangendo os números de onda de 4000-400 cm^{-1} .

Nos espectros de EPL, a banda na região de 3450 - 3100 cm^{-1} corresponde a vibração de estiramento -OH. Bandas que absorvem em 1750 -1688 cm^{-1} são atribuídas ao alongamento da vibração de CO de flavonoides e lipídios; e em 1688 - 1600 cm^{-1} e 1504 cm^{-1} correspondentes ao estiramento do anel aromático, assim como as bandas em 1504 - 1360 cm^{-1} correspondem ao C = C do anel aromático. Bandas em cerca de 1400 - 1000 cm^{-1} são atribuídas às vibrações de alongamento C-O-C.

Espectros semelhantes têm sido relatados para o EP com absorção em 3430 cm^{-1} , o que foi atribuído à vibração de alongamento OH do grupamento hidroxila (ELBAZ et al., 2016). Siripatrawan e Vitchayakitti (2016) relataram a presença de bandas de 1800 a 1000 cm^{-1} em EP, devido à presença dos compostos fenólicos,

CO de ésteres, éteres e polióis, e -CC- do anel aromático. Zancanela et al. (2017), analisando o espectro FTIR de EP encontraram bandas características em 1640, 1457, 1252 cm^{-1} , as quais são típicas de anéis aromáticos, poliois e flavonoides, entre outras classes de compostos. As bandas em 2910 - 2855 cm^{-1} presente no EPL, nas MP e nas MV correspondem, segundo Siripatrawan e Vitchayakitti (2017), à vibrações de estiramento da ligação CH em grupos CH_2 e CH_3 , respectivamente.

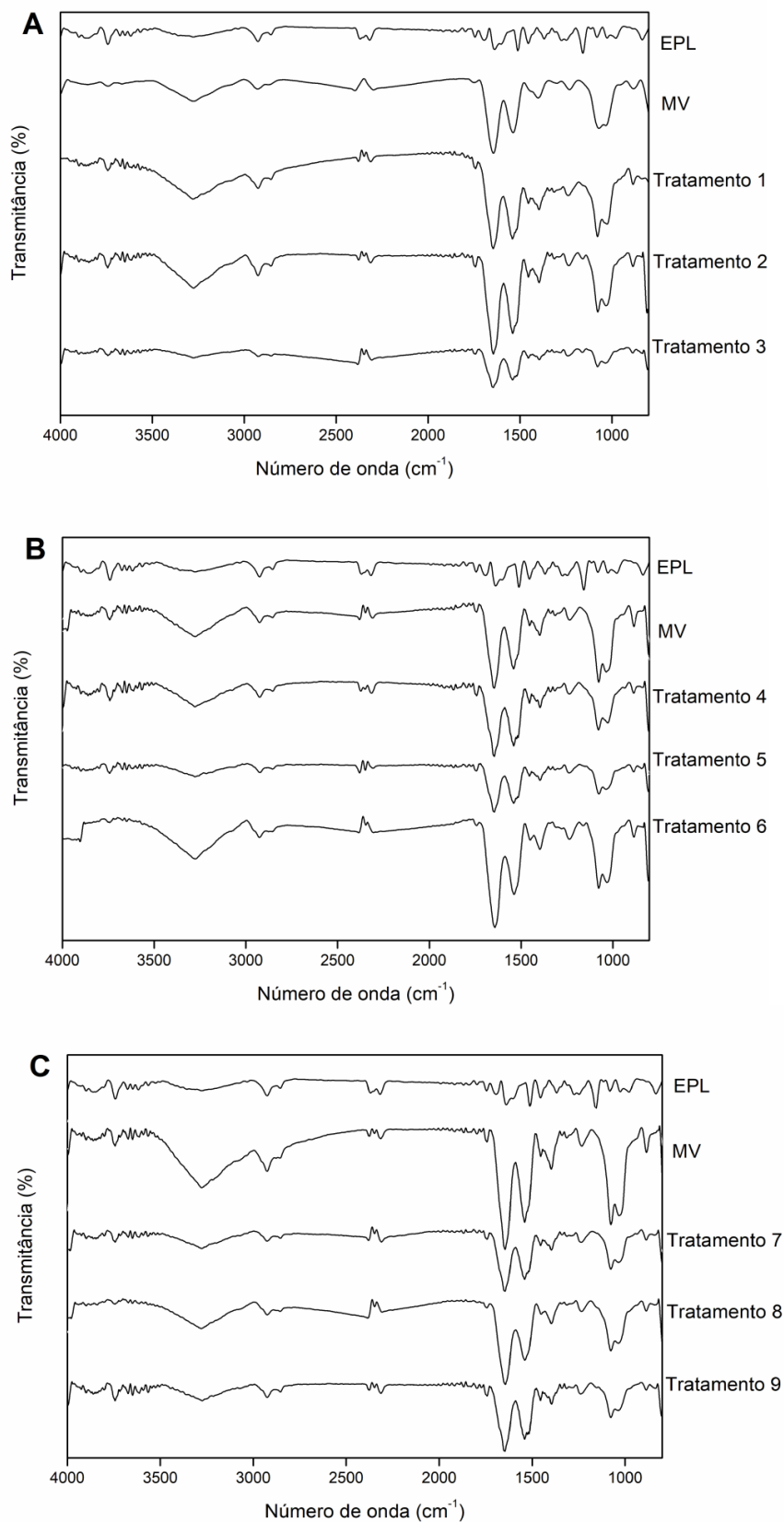


Figura 3. Espectro ATR-FTIR de micropartículas de extrato de própolis (EP) revestidas com proteína concentrada de ervilha (PCE). EPL: extrato de própolis liofilizado. MV: Micropartícula Vazia. **A)** Tratamento 1: 1% de EP e 2% de PCE; Tratamento 2: 2,5% de PE e 2% de PCE; Tratamento 3: 5% de EP e 2% de PCE; **B)** Tratamento 4: 1% de EP e 4% de PCE; Tratamento 5: 2,5% de EP e 4% de PCE; Tratamento 6: 5% de EP e 4% de PCE; **C)** Tratamento 7: 1% de EP e 6% de PCE; Tratamento 8: 2,5% de EP e 6% de PCE; Tratamento 9: 5% de EP e 6% de PCE.

As MV apresentaram estiramento axial em $2910 - 2855 \text{ cm}^{-1}$, o que é atribuído à ligação CH presente na estrutura da PCE; apresentaram também bandas em 1642 cm^{-1} , e uma deformação simétrica em 1540 cm^{-1} , o que é atribuído aos grupamentos CO, CN e NH presentes na proteína.

Os espectros das MP apresentaram bandas características do material de parede (MV) entre $3450 - 3130 \text{ cm}^{-1}$ correspondente a presença o estiramento axial de OH sobreposta à banda de estiramento em aminas (-NH); porém, houve intensa redução na intensidade das bandas para os tratamentos 3, 5, 7 e 8. Também ocorreu redução de intensidade no estiramento axial em $2910 - 2855 \text{ cm}^{-1}$ para as MP referentes aos tratamentos 3, 5, 7, 8 e 9, além da diminuição na intensidade das bandas em 1642 cm^{-1} e 1540 cm^{-1} para as MP dos tratamentos 3, 4, 5, 7, 8 e 9. A diminuição na intensidade de bandas características demonstra que houve interação entre os compostos. Além disto, não foi possível detectar o perfil do EP nos espectros das MEP, o que sugere ter ocorrido a encapsulação.

Os compostos fenólicos do EP podem formar ligações de hidrogênio e ligações covalentes e, assim, ocupar o grupamento funcional da proteína, retirando o hidrogênio livre que pode formar uma ligação hidrofílica com a água. Além do mais, um dos objetivos da microencapsulação seria formar uma barreira e desta forma, proteger o composto encapsulado das condições do meio, evitando a sua interação com o meio, e, sendo capaz de iniciar a liberação a taxas e locais específicos (GOUIN, 2004).

4.3.7. Difração de Raios-X

O difratograma da própolis (EPL) demonstrou picos em torno de 21° e 23° (Figura 4), pontiagudos e estreitos, com características de material cristalino. Shang-Jung et al. (2014) também observaram a presença de picos em $21,5^\circ$ e $23,5^\circ$ para extrato etanólico de própolis (EEP) (80%). No entanto, Rosseto et al. (2017) encontraram somente um pico em torno de 22° para o EEP.

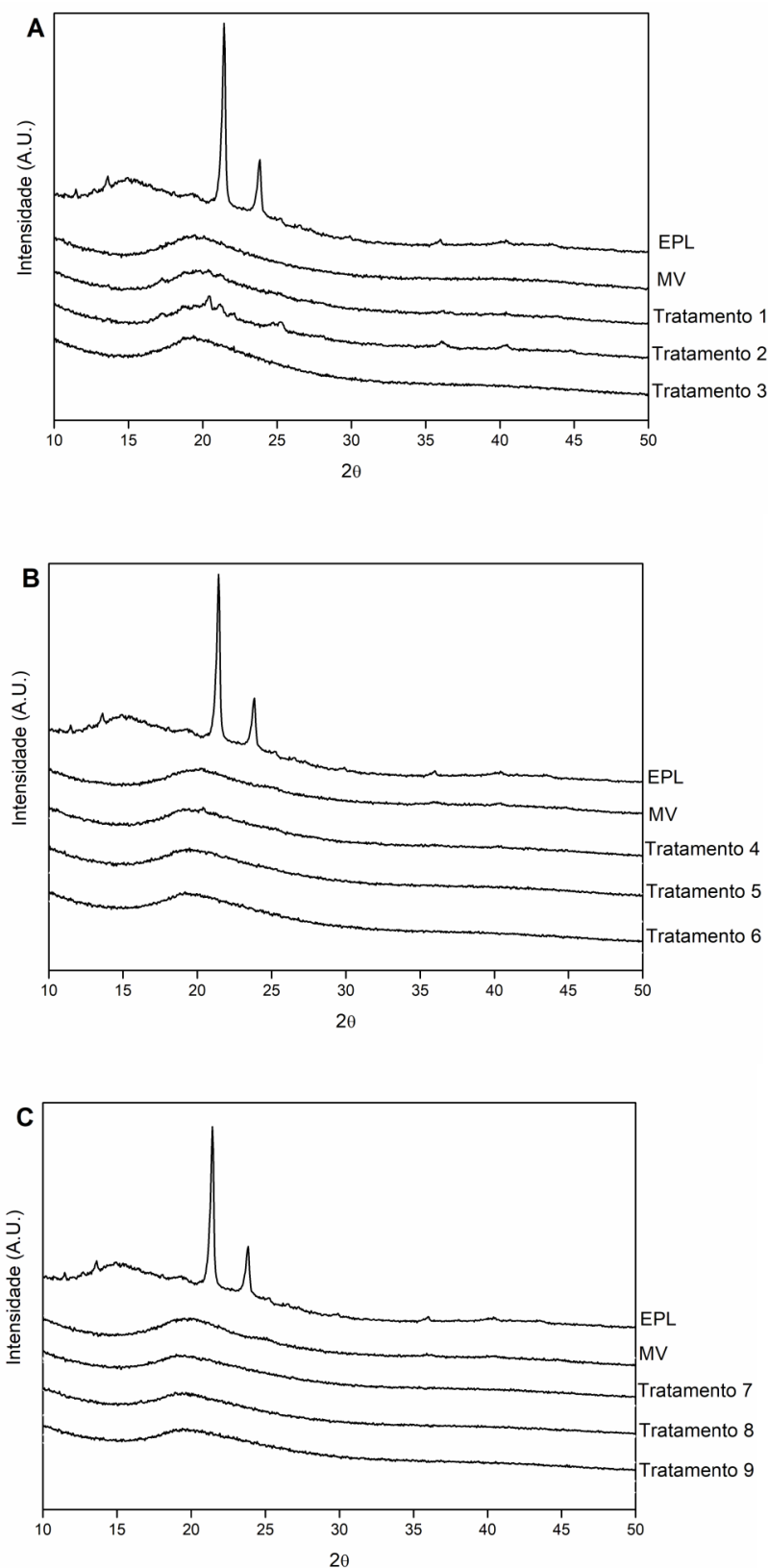


Figura 4. Espectros de difração de raios-X de extrato de própolis liofilizado (EPL), das micropartículas vazias (MV), e das micropartículas de extrato de própolis revestidas com proteína concentrada de ervilha (PCE): **A)** Tratamento 1: 1% de EP e 2% de PCE; **B)** Tratamento 2: 2,5% de EP e 2% de PCE; Tratamento 2: 2,5% de EP e 2% de PCE; Tratamento 3: 5% de EP e 2% de PCE. **B)** Tratamento 4: 1% de EP e 2% de PCE; Tratamento 5: 2,5% de EP e 4% de PCE; Tratamento 6: 5% de EP e 4% de PCE. **C)** Tratamento 7: 1% de EP e 6% de PCE; Tratamento 8: 2,5% de EP e 6% de PCE; Tratamento 9: 5% de EP e 6% de PCE.

Por outro lado, os difratogramas das MP apresentaram halos difusos, com bases alargadas e semelhantes aos difratogramas dos materiais de parede (MV), o que é característico de materiais no estado amorfo. Além disso, nos difratogramas das micropartículas não foi observado a presença dos picos característicos da própolis, o que sugere a proteção dos compostos encapsulados, assim como os resultados do ATR-FTIR.

De modo geral, a atomização induz a formação de materiais com estrutura amorfa, o que é favorável em processos de microencapsulação, pois além de favorecer o aprisionamento da própolis, também melhora a bioacessibilidade e a solubilidade dos compostos (BOTREL et al., 2014; GÓMEZ-ESTACA; GAVARA; HERNÁNDEZ-MUÑOZ, 2015). Segundo Gómez-estaca, Gavara e Hernández-muñoz (2015), a transformação de substâncias com características cristalinas em amorfas, possibilita aumentar a taxa de dissolução e, conseqüentemente a sua solubilidade.

4.3.8. Atividade antimicrobiana

O EPL apresentou atividade antimicrobiana contra as quatro bactérias testadas (Tabela 2), as quais foram escolhidas por sua presença ser muito relatada em alimentos. Os melhores resultados obtidos foram contra *S. aureus* e *L. monocytogenes*, com CIM de 0,62 mg mL⁻¹ e CBM de 1,25 mg mL⁻¹, para ambas bactérias. Observou-se que as bactérias Gram-positivas foram mais suscetíveis ao EPL do que as Gram-negativas, o que já foi relatado em outros estudos (MASCHERONI et al., 2014; das NEVES et al. 2016; ALMEIDA et al., 2017).

Tabela 2. Atividade antimicrobiana, concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) de extrato de própolis^a contra diferentes bactérias

Bactérias	CIM (mg mL ⁻¹)	CBM (mg mL ⁻¹)
<i>Staphylococcus aureus</i>	0,62	1,25
<i>Listeria monocytogenes</i>	0,62	1,25
<i>Salmonella</i> Typhimurium	2,5	20
<i>Escherichia coli</i>	1,25	10

^aO extrato etanólico de própolis foi rotaevaporado e liofilizado e o pó foi ressuscitado em dimetilsulfóxido (DMSO).

Isso pode ser explicado pelas diferenças na estrutura celular das bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. A parede celular das bactérias Gram-positivas,

constituída de aproximadamente 90%-95% de peptidoglicano, permite que as moléculas penetrem mais facilmente nas células microbianas. Já as bactérias Gram-negativas, possuem uma membrana externa composta de uma camada dupla de fosfolipídeos que está ligada à membrana interna por lipopolissacarídeos (LPS). Os lipopolissacarídeos promovem uma barreira à permeabilidade, e são os responsáveis pela antigenicidade, toxicidade e virulência das bactérias Gram-negativas, o que propicia maior resistência aos extratos naturais com atividade antimicrobiana (NIKAIDO, 1994). Dentre as bactérias Gram-negativas testadas, *E. coli* foi a mais suscetível ao EPL, com CIM de $1,25 \text{ mg mL}^{-1}$ e CBM de 10 mg mL^{-1} .

A atividade antimicrobiana da própolis tem sido atribuída, tanto aos compostos fenólicos de caráter hidrofílico quanto hidrofóbico, como os flavonoides e os ácidos e ésteres aromáticos, os quais possivelmente atuam na parede celular destas bactérias (PATEL et al., 2015),

Das Neves et al. (2016) encontraram resultados inferiores de CIM ($0,26 \text{ mg mL}^{-1}$) para extrato etanólico de própolis vermelha contra *S. aureus*. Almeida et al. (2017), utilizando extrato de clorofórmio da própolis vermelha, também encontraram atividade antibacteriana na faixa de concentração de $0,1\text{-}2 \text{ mg mL}^{-1}$ para *S. aureus*.

As diferenças encontradas nas CIM de EPL nos diferentes estudos pode ser explicada devido aos distintos processos de extração utilizados para a obtenção dos extratos. Dependendo do processo, muitas vezes se obtém uma pequena quantidade de compostos bioativos com ação antimicrobiana e grande quantidade de substâncias que são extraídas sem atividade antimicrobiana, como as resinas e ceras presente na própolis bruta (ALMEIDA et al., 2017). O efeito antimicrobiano de extrato de própolis foi correlacionado com sua composição complexa, principalmente pela presença dos flavonoides (PATEL et al., 2015), o que está de acordo com o alto teor de flavonoides encontrado neste estudo (dados não demonstrados).

Todas as MP apresentaram atividade antimicrobiana contra as bactérias Gram-positivas *S. aureus* e *L. monocytogenes* (Tabela 3), porém, não apresentaram ação contra as bactérias Gram-negativas *S. Typhimurium* e *E. coli*, nas concentrações avaliadas.

Tabela 3. Atividade antimicrobiana, concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) das micropartículas de extrato de própolis contra *Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes*

Micropartículas	<i>Staphylococcus aureus</i>		<i>Listeria monocytogenes</i>	
	CIM (mg mL ⁻¹)	CBM (mg mL ⁻¹)	CIM (mg mL ⁻¹)	CBM (mg mL ⁻¹)
1	>80	>80	>80	>80
2	20	30	20	30
3	5	30	10	10
4	>80	>80	>80	>80
5	>80	>80	>80	>80
6	>80	>80	>80	>80

Micropartículas: 1) 1% de extrato de própolis (EP) e 2% de proteína concentrada de ervilha (PCE); 2) 2,5% de EP e 2% de PCE; 3) 5% de EP e 2% de PCE; 4) 1% de EP e 4% de PCE; 5) 2,5% de EP e 4% de PCE; 6) 5% de EP e 4% de PCE.

O incremento da concentração de EP nas micropartículas nos tratamentos com 2% de PCE (tratamentos 1, 2 e 3), aumentou a capacidade de inibição das bactérias Gram-positivas avaliadas. Porém, nos tratamentos 4, 5 e 6, onde foi utilizada maior concentração de material de parede (4%), não foi observada atividade antimicrobiana na concentração máxima testada (>80 mg mL⁻¹). Possivelmente, a maior concentração da proteína tenha impedido a ação do EP por dificultar a permeação do extrato para o interior da célula microbiana, ou por ter ocasionado maior barreira física à sua liberação. Resultado semelhante foi obtido por Almeida et al. (2017), os quais demonstraram que o aumento na concentração do material de parede (>20% para pectina, >30% para goma guar) reduziu a atividade antimicrobiana das microcápsulas de EP, em função de uma possível quelação insolúvel do material de parede com os flavonoides do EP. Segundo aqueles autores, essa quelação teria ocasionado o atraso na liberação dos flavonoides.

Comparando-se a atividade antimicrobiana do EPL (Tabela 2) com a do MP, através da CIM e da CBM (Tabela 3), pode-se observar que o EPL apresentou atividade antimicrobiana superior a das MP, devido a menor concentração do EP nas micropartículas em relação ao extrato puro. O mesmo comportamento foi observado por Nori et al. (2011), Mascheroni et al. (2014) e Almeida et al. (2017), quando compararam a atividade antimicrobiana de EP e de microcápsulas produzidas com diferentes materiais de parede. Os autores atribuem esses resultados ao tipo e a concentração do material de parede utilizado, além da

diferença de concentração dos compostos do EP dentro das micropartículas secas e o teor presente nas amostras de EP bruto.

A liberação dos compostos encapsulados nos tratamentos em que foram utilizados 2,5% de EP e 2% de PCE, bem como onde utilizou-se 5% de EP e 2% de PCE, apresentaram efeito bacteriostático, e mesmo bactericida, contra *S. aureus* e *L. monocytogenes*.

4.4. Conclusão

A microencapsulação, utilizando proteína de ervilha como material de parede, proporciona a proteção do extrato de própolis. As micropartículas contendo 2% de proteína de ervilha e 5% de extrato de própolis apresentam a melhor eficiência de encapsulação, bem como melhor rendimento e maior atividade antioxidante. O extrato de própolis demonstrou atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas (*L. monocytogenes* e *S. aureus*) e Gram-negativas (*S. Typhimurium* e *E. coli* O157:H7). As micropartículas elaboradas com 2% de proteína de ervilha e com 2,5 e 5% de extrato de própolis apresentaram atividade antimicrobiana contra *L. monocytogenes* e *S. aureus*.

As micropartículas produzidas com proteína de ervilha como material de parede e extrato de própolis como componente bioativo, apresentam potencial para serem utilizadas como ingrediente em alimentos. Estudos futuros são necessários para investigar as propriedades de liberação das micropartículas e a sua estabilidade durante o armazenamento.

Agradecimentos

A CAPES e a FAPERGS pelo apoio financeiro, ao CEME-SUL (FURG) pela realização das análises de MEV e difração de Raios-X e ao Centro de Desenvolvimento e Controle de Biomateriais (CDC-Bio/UFPel) pela análise de viscosidade.

Referências:

ALMEIDA, E. T. DA CRUZ; SILVA, M. C. D. DA; OLIVEIRA, R. K.; ARRUDA, R. E. DOS S.; VIEIRA, D. A.. SILVA, V. DA C.; ESCODRO, P. B.; BASÍLIO-JÚNIORA, I.

D.; NASCIMENTO, T. G. do. Chemical and microbiological characterization of tinctures and microcapsules loaded with Brazilian red propolis extract. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, v. 7(5), p. 280-287, 2017.

ANDRADE, J. K. S.; DENADAI, M.; DE OLIVEIRA, C. S.; NUNES, M. L.; NARAIN, N. Evaluation of bioactive compounds potential and antioxidant activity of brown, green and red propolis from Brazilian northeast region. **Food Research International**, v. 101, p. 129-138, 2017.

BOTREL, D.A.; DE BARROS FERNANDE, R.V.; BORGES, S.V.; YOSHIDA, M. I. Influence of wall matrix systems on the properties of spray-dried microparticles containing fish oil. **Food Research International**, v. 62, p. 344–352, 2014.

BRUSCHI, M. L.; CARDOSO, M. L. C.; LUCCHESI, M. B.; GREMIÃO, M. P. D. Gelatin microparticles containing propolis obtained by spray-drying technique: preparation and characterization. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 264, p. 45–55, 2003.

ÇAM, M.; IÇYER, N. C.; ERDOGAN, F. Pomegranate peel phenolics: Microencapsulation, storage stability and potential ingredient for functional food development. **LWT - Food Science and Technology**, v. 55, p. 117-123, 2014.

COSTA, A. M. M.; NUNES, J. C.; LIMA, B. N. B.; PEDROSA, C.; CALADO, V.; TORRES, A. G.; PIERUCCI, A. P. T. R. Effective stabilization of CLA by microencapsulation in pea protein. **Food Chemistry**, v. 68, p. 157–166, 2015.

CUEVAS-BERNARDINO, J. C.; LEYVA-GUTIERREZ, F. M. A.; VERNON-CARTER, E. J.; LOBATO-CALLEROS, C.; ROM, A.; ROMÁN-GUERRERO, A.; DAVIDOV-PARDO, G. Formation of biopolymer complexes composed of pea protein and mesquite gum e Impact of quercetin addition on their physical and chemical stability. **Food Hydrocolloids**, v. 77, p. 736-745, 2018.

ELBAZ, N. M.; KHALIL, I. A.; ABD-RABOU, A. A.; EL-SHERBINY, I. M. Chitosan-based nano-in-microparticle carriers for enhanced oral delivery and anticancer activity of propolis. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 92, p. 254–269, 2016.

FALCÃO, S.; VILAS-BOAS, M.; ESTEVINHO, L. M.; BARROS, C.; DOMINGUES, M. R. M.; CARDOSO, S. M. Phenolic characterization of Northeast Portuguese Propolis: usual and unusual compounds. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 396, p. 887-897, 2010.

GHARSALLAOUI, A.; SAUREL, R.; CHAMBIN, O.; VOILLEY, A. Pea (*Pisum sativum*, L.) Protein Isolate Stabilized Emulsions: A Novel System for Microencapsulation of Lipophilic Ingredients by Spray Drying. **Food Bioprocess Technology**, v. 5, p. 2211–2221, 2012.

GHORBANZADE, T.; JAFARI, S. M.; AKHAVAN, S.; HADAVI, R. Nano-encapsulation of fish oil in nano-liposomes and its application in fortification of yogurt. **Food Chemistry**, v. 216, p. 146–152, 2017.

GOUIN, S. Microencapsulation. **Trends in Food Science & Technology**, v. 15, p. 330–347, 2004.

GÓMEZ-ESTACA, J.; GAVARA, R.; HERNÁNDEZ-MUÑOZ, P. Encapsulation of curcumin in electrosprayed gelatin microspheres enhances its bioaccessibility and widens its uses in food applications. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 29, p. 302–307, 2015.

MASCHERONI, E.; FIGOLI, A.; MUSATTI, A.; LIMBO, S.; DRIOLI, E.; SUEVO, R.; ROLLINI, M. An alternative encapsulation approach for production of active chitosan–propolis beads. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 49, p. 1401–1407, 2014.

MASTERS, K. Spray drying handbook. 5th ed., London: Longman Scientific & Technical, p. 725, 1991.

MOSER, P.; TELIS, V. R. N.; NEVES, N. DE A.; GARCÍA-ROMERO, E.; GÓMEZ-ALONSO, S.; HERMOSÍN-GUTIÉRREZ, I. Storage stability of phenolic compounds in powdered BRS Violeta grape juice microencapsulated with protein and maltodextrin blends. **Food Chemistry**, v. 214, p. 308–318, 2017.

DO NASCIMENTO, T. G.; SILVA, P. F. DA; AZEVEDO, L. F.; ROCHA, L. G. DA; PORTO, I. C. C. DE M.; MOURA, T. F. A. L.; BASÍLIO-JÚNIOR, I. D.; GRILLO, L. A. M.; DORNELAS C. B.; FONSECA E. J. DA S.; OLIVEIRA, E. DE J.; ZHANG, A. T., WATSON, D. G. Polymeric Nanoparticles of Brazilian Red Propolis Extract: Preparation, Characterization, Antioxidant and Leishmanicidal Activity. **Nanoscale Research Letters**, 11:301, 2016, DOI 10.1186/s11671-016-1517-3

NESTERENKO, A.; ALRIC, I.; SILVESTRE, F.; DURRIEU, V. Review. Vegetable proteins in microencapsulation: A review of recent interventions and their effectiveness. **Industrial Crops and Products**, v. 42, p. 469–479, 2013.

das NEVES, M. V.; DA SILVA, T. M.; LIMA, E. DE; DA CUNHA, E. V.; OLIVEIRA, E. DE. Isoflavone formononetin from red propolis acts as a fungicide against *Candida* sp. **Brazilian Journal Microbiology**, v. 47, p. 159–166, 2016.

NORI, M. P.; FAVARO-TRINDADE, C. S.; ALENCAR, S. M.; THOMAZINI, M., BALIEIRO, J. C. C.; CASTILLO, C. J. C. Microencapsulation of propolis extract by complex coacervation. **LWT- Food Science Technology**, v. 44, p. 429–435, 2011.

NIKAIDO, H. Prevention of drug access to bacterial targets: permeability barriers and active efflux. **Science**, v. 264, p. 382–388, 1994.

ORTIZ, S. E. M.; MAURI, A.; MONTERREY-QUINTERO, E. S.; TRINDADE, M. A.; SANTANA, A. S.; FAVARO-TRINDADE, C. S. Production and properties of casein hydrolysate microencapsulated by spray drying with soybean protein isolate. **LWT - Food Science and Technology**, v. 42, p. 919–923, 2009.

PATEL, J.; KETKAR, S.; PATIL, S.; FEARNLEY, J.; MAHADIK, K. R.; PARADKAR, A. R. Potentiating antimicrobial efficacy of propolis through niosomal-based system for administration. **Integrative Medicine Research**, v. 4, p. 94–101, 2015.

PEANPARKDEE, M.; IWAMOTO, S.; BOROMPICHAICHARTKUL, C.; DUANGMAL, K., YAMAUCHI, R. Microencapsulation of bioactive compounds from mulberry (*Morus alba* L.) leaf extracts by protein–polysaccharide interactions. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 51, p. 649–655, 2016.

PIERUCCI, A. P. T. R.; ANDRADE, L. R.; BAPTISTA, E. B.; VOLPATO, N. M.; ROCHA-LEÃO, M. H. M. New microencapsulation system for ascorbic acid using pea protein concentrate as coat protector. **Journal of Microencapsulation**, v. 23, n. 6, p. 654–662, 2006.

PIERUCCI, P. T. R.; ANDRADE, L. R.; FARINA, M.; PEDROSA, C.; ROCHA-LEÃO, M. H. M. Comparison of α -tocopherol microparticles produced with different wall materials: pea protein a new interesting alternative. **Journal of Microencapsulation**, v. 24, n. 3, p. 201–213, 2007.

PREMIA, M.; SHARMA, H. K. Effect of different combinations of maltodextrin, gum arabic and whey protein concentrate on the encapsulation behavior and oxidative stability of spray dried drumstick (*Moringa oleifera*) oil. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 105, p. 1232–1240, 2017.

ROCHA, G. A.; FÁVARO-TRINDADE, C. S.; GROSSO, C. R. F. Microencapsulation of lycopene by spray drying: Characterization, stability and application of microcapsules. **Food and Bioproducts Processing**, v. 90, p. 37–42, 2012.

ROSSETO, H. C.; DE TOLEDO, L. DE A. S.; DE FRANCISCO, L. M. B.; ESPOSITO, E., LIM, Y.; VALACCHI, G.; CORTESI, R., BRUSCHI, M. L. Nanostructured lipid systems modified with waste material of propolis for wound healing: Design, *in vitro* and *in vivo* evaluation. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 158, p. 441–452, 2017.

ROY, F.; BOYE, J. I.; SIMPSON, B. K. Review. Bioactive proteins and peptides in pulse crops: Pea, chickpea and lentil. **Food Research International**, v. 43, p. 432–442, 2010.

SHANG-JUNG, Y.; JIA-JIUAN, W.; YUAN-CHUEN, W.; CHIH-FENG, H.; TZONG-MING, W.; CHWEN-JEN, S.; CHIEH-MING, J. C. Encapsulation of propolis flavonoids in a water soluble polymer using pressurized carbon dioxide anti-solvent crystallization. **Journal of Supercritical Fluids**, p. 94, v. 138–146, 2014.

SILICI, S.; KUTLUCA, S. Chemical composition and antibacterial activity of propolis collected by three different races of honeybees in the same region. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 99, p. 69-73, 2005.

DA SILVA, F. C.; DA FONSECA, C. R.; DE ALENCAR, S. M.; THOMAZINI, M., BALIEIRO, J. C. DE C.; PITTIA, P.; FAVARO-TRINDADE, C. S. Assessment of production efficiency, physicochemical properties and storage stability of spray-dried propolis, a natural food additive, using gum Arabic and OSA starch-based carrier systems. **Food and Bioproducts Processing**, v. 91, p. 28–36, 2013.

SILVA, J. C.; RODRIGUES, S.; FEÁS, X.; ESTEVINHO, L. M. Antimicrobial activity, phenolic profile and role in the inflammation of propolis. **Food and Chemical Toxicology**, 50, 1790–1795, 2012.

SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTOS, R. M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. **Methods in Enzymology**, v. 299, p. 152-178, 1999.

SIRIPATRAWAN, U.; VITCHAYAKITTI, W. Improving functional properties of chitosan films as active food packaging by incorporating with propolis. **Food Hydrocolloids**, v. 61, p. 695-702, 2016.

STONE, A. K.; KARALASH A.; TYLER, R. T.; WARKENTIN, T. D.; NICKERSON, M. T. Functional attributes of pea protein isolates prepared using different extraction methods and cultivars. **Food Research International**, v. 76, p. 31–38, 2015.

TAMM, F.; HERBST, S.; BRODKORB, A.; DRUSCH, S. Functional properties of pea protein hydrolysates in emulsions and spray-dried microcapsules. **Food Hydrocolloids**, v. 58, p. 204-214, 2016.

TIVERON, A. P.; ROSALEN, P. L.; FRANCHIN, M.; LACERDA, R. C. C.; BUENO-SILVA, B.; BENSO, B.; DENNY, C.; IKEGAKI, M.; DE ALENCAR, S. M. Chemical Characterization and Antioxidant, Antimicrobial, and Anti-Inflammatory Activities of South Brazilian Organic Propolis. **PLoS ONE**, v. 11 (11), 2016.
doi:10.1371/journal.pone.0165588

ZANCANELA, D. C.; HERCULANO, R. D.; FUNARI, C. S.; MARCOS, C. M.; ALMEIDA, A. M. F.; GUASTALDI, A. C. Physical, chemical and antimicrobial implications of the association of propolis with a natural rubber latex membrane. **Materials Letters**, v. 209, p. 39–42, 2017.

5 Capítulo 3: Produção de micropartículas de extrato de própolis com proteína concentrada de ervilha por *spray drying* para aplicação alimentícia

Resumo: O objetivo deste estudo foi produzir micropartículas de extrato de própolis (EP), utilizando a proteína concentrada de ervilha (PCE) em diferentes concentrações como material de parede, e analisar suas propriedades físicas, morfológicas e de estabilidade térmica. Além disso, as micropartículas com maior eficiência de encapsulação foram incorporadas em bolo, para verificar seu impacto nas características físicas, teor de compostos fenólicos, atividade antioxidante e nos atributos sensoriais dos bolos. Das três formulações testadas usando diferentes concentrações de PCE (2, 4, 6%), as micropartículas com PCE de 2% apresentaram a maior eficiência de encapsulação dos compostos fenólicos do EP. Todas as micropartículas apresentaram morfologia semelhante, com rugosidade e tamanhos variados, e com estabilidade térmica superior em relação ao EP puro. A formulação PCE 2% foi adicionada na elaboração de bolo. O bolo fortificado resultou em características de sabor, odor, cor e textura semelhante ao bolo controle, apesar de ter ocorrido redução no teor total de compostos fenólicos e na atividade antioxidante das micropartículas após o forneamento.

Palavras-chave: extrato de própolis; compostos fenólicos; atividade antioxidante; proteína concentrada de ervilha; bolo.

5.1. Introdução

A própolis é um produto elaborado pelas abelhas através da utilização de substâncias resinosas e balsâmicas coletadas em plantas. As abelhas digerem parcialmente os materiais coletados através da ação de enzimas contidas em suas secreções salivares, e após acrescentam ainda cera e pólen, formando assim a própolis (SILVA et al., 2012). A própolis é composta por 50% de resinas (contendo flavonoides e ácidos fenólicos), 30% de ceras, 10% de óleos essenciais, 5% de pólen e 5% de outros compostos orgânicos (PELLATI et al., 2013).

Dentre os compostos presentes na própolis, os fenólicos tem recebido destaque devido a sua relação com a atividade antioxidante, antimicrobiana e aos efeitos na proteção contra doenças coronárias e cardíacas. Cabe ressaltar que a própolis não exibe toxicidade ou efeitos colaterais em seres humanos (SZLISZKA et al., 2009).

Apesar de todos os efeitos benéficos que o consumo da própolis pode trazer à população, e do grande interesse para o enriquecimento de alimentos e bebidas, seu consumo é dificultado devido ao seu gosto amargo e forte sabor e odor, e por isso, seu uso tem sido restrito a forma de extrato de própolis. Além disso, a própolis

também apresenta baixa solubilidade em água, além de que os compostos fenólicos presentes na sua constituição são rapidamente degradados pelo trato gastrointestinal (da SILVA et al., 2011; ELBAZ et al., 2016).

A encapsulação é uma técnica que converte extratos líquidos em formas sólidas em que são utilizados materiais de parede que envolvem um composto bioativo, podendo assim minimizar o sabor, odor e cor deste composto (TRIFKOVIĆ et al., 2014). Além disso, essa técnica protege os compostos bioativos da degradação pela luz, oxigênio, pH e temperatura, de forma a prolongar sua estabilidade (GÓMEZ-ESTACA; GAVARA; HERNÁNDEZ-MUÑOZ, 2015).

A utilização das proteínas como material de parede na encapsulação apresenta vantagens por serem consideradas seguras para o consumo humano (GRAS) (JIA; DUMONT; ORSAT, 2016), possuírem um alto valor nutritivo e serem digeridas pelo trato gastrointestinal dos humanos (JOYE; MCCLEMENTS, 2014). O fato da digestão das proteínas não iniciar na boca, como ocorre com os carboidratos, também as tornam propícias ao uso como material de parede na encapsulação, com fins de retardar a liberação da própolis, e auxiliar na redução da percepção sensorial do sabor e odor indesejáveis. Com a crescente conscientização dos consumidores sobre os benefícios para a saúde das proteínas vegetais, houve uma maior utilização de proteínas de ervilha para a formulação de vários produtos alimentares (CHAO; JUNG; ALUKO, 2018).

Objetivou-se então, produzir e caracterizar micropartículas de extrato de própolis com o uso da proteína concentrada de ervilha (PCE) em diferentes concentrações como material de parede, e analisar suas propriedades físicas, morfológicas e de estabilidade térmica, bem como sua incorporação em bolo, para investigar seu impacto nas características físicas, no teor de compostos fenólicos, na atividade antioxidante e nos atributos sensoriais dos bolos.

5.2. Material e métodos

5.2.1. Materiais

A amostra de própolis foi adquirida de um apicultor, em novembro de 2015, da cidade de Rio Grande – RS, Brasil (latitude: 32°02'06.2"S e longitude: 52°05'56.4"W). As amostras foram analisadas quanto aos padrões de qualidade (dados não demonstrados), estando de acordo com a legislação para a própolis

Brasileira (Brasil, 2001). A proteína concentrada de ervilha (PCE) (73%) foi adquirida da Growth Supplements (Brasil) e o manitol P.A. foi adquirido da Synth (Brasil). Para a determinação da atividade antioxidante foram utilizados: o 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH) e o ácido 2-carboxílico-6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano (Trolox) adquiridos da Sigma-Aldrich® (EUA).

5.2.2. Obtenção do extrato de própolis

O extrato própolis (EP) foi preparado como descrito por Silva et al. (2012), com algumas modificações. A própolis foi triturada em moinho de bola (MARCONI 350, Brasil), e 10 g foram homogeneizados com 100 mL de álcool etílico (80%), sendo mantidos em agitador incubador (Quimis 255, Brasil), na temperatura ambiente por 24 h. Após, o EP foi filtrado em papel filtro Whatman No. 1, sendo o sobrenadante mantido sob refrigeração e a cada 24 h submetido a centrifugação (Eppendorf 5430 R, Alemanha) a 260 g, 5 °C, 15 min por 3 dias consecutivos, para a eliminação da cera presente na própolis. Os filtrados finais foram evaporados em evaporador rotativo (Laborota 4000, Alemanha) sob pressão reduzida a 40 °C, e, em seguida, liofilizados para remoção residual da água (Liobras L101, Brasil).

5.2.3. Produção de micropartículas de própolis por *spray drying*

Foram preparadas soluções do material de parede, nas concentrações de 2, 4 e 6% (p/v) de PCE em água destilada aquecida a 50 °C, como descrito por Costa et al. (2015). As soluções foram mantidas sob agitação durante 1 h, e após, submetidas ao banho de ultrassom (Quimis Q335D, Brasil) por 30 min. À solução de proteína, adicionou-se 5,0% (v/v) do EP, sendo homogeneizados por 2 min a 14000 rpm (Turrtec, T2-102, Brasil), e após, adicionado o manitol (previamente diluído em água) a 20% (p/p em relação ao peso da PCE).

As três formulações de micropartículas de extrato de própolis (MP) foram atomizadas em *spray drying* (Labmaq MSDi 1.0, Brasil), nas seguintes condições operacionais: temperatura de entrada de 120 °C; temperatura de saída de 72 ± 3 °C; fluxo de ar de 40 L h^{-1} ; taxa de alimentação de 40 L h^{-1} e diâmetro do bico de 3 mm. Ao final de cada secagem, o pó resultante foi acondicionado em frasco plástico de polipropileno e mantido congelado ($-18 \text{ °C} \pm 2 \text{ °C}$) até a realização das análises.

5.2.4. Identificação dos compostos fenólicos por LC-ESI-qTOF-MS

O EPL (250 $\mu\text{g mL}^{-1}$) e as MP (250 $\mu\text{g mL}^{-1}$) foram ressuspensas em metanol HPLC (Vetec, Brasil), sonicadas por 10 min e centrifugadas a 260 g/20 °C por 15 min. Após o preparo das amostras, 10 μL foram injetados em cromatógrafo a líquido (UFLC, Shimadzu, Japão) acoplado a espectrômetro de massas de alta resolução do tipo quadrupolo - tempo de voo (Maxis Impact, Bruker Daltonics, Alemanha). Para a separação cromatográfica foi utilizada a pré-coluna C18 (2,0 x 4 mm) e coluna Luna C18 (2.0 x 150 mm, 100 Å, 3 μm) (Phenomenex Torrance, EUA) utilizando as fases móveis: água acidificada com 0,1% de ácido fórmico (eluente A) e acetonitrila acidificada com 0,1% de ácido fórmico (eluente B). Para separação foi utilizado um gradiente: 0–2 min, 10% B; 2–15 min, 10–75% B; 15-18 min, 90% B; 18-21 min 90% B; 21-23 min, 10% B, 23-30 min, 10% B, fluxo de 0,2 mL min^{-1} e a temperatura da coluna a 40 °C. O espectrômetro de massas foi operado nos modos ESI negativo (ácidos fenólicos e flavonoides) com espectros adquiridos ao longo de uma faixa de massa de m/z 50 a 1200, com voltagem capilar em 3.5 kV, pressão do gás de nebulização (N_2) de 2 bar, gás de secagem em 8 L min^{-1} , temperatura da fonte de 180 °C, colisão de RF de 150 Vpp; transfer 70 mS e armazenamento pré-pulso de 5 mS. O equipamento foi calibrado com formiato de sódio 10mM, cobrindo a faixa de aquisição de m/z 50 até 1200. Experimentos automáticos de MS/MS foram realizados ajustando os valores de energia de colisão como se segue: m/z 100, 15 eV; m/z 500, 35 eV; m/z 1000, 50 eV, usando nitrogênio como gás de colisão. Os dados de MS e MS/MS foram processados por meio do software Data analysis 4.0 (BrukerDaltonics, Alemanha).

Os ácidos fenólicos e flavonoides foram caracterizados pelo espectro de UV/Vis (210-800 nm) e massa exata, padrões de fragmentação MS^n em comparação com os dados da biblioteca do equipamento, bases de dados (padões, Metlin, MassBank, KeggCompound, ChemSpider) e em comparação com padrão isotópico. A quantificação dos ácidos fenólicos e flavonoides foi realizada através de curva de calibração externa com padrões de cada composto e os resultados foram expressos em mg g^{-1} .

5.2.5. Análise quantitativa de compostos fenólicos e eficiência de encapsulação

O teor de compostos fenólicos do EP e das MP foi analisado por LC-ESI-qTOF-MS (descrito em item 5.2.4) de acordo com a equação 1. A eficiência de

encapsulação (EE) foi calculada para cada composto fenólico identificado e quantificado, utilizando a eq.1:

$$EE(\%) = \frac{CFM}{CFA} \times 100 \quad \text{Eq. 1}$$

Onde CFM corresponde ao conteúdo de cada um dos compostos fenólicos das micropartículas e CFA corresponde ao conteúdo de cada composto fenólico do extrato de própolis adicionados na micropartícula. Os resultados foram expressos em porcentagem de eficiência de encapsulação.

5.2.6. *Análise do teor de umidade e da atividade de água*

O teor de umidade das MP foi medido gravimetricamente sobre uma base úmida (AOAC, 1995). Cerca de 1 g da amostra foi seca em estufa (New Ethics, Brasil) a 105 ± 2 °C por um período de 5 h até peso constante. Para o cálculo do percentual (%) de umidade foi utilizado o peso inicial e final das MP. A atividade de água (a_w) foi medida por leitura direta de, aproximadamente, 1 g de MP no equipamento Aqualab Novasina (Brasil), de acordo com a AOAC (1995).

5.2.7. *Microscopia Eletrônica de Varredura*

A morfologia das MP foi examinada por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) (JEOL JSM-6060 LV, Japão), conforme Elbaz et al. (2016). Uma pequena quantidade de cada amostra foi espalhada em suporte metálico com fita de carbono. Subsequentemente, todas as amostras foram revestidas com ouro e examinadas sob uma voltagem de aceleração de 15 kV e ampliação de 3000 x.

5.2.8. *Análise termogravimétrica*

A estabilidade térmica do EPL, PCE e das MP foi avaliada através de um analisador termogravimétrico (TGA, TA-60WS, Shimadzu, Japão). A amostra (cerca de 5 mg) foi aquecida em cápsulas de platina numa faixa de 30 a 600 °C, com taxa de aquecimento de 10 °C min^{-1} e um fluxo de nitrogênio de 50 mL min^{-1} . Uma cápsula de platina vazia foi utilizada como referência.

5.2.9. Fortificação dos bolos com micropartículas de própolis

Os bolos controle, com adição de extrato e com adição da micropartícula MP PCE2% foram preparados com a adição dos ingredientes descritos na Tabela 1. A micropartícula com 2% de material de parede apresentou os melhores resultados para a eficiência de encapsulação, conteúdo de compostos fenólicos e capacidade antioxidante nos bolos, além das melhores propriedades físicas, e por isso foi a escolhida para ser utilizada para a análise sensorial do bolo.

Todos os ingredientes foram homogeneizados, com exceção do fermento, e levados a bateadeira (Arno Planetária Deluxe, Brasil) por 3 min. Após, a bateadeira foi desligada e adicionou-se o fermento ao bolo controle; e para os bolos com adição das micropartículas, o fermento foi adicionado juntamente com 2 g de MP (41,22 mg g⁻¹ de total de compostos fenólicos). No bolo com a adição do EP foi colocado 1 g de EPL/bolo (43, 82 mg g⁻¹ de total de compostos fenólicos), que também foi adicionado juntamente com o fermento. O batimento foi mantido por mais 2 minutos para obtenção de uma massa homogênea, cujo rendimento em massa líquida (bolo cru) foi de 900 mL.

Todas as amostras preparadas continham uma quantidade equivalente de EP, seja na sua forma livre ou encapsulada. O cozimento dos bolos foi realizado em um forno elétrico (Layr, Brasil) pré-aquecido a 150 °C durante 25 min. O bolo sem a adição de MP e sem adição de EP foi preparado como controle. As amostras de bolos (bolo controle, bolo adicionado com EP, bolo com adição de MP PCE2%) foram avaliadas quanto ao índice de crescimento, coloração, total de compostos fenólicos, atividade antioxidante e análise sensorial. Os experimentos de produção dos bolos foram conduzidos independentes e realizados por duas vezes.

Tabela 1. Percentual de ingredientes das formulações dos bolos

Ingredientes	Bolos		
	Quantidade (%)		
	Controle	Extrato de própolis	Micropartícula*
Farinha	25,8	25,8	25,8
Açúcar	25,8	25,8	25,8
Leite Integral	25,8	25,8	25,8
Ovos	12,1	12,1	12,1
Margarina	5,4	5,4	5,4
Fermento	1,1	1,1	1,1
Micropartícula	—	—	0,1

Extrato de própolis	—	0,2	—
---------------------	---	-----	---

*Micropartícula de extrato de própolis com 2% de proteína concentrada de ervilha

5.2.9.1. Análise do crescimento e coloração dos bolos

Para determinação do crescimento dos bolos utilizou-se um paquímetro (Starret 799, EUA) para medir a massa crua e a massa do bolo após o seu forneamento e resfriamento. A análise foi realizada em cinco pontos distintos da massa do bolo.

A coloração dos bolos controle, com EP e do bolo com a adição de MP, foi determinada pelo método CIEL*a*b*, utilizando um colorímetro (Minolta CR-300, EUA), iluminador D65, 10 °. Foram determinados componentes de cor: L * [escuro (0) para claro (100)], a * [verde (-) para vermelho (+)] e b * [azul (-) para amarelo (+)]. O croma é a relação entre os valores de a* e b*, onde se obtém a cor real do material analisado, calculado de acordo com a equação 2. Para a realização da análise, cada amostra de bolo foi cortada em fatias de aproximadamente 2 cm de espessura, e cinco leituras foram tomadas para cada amostra em diferentes pontos aleatórios.

$$Croma = \sqrt{a^2 + b^2} \quad \text{Eq. 2}$$

5.2.9.2. Determinação do total de compostos fenólicos do extrato de própolis, das micropartículas e dos bolos

Primeiramente, 50 mg de MP e 8 g dos bolos (previamente triturados em liquidificador Philco PH900, Brasil) foram misturadas com 10 mL de álcool etílico P.A., conforme descrito por Ghorbanzade et al. (2017). Realizou-se sonicação (Unique, 1400A, Brasil) por 10 min, e após homogeneização dos tubos em homogeneizador (Turrtec, T2-102, Brasil) por 1 min a 12 000 rpm. Os tubos foram mantidos sob agitação por 24 h, a 25 °C em banho com água, para que houvesse a ruptura e liberação dos compostos de interesse das MP. Após, foi realizada a centrifugação (Eppendorf 5430 R, Alemanha) a 4200 g por 15 min, a 25 °C.

Para a determinação dos compostos fenólicos foi utilizado o método de Folin-Ciocalteu (SINGLETON et al., 1999). Para isto, 0,5 mL do EP (diluído 1:50 v/v, na concentração de 0,4 mg mL⁻¹), das MP e dos bolos (após a extração em etanol) foram adicionadas a 2,5 mL de reagente de Folin-Ciocalteu 0,2 M, e após 5 min foi

feito a adição de 2 mL de solução de carbonato de sódio (7,5 %). A leitura da absorbância foi realizada após 2 h a 725 nm em espectrofotômetro (JENWAY 6705 UV/Vis, Espanha). Foi preparado um branco somente com a PCE e o valor foi subtraído do valor encontrado para as MP. A quantificação foi realizada a partir de uma curva padrão de ácido gálico nas concentrações de 30 a 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ($y=0,014x + 0,0169$, $R^2= 0,999$). Os resultados foram expressos em mg equivalentes de ácido gálico por grama de amostra (mg EAG g^{-1}) em peso seco.

5.2.9.3. Atividade antioxidante do extrato, das micropartículas e dos bolos

A capacidade antioxidante de eliminar os radicais 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo (DPPH) do EP, das MP e dos bolos foram avaliadas segundo o método descrito por Brand-Williams, Cuvelier e Berset (1995). Adicionou-se 0,1 mL de EP ou da solução com as MP, ou dos bolos (após a extração com etanol) e 3,9 mL do DPPH em etanol (0,06 mM). A absorbância foi medida a 515 nm após 30 min de reação, utilizando um espectrofotômetro UV-vis (JENWAY 6705 UV/Vis, Espanha). A quantificação foi baseada em uma curva de calibração obtida usando Trolox ($y=-0,0006x + 1,3054$, $R^2 = 0,9947$), e os resultados foram expressos como μmol equivalentes de Trolox (TE) por g de amostra em peso seco.

5.2.9.4. Análise sensorial dos bolos

A análise sensorial das amostras do bolo controle, com adição de EP e do bolo com adição das MP, foi realizada utilizando o teste de comparação múltipla, com o intuito de indicar se os bolos com adição de EP e com adição de MP era melhor, igual ou pior ao bolo controle em relação aos critérios: cor, odor, gosto e textura. A análise foi realizada por 30 avaliadores não treinados com idade entre 18 e 50 anos, de ambos os sexos. As amostras foram fornecidas em pratos descartáveis com fatias de bolo de 2x2 cm, codificadas com um número de três dígitos aleatórios. A comparação foi avaliada usando uma escala de 9 pontos, variando de 1 (extremamente pior) para 9 (extremamente melhor) (Apêndice B). Todos os avaliadores assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Apêndice C), e foram informados de cada detalhe da pesquisa.

5.2.10. Análise estatística

As determinações foram realizadas em triplicata e os resultados expressos em médias $\pm$ desvio padrão. Foi realizada análise de variância e os testes de Tukey e Dunnet ($p \leq 0,05$) usando SAS 9.1 (Cary, NC).

5.3. Resultados e discussão

5.3.1. Identificação dos compostos fenólicos por LC-ESI-qTOF-MS

Na tabela 2 estão apresentadas as concentrações (mg g^{-1}) dos compostos fenólicos encontrados no EP e nas MP.

Tabela 2. Compostos fenólicos (mg g^{-1}) presentes no extrato de própolis (EP) e nas micropartículas de própolis (MP), utilizando diferentes concentrações de proteína concentrada de ervilha (PCE) por LC-ESI-qTOF-MS

Compostos fenólicos	EP	MP PCE2%	MP PCE4%	MP PCE6%
Ácido gálico	0,05 $\pm$ 0,01	0,054 $\pm$ 0,00	0,050 $\pm$ 0,00	0,06 $\pm$ 0,00
Ácido clorogênico	0,40 $\pm$ 0,07	0,23 $\pm$ 0,01	0,20 $\pm$ 0,03	0,23 $\pm$ 0,02
Ácido 4-hidroxibenzóico	0,90 $\pm$ 0,02	0,36 $\pm$ 0,10	0,10 $\pm$ 0,01	0,17 $\pm$ 0,05
Ácido cafeico	0,91 $\pm$ 0,00	0,47 $\pm$ 0,00	0,35 $\pm$ 0,00	0,45 $\pm$ 0,00
Rutina	0,01 $\pm$ 0,00	0,007 $\pm$ 0,00	0,004 $\pm$ 0,00	0,006 $\pm$ 0,00
Ácido p-cumárico	0,90 $\pm$ 0,07	0,22 $\pm$ 0,00	0,13 $\pm$ 0,00	0,17 $\pm$ 0,00
Ácido ferúlico	2,50 $\pm$ 0,21	0,67 $\pm$ 0,35	0,87 $\pm$ 0,08	0,93 $\pm$ 0,19
Quercetina	0,54 $\pm$ 0,05	0,14 $\pm$ 0,00	0,04 $\pm$ 0,01	0,04 $\pm$ 0,00
Luteolina	4,00 $\pm$ 0,33	2,27 $\pm$ 0,01	1,23 $\pm$ 0,09	1,22 $\pm$ 0,16
Kaempferol	1,33 $\pm$ 0,12	0,76 $\pm$ 0,00	0,40 $\pm$ 0,03	0,40 $\pm$ 0,05
Crisina	0,25 $\pm$ 0,05	0,24 $\pm$ 0,01	0,06 $\pm$ 0,00	0,03 $\pm$ 0,00
Pinocembrina	1,06 $\pm$ 0,2	0,90 $\pm$ 0,03	0,65 $\pm$ 0,02	0,65 $\pm$ 0,07
Apigenina	9,21 $\pm$ 1,02	7,02 $\pm$ 0,34	3,96 $\pm$ 0,12	3,57 $\pm$ 0,08

* Valores referem-se à média de duas determinações $\pm$ desvio padrão. MP PCE 2%: micropartículas de extrato de própolis utilizando 2% de proteína concentrada de ervilha como material de parede; MP PCE 4%: micropartículas de extrato de própolis utilizando 4% de proteína concentrada de ervilha como material de parede; MP PCE 6%: micropartículas de extrato de própolis utilizando 6% de proteína concentrada de ervilha como material de parede.

Pela análise por LC-ESI foi possível detectar 13 compostos fenólicos no EP e nas MP (Tabela 2). Os flavonoides foram os compostos mais abundantes tanto no EP quanto nas MP, sendo a apigenina ($9,21 \text{ mg g}^{-1}$) o composto em maior concentração, seguido da luteolina ($4,00 \text{ mg g}^{-1}$). Dentre os ácidos fenólicos, o ácido ferúlico ($2,50 \text{ mg g}^{-1}$) e o ácido cafeico ($0,91 \text{ mg g}^{-1}$) foram encontrados em maior concentração.

Analisando as MP, pode-se observar que os flavonoides foram menos afetados pela secagem por *spray drying* do que os ácidos fenólicos, com exceção da quercetina (Tabelas 2 e 3). Possivelmente, em função da estrutura dos flavonoides, com destaque para a insaturação no anel C (posições 2-3), do número e da posição de grupamentos hidroxilas, da carbonila em C-4 (Anel B), e do seu alto peso molecular, foi possível a ocorrência de interações mais fortes destes compostos com a PCE. Segundo Jia et al. (2016) nem todos os compostos fenólicos tem a capacidade de interagir e formar ligações com proteínas, sendo que moléculas com alto peso molecular, geralmente, tem maior capacidade de interação com as proteínas.

Além disso, sabe-se que formação de um complexo entre a proteína o composto fenólico é fortemente influenciada pela natureza da proteína (quantidade de prolina e triptofano), pela estrutura do composto fenólico (número de anéis aromáticos), pela temperatura e pela presença de outros compostos (como os carboidratos) que podem afetar as interações intermoleculares (VON STASZEWSKI et al., 2012).

No estudo realizado por Andrade et al. (2017) foram identificados os compostos artepelin C, kaempferide, kaempferol, pinocembrina, p-cumárico, clorogênico e cafeico em própolis brasileira, sendo os ácidos fenólicos os compostos mais abundantes. A luteolina, o ácido cafeico e o kaempferol foram relatados em diversos trabalhos como sendo capazes de inibir significativamente a proliferação de diferentes tipos de células tumorais (FILOMENI et al., 2012; BUFALO et al., 2013). Enquanto que, compostos como a apigenina e a pinocembrina presentes na própolis brasileira, foram apontados como os responsáveis pelo mecanismo anti-inflamatório (FRANCHIN et al., 2017).

5.3.2. Eficiência de encapsulação

O valor encontrado na quantificação dos compostos fenólicos (Tabela 1) para o EP e para as MP foram utilizados para determinar a eficiência de encapsulação. Pode-se observar que a eficiência de encapsulação das micropartículas variou de acordo com a concentração do material de parede utilizado e com o composto fenólico analisado (Tabela 3).

Tabela 3. Eficiência de encapsulação (%) dos compostos fenólicos presentes nas micropartículas de extrato de própolis com diferentes concentrações de proteína concentrada de ervilha (PCE) como material de parede

Compostos fenólicos	MP PCE 2 %	MP PCE 4 %	MP PCE 6 %
Ácido gálico	100,00 ^a	94,37 ^b	100,00 ^a
Ácido clorogênico	59,11 ^b	52,46 ^c	60,00 ^a
Ácido 4-hidroxibenzóico	41,26 ^a	11,51 ^c	19,90 ^b
Ácido cafeico	51,30 ^a	38,26 ^c	49,04 ^b
Rutina	80,10 ^a	41,77 ^c	65,34 ^b
Ácido p-cumárico	39,92 ^a	23,80 ^c	30,80 ^b
Ácido ferúlico	26,94 ^c	34,70 ^b	37,38 ^a
Quercetina	26,92 ^a	6,96 ^b	7,14 ^b
Luteolina	57,93 ^a	31,47 ^b	31,10 ^b
Kaempferol	57,30 ^a	30,47 ^b	29,76 ^c
Crisina	97,70 ^a	23,50 ^b	13,20 ^c
Pinocembrina	84,70 ^b	72,26 ^c	99,70 ^a
Apigenina	76,24 ^a	43,05 ^b	38,80 ^{4c}

Médias acompanhadas por mesma letra minúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). (MP PCE 2%: micropartícula produzida utilizando 2% de material de parede; MP PCE 4%: micropartícula produzida utilizando 4%; MP PCE 6%: micropartícula produzida utilizando 6% de material de parede).

Dentre as micropartículas, a MP produzida com PCE 2% apresentou significativamente a maior eficiência de encapsulação para 10 dos 13 compostos fenólicos quantificados do EP, tanto para os flavonoides quanto para os ácidos fenólicos, em relação às micropartículas com PCE 4% e PCE 6%. A exceção ocorreu com o ácido clorogênico, ácido ferúlico, e a pinocembrina, nas micropartículas em que se utilizou PCE 6%.

Esse comportamento pode ser explicado em função da secagem ocorrer de forma mais rápida quando se utiliza menores concentrações da proteína, acelerando a formação de uma crosta externa que protege os compostos fenólicos. Como consequência, ocorre a produção de micropartículas com maior retenção de compostos fenólicos (EZHILARASI et al., 2014). Assim, quanto mais tempo os compostos bioativos ficam expostos a altas temperaturas, maiores são as perdas decorrentes.

Quanto aos compostos fenólicos, as maiores porcentagens de eficiência de encapsulação das MP foi para o ácido gálico, a pinocembrina e a crisina. O ácido gálico possui 4 hidroxilas (OH), enquanto a crisina e a pinocembrina possuem 2 grupamentos hidroxila no seu anel B, o que os diferenciam na estrutura dos demais compostos, e esta pode ter sido a razão da maior eficiência.

O composto fenólico mais afetado pela encapsulação por *spray drying* foi a quercetina (Tabelas 2 e 3). Busch et al. (2017) também relataram degradação na maioria dos compostos fenólicos da própolis microencapsulada por *spray drying*, e relataram que a adição de gomas (vinal ou arábica) melhorou a eficiência de encapsulação de alguns compostos fenólicos da própolis, especialmente da quercetina. No trabalho de Nascimento et al. (2016), apesar dos autores terem encontrado alta eficiência de encapsulação do EP (38,0% a 99,0%) para alguns dos flavonoides nanoencapsulados, as perdas foram superiores a 50%.

No entanto, apesar da variação na eficiência encontrada neste estudo, em todas as formulações ocorreu a manutenção dos compostos fenólicos originalmente identificados no EP de forma equitativa. Da Rosa et al. (2014), ao encapsularem compostos fenólicos de amora, não encontraram nenhuma matriz capaz de encapsular equitativamente todos os compostos originalmente identificados no extrato fenólico.

A eficiência da encapsulação pode estar relacionada a diferentes fatores, como a interação entre os compostos bioativos e o material de parede; e a temperatura de secagem no *spray drying*, que pode degradar os compostos bioativos, como os compostos fenólicos por serem termolábeis (Da ROSA et al., 2014; Dos REIS et al., 2017). Além disso, a intensidade em que os compostos são afetados pode variar de acordo com o perfil de composição da própolis, a qual pode apresentar compostos mais ou menos suscetíveis a altas temperaturas (Da SILVA et al., 2011).

5.3.3. Umidade e atividade de água das micropartículas

As MP apresentaram valores de umidade de 6,71% para o PCE com 2%, 2,53% para o PCE com 4% e 1,87 % para o PCE com 6 %. Em relação à a_w , os valores foram 0,619 para o PCE com 2%, 0,334 para o PCE com 4% e de 0,302 para o PCE 6%. Pode-se observar que o aumento na concentração do material de parede ocasionou uma redução no conteúdo de umidade e na a_w (PCE 2%). Provavelmente, o menor teor de sólidos das micropartículas com PCE 2% tenha acelerado o processo de secagem no *spray drying*, reduzindo o tempo de permanência das partículas na câmara de secagem, em relação às demais, o que leva à rápida formação de uma crosta na partícula, dificultando a evaporação da água.

Os valores obtidos estão de acordo com outros estudos. Bajaj, Tang e Sabalni (2015) encontraram valores de 3,95% de umidade e de 0,18 para a_w , utilizando proteína isolada de ervilha na microencapsulação de óleo de linhaça. Da Silva et al. (2013), ao utilizarem goma arábica e amido OSA na encapsulação do EP, encontraram valores de umidade variando de 4,9 a 12,6% e de 0,25 a 0,39 para a_w , sendo os valores dependentes do material de parede e da concentração utilizada.

O baixo conteúdo de umidade é suficiente para garantir a estabilidade do material após saírem do *spray drying*, pois dessa forma as micropartículas não se aglomeram. A aglomeração de partículas com alta umidade poderia causar diminuição na retenção do composto bioativo, além de dificultar a dispersão do pó (da SILVA et al., 2013).

Todos os valores encontrados para a_w são considerados adequados para produtos secos por *spray drying*. A baixa a_w inibe o crescimento microbiano e afeta na redução da taxa relativa de reações oxidativas, o que confere maior estabilidade durante o armazenamento (QUIRINO LACERDA et al., 2016; dos REIS et al., 2017).

5.3.4. Microscopia Eletrônica de Varredura

Segundo as micrografias das MP não houve influência da concentração de PCE na morfologia das micropartículas (Figura 1: A, B, C), sendo que todas apresentaram rugosidades e tamanhos variados. Segundo Bajaj, Tang e Sabalni (2015) a grande variação de tamanho é uma característica das micropartículas obtidas na secagem por *spray drying*. Apesar disso, não foram observadas fissuras

nas micropartículas, o que indica uma melhor proteção dos compostos fenólicos da própolis.

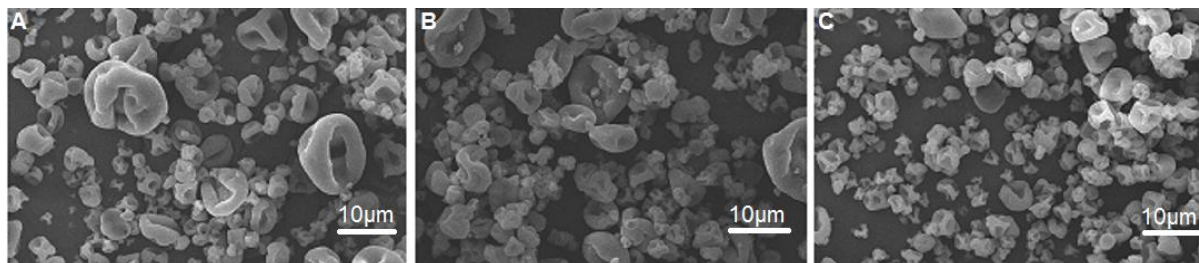


Figura 1. Micrografias de micropartículas de extrato de própolis por *spray drying* produzidas com: (A) Proteína concentrada de ervilha 2 % (PCE 2 %), (B) Proteína de concentrada de ervilha 4 % (PCE 4 %), e (C) Proteína de concentrada de ervilha 6 % (PCE 6 %) (ampliação $\times 1500$)

Esta característica já foi relatada por outros autores ao utilizarem proteínas como material de parede na produção de microcápsulas, como do trabalho de Costa et al. (2015), no qual foi utilizada proteína de ervilha na encapsulação de ácido linoleico conjugado por *spray drying*, pelo qual foi observado que ocorreu a formação de formato esférico porém com invaginações e rugosidades, além da agregação entre as microcápsulas. Guerin et al. (2017), ao microencapsularem *Lactobacillus rhamnosus* GG com proteína do soro de leite por *spray drying*, relataram a produção de partículas lisas, porém não esféricas e com rugosidades. Bruschi et al. (2003) ao microencapsularem EP utilizando gelatina e manitol por *spray drying*, também obtiveram micropartículas de superfície lisa, porém com rugosidades.

Segundo Gharsallaoui et al. (2012) a presença de açúcares de baixo peso molecular nas soluções que são atomizadas pode auxiliar na retenção de moléculas de água, evitando depressões na superfície das partículas. Porém, a presença do manitol no presente trabalho não apresentou o efeito esperado, pois não possibilitou a formação de partículas com superfícies lisas e uniformes.

5.3.5. Análise termogravimétrica

Todas as amostras apresentaram somente um nível de perda de massa (resultados não demonstrados), sendo correspondente a temperatura de decomposição dos constituintes. Na Tabela 4 estão apresentados os resultados das temperaturas iniciais (DTi) e finais (DTf) de decomposição e a perda de massa do EP, do PCE e das MP.

Tabela 4. Análise termogravimétrica dos constituintes das micropartículas (MP) com extrato de própolis (EP), e das MP com diferentes concentrações de proteína concentrada de ervilha (PCE)

Constituintes das MP	T _{di} (°C)	T _{df} (°C)	Perda de massa (%)
EP	214,63	370,58	55,52
PCE	278,94	427,46	62,84
MP com diferentes concentrações de PCE	T _{di} (°C)	T _{df} (°C)	Perda de massa (%)
2%	272,04	419,14	53,52
4%	262,52	454,48	60,85
6%	251,48	441,11	52,62

T_{di}= Temperatura de decomposição inicialT_{df}= Temperatura de decomposição final

As MP apresentaram o intervalo de temperatura de decomposição similar ao do material de parede, e uma redução nos valores de perda de massa. Porém quando comparado ao EP, observa-se que as MP apresentaram temperaturas de decomposição superior, refletindo em maior estabilidade térmica das MP, com destaque para a micropartícula formada com PCE 2 %. Estes resultados condizem com a alta eficiência de encapsulação desta micropartícula, o que demonstra que ocorreu uma maior interação entre a PCE e os compostos fenólicos do EP quando se utilizou 2% de PCE. Portanto, a proteção dos compostos fenólicos da própolis encapsulada pela matriz polimérica foi assim confirmada.

Xiaojing et al. (2015) produziram filmes com adição de diferentes concentrações de nanopartículas com proteína isolada de amendoim (0,5, 1,0, 2,0, 4,0%), e observaram uma maior temperatura de decomposição térmica em filmes com adição de 2% de nanopartículas quando comparado aos filmes produzidos somente com proteína isolada ou amido de milho.

5.3.6. Total de compostos fenólicos e atividade antioxidante das MP e dos bolos

O EP apresentou conteúdo significativamente superior do total de compostos fenólicos e da atividade antioxidante em relação as MP (Tabela 5). Estes resultados evidenciam perdas no conteúdo de compostos fenólicos e consequentemente na atividade antioxidante das MP, decorrentes das altas temperaturas utilizadas no *spray drying*. Dentre as MP, àquelas formadas com PCE 2% apresentaram significativamente teores maiores de total de compostos fenólicos em relação às demais.

Tabela 5. Total de compostos fenólicos e atividade antioxidante (DPPH) do extrato de própolis, das micropartículas de própolis e dos bolos

Tratamentos	Compostos fenólicos (mg EAG g ⁻¹)		DPPH (μmol TE g ⁻¹)	
	Micropartículas	Bolos	Micropartículas	Bolos
Controle	—	0,526±0,18 ^c	—	0,22±0,02 ^d
Extrato	43,82±0,52 ^a	11,45±0,85 ^a	51,12 ±2,58 ^a	5,36±0,69 ^c
PCE 2%	20,61±0,20 ^b	12,23±1,70 ^a	18,37 ±0,32 ^b	10,32±0,04 ^b
PCE 4%	11,09±0,19 ^c	5,47±0,20 ^b	18,21 ±0,49 ^b	11,71±0,08 ^a
PCE 6%	10,30±0,22 ^c	6,44±0,16 ^b	18,71 ±0,67 ^b	11,37±0,50 ^a

Médias acompanhadas por mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). PCE 2%: micropartícula produzida utilizando 2% de proteína concentrada de ervilha; PCE 4%: micropartícula produzida utilizando 4% de proteína concentrada de ervilha; PCE 6%: micropartícula produzida utilizando 6% de proteína concentrada de ervilha.

Entretanto, não houve diferenças nos valores de atividade antioxidante entre as MP. Isso pode ser explicado porque em todas as MP os compostos fenólicos presentes no EP se mantiveram, porém, geralmente em menores concentrações, dependendo da MP (Tabela 2). O trabalho de Souza et al. (2007) descreve resultados semelhantes, em que mesmo com perdas acima de 50,0% dos compostos fenólicos no EP, após a utilização do *spray drying*, a própolis seca demonstrou uma atividade antioxidante semelhante à do extrato, determinado pelo método DPPH.

Os maiores teores de compostos fenólicos no bolo foram obtidos com a aplicação das MP constituídas de PCE 2%, com 12,23 mg de compostos fenólicos por g de própolis (Tab. 5), sendo significativamente superior às demais micropartículas. Quando adicionado aos bolos, o EP sofreu degradação térmica, com redução de 74% dos compostos fenólicos. Porém, quando as MP foram adicionadas aos bolos, o percentual de degradação dos compostos fenólicos (PCE 2% = 41%, PCE 4% = 49% e PCE 6% = 38%) se mostrou inferior. Esses resultados demonstram que a encapsulação foi eficiente na proteção dos compostos fenólicos frente a altas temperaturas do forneamento do bolo.

Vale ressaltar que mesmo com as perdas de compostos fenólicos decorrentes da secagem por *spray drying*, a utilização das MP no bolo causou menor percentual de degradação dos compostos fenólicos. Além da temperatura de forneamento (150 °C), a redução no teor de compostos fenólicos deve ser atribuída às condições de

elaboração do bolo, como o batimento da massa, que pode promover uma liberação antecipada dos compostos da própolis.

A secagem por atomização é um método comum de produção de micropartículas, mas requer o uso de altas temperaturas, o que pode afetar negativamente a presença de alguns compostos bioativos do produto (PANG et al., 2014), devido aos compostos fenólicos do EP serem propensos à degradação térmica (da SILVA et al., 2011).

A atividade antioxidante das MP (antes da adição nos bolos) não diferiu, mesmo com diferenças significativas no teor total de compostos fenólicos (Tabela 5). Sabe-se que os compostos fenólicos agem em sinergismo para propiciar a atividade antioxidante (da ROSA et al., 2014) e conforme apresentado na tabela 1, todos os compostos fenólicos presentes no EP foram identificados nas MP, porém em menores quantidades.

No entanto, em relação à atividade antioxidante após aplicação do EP nos bolos, pode-se observar uma redução superior a 89% em relação ao EP antes do forneamento. Além disso, o bolo com adição de EP apresentou valor significativamente inferior àqueles bolos adicionados de MP, evidenciando que a encapsulação manteve a atividade antioxidante do EP mesmo após exposição a altas temperaturas.

5.3.7. Características físicas dos bolos

5.3.7.1. Índice de crescimento dos bolos

O bolo controle apresentou aumento de 12,67% na sua altura após o forneamento, enquanto que os bolos adicionados de EP (16,67%) e a MP formada com PCE 2 % (15,29%) apresentaram os maiores percentuais de crescimento (Tab. 6). No entanto, os bolos em que foi adicionado as MP com PCE 4% (9,46%) e com PCE 6% (10,82%) apresentaram altura de crescimento menor em relação ao bolo controle.

Tabela 6. Características físicas de bolos adicionados de extrato de própolis e micropartículas de extrato de própolis produzidas com proteína concentrada de ervilha (PCE) em diferentes concentrações (2, 4, e 6%)

Bolos	Índice de crescimento (%)	Coloração			
		L*	a*	b*	Croma
Controle	12,67±0,50c	70,16±2,39 ^a	-5,22±0,30 ^a	33,01±0,73 ^c	33,40±0,69 ^c
Extrato	16,67±0,90a	70,13±1,22 ^a	-4,00±0,30 ^a	35,94±0,64 ^b	36,39±0,42 ^b
PCE 2%	15,29±0,90b	71,63±1,20 ^a	-5,01±0,20 ^a	33,28±0,64 ^c	33,66±0,65 ^c
PCE 4%	9,46±0,30e	68,09±1,06 ^a	-4,62±0,20 ^a	38,99±0,97 ^a	39,26±0,95 ^a
PCE 6%	10,82±0,60d	69,09±1,01 ^a	-4,08±1,30 ^a	35,67 ±0,53 ^b	35,98±0,56 ^b

Médias acompanhadas por mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). mg EAG g⁻¹ = miligrama equivalente de ácido gálico por grama de amostra seca. µmol TE g⁻¹ = micrograma equivalente de trolox por grama de amostra seca.

Estes resultados demonstram que a adição das MP afetaram o crescimento dos bolos, e que o uso de PCE 2% é benéfico e aumenta o seu crescimento. No entanto, o aumento na concentração do material de parede (com 4% e 6% de PCE) impediu o crescimento dos bolos, que foi significativamente inferior ao bolo controle. Acredita-se que a alta concentração de proteína (MP com PCE 4% e com PCE 6%) e a diferença do tipo de proteína (concentrada de ervilha) em relação ao bolo controle (proteínas do ovo), foram responsáveis pelas diferenças no crescimento.

Lin et al. (2017) elaboraram bolos substituindo o uso do ovo pela proteína isolada de ervilha e relataram crescimento de 69-83%, enquanto que o bolo controle (uso de proteínas do ovo) apresentou crescimento de 95%, além disto, o uso de proteína isolada de ervilha resultou em bolos muito firmes.

5.3.7.2. Coloração dos bolos

Não foi observado influência significativa nos bolos com adição de EP ou das MP nos valores de L* e a*, em relação a amostra do bolo controle (Tabela 7). Porém, o EP e a MP influenciaram significativamente nos valores do parâmetro b* e croma obtidos para as amostras de bolo. O parâmetro b* é o mais característico para avaliação dos bolos (colorações do azul ao amarelo). O bolo com adição das micropartículas elaboradas com PCE 4%, PCE 6% e o bolo com a adição de EP apresentaram as maiores pigmentações, sendo significativamente superior a coloração do bolo controle e àquele elaborado com a MP com PCE 2%.

Constatou-se que, a adição de altas concentrações de PCE (4 e 6%) nas MP influenciou na coloração dos bolos, conforme os resultados da coloração na tabela 6 e da avaliação sensorial na tabela 7. O alto valor de b^* no bolo com EP é atribuído à cor em tom marrom natural da própolis que influenciou a coloração amarela do bolo. Segundo da Silva et al. (2013) o extrato de própolis possui altas concentrações de flavonoides, que são pigmentos que induzem a coloração amarela.

No entanto, o bolo com adição de PCE 2% foi o único que não diferiu do bolo controle, ou seja, a menor concentração da PCE (2%) não alterou a coloração do bolo. Este resultado é de grande importância para futuras aplicações do EP microencapsulado em alimentos, visto que não alterou as características visuais do produto analisado. A avaliação sensorial também suportou esse resultado (Tabela 6).

Pasrija et al. (2015) relataram comportamento semelhante em relação a adição de extrato de chá verde ou de microcápsulas em pão. Os autores observaram que os pães incorporados de microcápsulas de chá verde exibiram melhores resultados na coloração do que a adição do extrato de chá verde puro. Rocha et al. (2012) ao avaliarem a adição de microcápsulas de licopeno utilizando amido modificado (Capsul) em bolos, constataram uma coloração mais homogênea nesses bolos do que o bolo com adição do licopeno livre.

5.3.8. Análise sensorial dos bolos

Na tabela 7 estão apresentados os valores dos parâmetros avaliados na análise sensorial para o bolo controle, o bolo com EP, e o bolo com a adição de MP com PCE 2% (escolhida para aplicação devido aos resultados anteriores).

Tabela 7. Média das notas da avaliação sensorial do bolo controle e dos bolos adicionados de extrato de própolis (EP) e micropartículas de extrato de própolis com 2% de proteína concentrada de ervilha (MP PCE 2%)

Bolos	Cor	Odor	Gosto	Textura
Controle	5,18±0,67	5,37±1,01	5,42±1,10	5,52±1,00
EP	4,35±0,85*	4,04±1,06*	3,69±1,16*	4,08±0,91*
MP PCE 2 %	5,14±0,80	5,32±0,9	5,33±1,01	5,32±1,12

Os atributos cor, odor, gosto e textura foram medidos em relação ao bolo controle no teste de comparação múltipla com uma escala de 9 pontos (1 = extremamente inferior, 2 = muito inferior, 3 = moderadamente inferior, 4 = ligeiramente inferior, 5 = igual ao controle, 6 = ligeiramente melhor, 7 = moderadamente melhor, 8 = muito melhor e 9 = extremamente melhor). Bolo controle feito sem adição de extrato de própolis e sem adição de MP PCE 2 %. O bolo controle foi identificado e

oferecido aos avaliadores como amostra Controle, e também oferecido juntamente com os bolos com extrato e com MP. Média de três repetições $\pm$ desvio padrão. * Significativo em relação ao bolo controle pelo teste de Dunnett ($p \leq 0,05$).

Pode-se observar que a adição do EP puro aos bolos ocasionou diferença significativa nos atributos cor, odor, gosto e textura em relação ao bolo controle. Os valores médios obtidos para o bolo com o EP foram os menores, com notas entre 3,69 (moderadamente inferior ao bolo controle) a 4,35 (ligeiramente inferior ao bolo controle). Assim, foi observado que a adição do EP inferiu negativamente nos atributos de cor, odor, gosto e textura dos bolos.

A percepção da diferença do bolo com EP em relação ao bolo controle pode ser devido ao forte sabor e odor da própolis que permaneceu no produto. De acordo com Çam et al. (2014) os compostos fenólicos conferem sabor adstringente, e sua percepção depende da quantidade presente e da composição dos alimentos.

Por outro lado, não foi observada diferença significativa nos atributos avaliados do bolo com a adição de MP PCE 2%, em relação ao bolo controle. Isso é uma indicação que a microencapsulação foi eficiente para mascarar o sabor e odor forte da própolis.

Mendanha et al. (2009) ao microencapsularem o hidrolisado de caseína por coacervação complexa utilizando pectina e proteína isolada de soja obtiveram microcápsulas com atenuação da amargura da caseína. Alguns autores encapsularam extratos e coprodutos da própolis para mascarar seus sabores quando aplicado em produtos cárneos. Bernardi et al. (2013) ao microencapsularem EP utilizando pectina e proteína isolada de soja por coacervação complexa, aplicaram as mesmas em salame tipo italiano e, após a análise sensorial constataram que o salame que recebeu a adição de microcápsulas foi mais aceito do que o salame que teve adição do EP, confirmando que a encapsulação foi efetiva para atenuar o sabor e aroma da própolis. Spinelli et al. (2015) produziram microcápsulas de EP utilizando goma arábica e Capsul em diferentes proporções, e aplicaram em hambúrguer de peixe, onde os resultados demonstraram uma avaliação sensorial positiva. Dos Reis et al. (2017) microencapsularam o coproduto do EP utilizando Capsul, e os resultados demonstraram que os hambúrgueres com adição de microcápsulas obtiveram boa aceitação sensorial quando aplicados em hambúrgueres (63,80%), porém inferiores do que o hambúrguer controle (sem adição de microcápsulas, 72,04%).

5.4. Conclusão

As micropartículas de EP utilizando como material de parede PCE 2 %, PCE 4 % e PCE 6 % apresentaram umidade e a_w satisfatórias para o seu armazenamento; sendo que a redução da perda de massa e o aumento da estabilidade térmica de todas as micropartículas são um indicativo da confirmação da encapsulação. No entanto, a micropartícula com 2 % de proteína concentrada de ervilha pode ser considerada a mais adequada para aplicação em bolo, pois apresentou maior eficiência de encapsulação, maior teor de compostos fenólicos e coloração próxima do bolo controle.

A microencapsulação do extrato de própolis com PCE 2% por *spray drying* mascarou a cor, odor e o sabor do extrato de própolis quando aplicadas em bolos. As micropartículas produzidas neste estudo podem agregar valor nutricional para o produto em que são incorporados devido aos compostos fenólicos presentes, que conferem diversas propriedades biológicas. Estudos futuros envolvendo ensaios moleculares específicos para caracterizar as possíveis modificações nas proteínas e nas micropartículas são recomendadas.

Agradecimentos

Gostaríamos de agradecer à CAPES pela concessão da bolsa de doutorado, a FAPERGS pelo apoio financeiro e ao CEME-SUL (FURG) pela análise de MEV e difração de Raios-X.

Referências

A.O.A.C. Official method of analysis of AOAC International. 16th ed. Virginia, USA: AOAC International, 1995.

BAJAJ, P. R.; TANG, J.; SABLANI, S. S. Pea protein isolates: novel wall materials for microencapsulating flaxseed oil. **Food Bioprocess and Technology**, v. 8, p. 2418-2428, 2015.

BERNARDI, S.; FAVARO -TRINDADE, C. S.; TRINDADE, M.A.; BALIEIRO, J.C.C.; CAVENAGHI, A.D.; CONTRERAS-CASTILLO, C. J. Italian -type salami with propolis as antioxidant. **Italian Journal of Food Science**, v. 25, p. 433-440, 2013.

BUSCH, V. M.; PEREYRA-GONZALEZ, A.; SEGATIN, N.; SANTAGAPITA, P. R.; ULRIH N. P.; BUERA, M. P. Propolis encapsulation by spray drying: Characterization and stability. **LWT - Food Science and Technology**, v. 75, p. 227-235, 2017.

BUFALO, M. C.; FERREIRA, I.; COSTA, G.; FRANCISCO, V.; LIBERAL, J.; CRUZ, M. T.; SFORCIN, J. M. Propolis and its constituent caffeic acid suppress LPS-stimulated pro-inflammatory response by blocking NF-kappaB and MAPK activation in macrophages. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 149, p. 84–92, 2013.

BRAND-WILLIAMS, W., CUVELIER, M. E., BERSET, C. Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. **LWT - Food Science and Technology**, v. 28, p. 25-30, 1995.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento. Instrução Normativa nº 3, de 19 de janeiro de 2001. Aprova os regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade de Apitoxina, Cera de Abelha, Geléia Real, Geléia Real Liofilizada, Pólen Apícola, Própolis e Extrato de Própolis, conforme consta dos Anexos desta Instrução Normativa. **Diário Oficial da União** de 23/01/2001, Seção 1, Página 18.

BRUSCHI, M. L.; CARDOSO, M. L. C.; LUCCHESI, M. B.; GREMIÃO, M. P. D. Gelatin microparticles containing propolis obtained by spray-drying technique: preparation and characterization. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 264, p. 45–55, 2003.

ÇAM, M.; IÇYER, N. C.; ERDOGAN, F. Pomegranate peel phenolics: Microencapsulation, storage stability and potential ingredient for functional food development. **LWT - Food Science and Technology**, v. 55, p. 117-123, 2014.

CHAO, D.; JUNG, S.; ALUKO, R. E. Physicochemical and functional properties of high pressure-treated isolated pea protein. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 45, p. 179–185, 2018.

COSTA, A. M. M.; NUNES, J. C.; LIMA, B. N. B.; PEDROSA, C.; CALADO, V.; TORRES, A. G.; PIERUCCI, A. P. T. R. Effective stabilization of CLA by microencapsulation in pea protein. **Food Chemistry**, v. 168, p. 157–166, 2015.

ELBAZ, N. M.; KHALIL, I. A.; ABD-RABOU, A. A.; EL-SHERBINY, I. M. Chitosan-based nano-in-microparticle carriers for enhanced oral delivery and anticancer activity of propolis. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 92, p. 254–269, 2016.

EZHILARASI, P. N.; INDRANI, D.; JENA, B. S.; ANANDHARAMAKRISHNAN, C. Microencapsulation of Garcinia fruit extract by spray drying and its effect on bread quality. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 94, p. 1116-1123, 2014.

FILOMENI, G.; GRAZIANI, I.; DE ZIO, D.; DINI, L.; CENTONZE, D.; ROTILIO, G.; CIRIOLO, M. R. Neuroprotection of kaempferol by autophagy in models of rotenone-mediated acute toxicity: Possible implications for Parkinson's disease. **Neurobiology of Aging**, v. 33(4), p. 767–785, 2012.

FRANCHIN, M.; FREIRES, I. A.; LAZARINI, J. G.; NANI, B. D.; DA CUNHA, M. G.; COLÓN, D. F.; ROSALEN, P. L. The use of Brazilian propolis for discovery and development of novel anti-inflammatory drugs. **European Journal of Medicinal Chemistry**, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.06.050>

GHARSALLAOUI, A.; SAUREL, R.; CHAMBIN, O.; VOILLEY, A. Pea (*Pisum sativum*, L.) Protein Isolate Stabilized Emulsions: A Novel System for Microencapsulation of Lipophilic Ingredients by Spray Drying. **Food Bioprocess Technology**, v. 5, p. 2211–2221, 2012.

GHORBANZADE, T.; JAFARI, S. M.; AKHAVAN, S.; HADAVI, R. Nano-encapsulation of fish oil in nano-liposomes and its application in fortification of yogurt. **Food Chemistry**, v. 216, p. 146–152, 2017.

GÓMEZ-ESTACA, J.; GAVARA, R.; HERNÁNDEZ-MUÑOZ, P. Encapsulation of curcumin in electrosprayed gelatin microspheres enhances its bioaccessibility and widens its uses in food applications. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 29, p. 302–307, 2015.

GUERIN, J.; PETIT, J.; BURGAIN, J.; BORGES, F.; BHANDARI, B.; PERROUD, C.; DESOBRY, S.; SCHER, J.; GAIANI, C. Lactobacillus rhamnosus GG encapsulation by spray-drying: Milk proteins clotting control to produce innovative matrices. **Journal of Food Engineering**, v. 193, p. 10-19, 2017.

HOFFMANN, J. F.; ZANDONÁ, G. P.; SANTOS, P. S. DOS; DALLMANN, C. M.; MADRUGA, F. B.; ROMBALDI, C. V.; CHAVES, F. C. Stability of bioactive compounds in butiá (*Butia odorata*) fruit pulp and nectar. **Food Chemistry**, v. 237, p. 638–644, 2017.

JIA, Z.; DUMONT, M.-J.; ORSAT, V. Encapsulation of phenolic compounds present in plants using protein matrices. **Food Bioscience**, v. 15, p. 87–104, 2016.

JOYE, I. J.; MCCLEMENTS, D. J. Biopolymer-based nanoparticles and microparticles: fabrication, characterization, and application. **Current Opinion in Colloid Interface Science**, v. 19 (5), p. 417–427, 2014.

LIN, M.; TAY, S. H.; YANG, H.; YANG, B.; LI, H. Formulation optimization of lecithin-enhanced pickering emulsions stabilized by chitosan nanoparticles for hesperidin encapsulation. **Food Hydrocolloids**, v. 69, p. 440-449, 2017.

MENDANHA, D. V.; ORTIZ, S. E. M.; FAVARO-TRINDADE, C. S.; MAURI, A.; MONTERREY-QUINTERO, E. S.; THOMAZINI, M. Microencapsulation of casein hydrolysate by complex coacervation with SPI/pectin. **Food Research International**, v. 42, p. 1099–1104, 2009.

do NASCIMENTO, T. G.; SILVA, P. F. Da; AZEVEDO, L. F.; ROCHA, L. G. DA; PORTO, I. C. C. DE M.; MOURA, T. F. A. L.; BASÍLIO-JÚNIOR, I. D.; GRILLO, L. A. M.; DORNELAS, C. B.; FONSECA, E. J. DA S.; OLIVEIRA, E. DE J.; ZHANG, A. T.; WATSON, D. G. Polymeric Nanoparticles of Brazilian Red Propolis Extract: Preparation, Characterization, Antioxidant and Leishmanicidal Activity. **Nanoscale Research Letters**, v. 11:301, p. 1-16, 2016.

PELLATI, F.; ORLANDINIA, G.; PINETTI, D.; BENVENUTI, S. HPLC-DAD and HPLC-ESI-MS/MS methods for metabolite profiling of propolis extracts. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 55, p. 934–948, 2011.

PANG, S. F.; YUSOFF, M. M.; GIMBUN, J. Assessment of phenolic compounds stability and retention during spray drying of Orthosiphon stamineus extracts. **Food Hydrocolloids**, v. 37, p. 159-165, 2014.

PASRIJA, D.; EZHILARASI, P. N.; INDRANI, D.; ANANDHARAMAKRISHNAN, C. Microencapsulation of green tea polyphenols and its effect on incorporated bread quality. **LWT - Food Science and Technology**, v. 64, p. 289-296, 2015.

QUIRINO LACERDA, E. C.; DE ARAÚJO, C.V. M.; MONTEIROC, M.; FINOTELLID, P. V.; GUEDES TORRESA, A.; PERRONE, D. Starch, inulin and maltodextrin as encapsulating agents affect the quality and stability of jussara pulp microparticles. **Carbohydrate Polymers**, v. 151, p. 500–510, 2016.

DOS REIS, A. S.; DIEDRICH, C.; MOURA, C. DE; PEREIRA, D.; ALMEIDA, J. DE F.; DA SILVA, L. D.; CARPES, S. T. Physico-chemical characteristics of microencapsulated propolis co-product extract and its effect on storage stability of

burger meat during storage at 15 °C. **LWT - Food Science and Technology**, v. 76 (B), p. 306-313, 2017.

ROCHA, G. A.; FÁVARO-TRINDADE, C. S.; GROSSO, C. R. F. Microencapsulation of lycopene by spray drying: Characterization, stability and application of microcapsules. **Food and Bioproducts Processing**, v. 90, p. 37–42, 2012.

DA ROSA, C. G.; BORGES, C. D.; ZAMBIAZI, R. C.; RUTZ, J. K.; DA LUZ, S. R.; KRUMREICH, F. D.; BENVENUTTI, E. V.; NUNES, M. R. Encapsulation of the phenolic compounds of the blackberry (*Rubus fruticosus*). **LWT - Food Science and Technology**, v. 58, p. 527-533, 2014.

da SILVA, F. C.; FAVARO-TRINDADE, C. S.; DE ALENCAR, S. M.; THOMAZINI, M.; BALIEIRO, J. C. C. Physicochemical properties, antioxidant activity and stability of spray-dried propolis. **Journal of ApiProduct and ApiMedical Science**, v. 3 (2), p. 94 – 100, 2011.

da SILVA, F. C.; DA FONSECA, C. R.; DE ALENCAR, S. M.; THOMAZINI, M.; BALIEIRO, J. C. De C.; PITTIA, P.; FAVARO-TRINDADE, C. S. Assessment of production efficiency, physicochemical properties and storage stability of spray-dried propolis, a natural food additive, using gum Arabic and OSA starch-based carrier systems. **Food and Bioproducts Processing**, v. 91, p. 28–36, 2013.

SILVA, J. C.; RODRIGUES, S.; FEÁS, X.; ESTEVINHO, L. M. Antimicrobial activity, phenolic profile and role in the inflammation of propolis. **Food and Chemical Toxicology**, v. 50, p. 1790–1795, 2012.

SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTÓS, R. M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. **Methods In Enzymology**, v. 299, p. 152-178, 1999.

SPINELLI, S.; CONTE, A.; LECCE, L.; INCORONATO, A. L.; NOBILE, A. D. M. Microencapsulated propolis to enhance the antioxidant properties of fresh fish burgers. **Journal of Food Process Engineering**, v. 38, p. 527–535, 2015.

SZLISZKA, E.; CZUBA, Z. P.; DOMINO, M.; MAZUR, B.; ZYDOWICZ G.; KROL, W. Ethanol Extract of Propolis (EEP) Enhances the Apoptosis- Inducing Potential of TRAIL in Cancer Cells. **Moléculas**, v.14 (2), p. 738-754, 2009.

TRIFKOVIĆ, K. T.; MILAŠINOVIĆ, N. Z.; DJORDJEVIĆ, V. B.; KRUŠIĆ, M. T.; KNEŽEVIĆ-JUGOVIĆ, Z. D., NEDOVIĆ, V. A.; BUGARSKI, B. M. Chitosan

microbeads for encapsulation of thyme (*Thymus serpyllum* L.) polyphenols. **Carbohydrate Polymers**, v. 111, p. 901–907, 2014.

VON STASZEWSKI, M.; JARA, F. L.; RUIZ, A. L. T. G.; JAGUS, R. J.; CARVALHO, J. E.; PILOSO, A. M. R. Nanocomplex formation between b-lactoglobulin or caseinomacropeptide and green tea polyphenols: Impact on protein gelation and polyphenols antiproliferative activity. **Journal of Functional Foods**, v. 4, n. 4, p. 800–809, 2012.

XIAOJING, L.; NA, J.; CHAO, Q.; MINGTAO, X.; LIU, X.; QINGJIE, S. The effect of peanut protein nanoparticles on characteristics of protein- and starch-based nanocomposite films: A comparative study. **Industrial Crops and Products**, v. 77, p. 565–574, 2015.

6. Considerações finais

As técnicas de DSC, TGA, ATR-FTIR, e Difração de raios-X possibilitaram a confirmação da microencapsulação do extrato de própolis com diferentes proteínas. Independente da proteína utilizada como material de parede na microencapsulação de própolis obteve-se micropartículas de formato irregular, com rugosidades e diferentes tamanhos, o que foi atribuído ao método de encapsulação empregado, *spray drying*.

No entanto, dentre as proteínas utilizadas, a maior eficiência de encapsulação, atividade antioxidante e rendimento, foram obtidos com a proteína concentrada de ervilha como material de parede. Além disso, sua aplicação demonstrou ser adequada para a produção de queijo Minas Frescal, devido a maior liberação dos compostos fenólicos no intestino durante a digestão gastrointestinal.

Ao analisar diferentes concentrações do extrato de própolis e do material de parede, os melhores resultados para a atividade antioxidante e antimicrobiana foram obtidos com as micropartículas onde se utilizou 5% de extrato e 2% de proteína concentrada de ervilha. Porém, a adição do manitol como tentativa de otimizar o rendimento e melhorar a morfologia através da diminuição da agregação das micropartículas e das rugosidades destas não apresentou diferença nas formulações.

Os resultados microbiológicos de CIM e CBM demonstraram que a atividade antibacteriana do extrato de própolis puro foi mantida com a microencapsulação somente para as micropartículas com 2% de proteína de ervilha como material de parede, possivelmente devido a essa concentração de material de parede permitir a permeação do extrato de própolis para o interior da célula microbiana. Além disso, as micropartículas só tiveram atividade frente às bactérias Gram-positivas.

Após a aplicação da micropartícula de própolis em bolo, houve a redução nos compostos fenólicos e na atividade antioxidante. Porém, os resultados da análise sensorial demonstraram que o bolo fortificado com micropartículas utilizando 2% de proteína concentrada de ervilha e 5% de extrato de própolis resultou em características de cor, odor, sabor e textura semelhante ao bolo controle, evidenciando que a microencapsulação mascarou as propriedades sensoriais do extrato de própolis.

Referências

ALENCAR, S. M., OLDONI, T. L. C., CASTRO, M. L., CABRAL, I. S. R., COSTA-NETO, C. M., CURY, J. A., ROSALEN, P. L., IKEGAKI, M. Chemical composition and biological activity of a new type of Brazilian propolis: red propolis. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 113 (2), p. 278-283, 2007.

ALMEIDA, E. T. DA CRUZ; SILVA, M. C. D. DA; OLIVEIRA, R. K.; ARRUDA, R. E. DOS S.; VIEIRA, D. A. SILVA, V. DA C.; ESCODRO, P. B.; BASÍLIO-JÚNIORA, I. D.; NASCIMENTO, T. G. do. Chemical and microbiological characterization of tinctures and microcapsules loaded with Brazilian red propolis extract. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, v. 7(5), p. 280-287, 2017.

ANDRADE, J. K. S., DENADAI, M., DE OLIVEIRA, C. S., NUNES, M. L., NARAIN, N. Evaluation of bioactive compounds potential and antioxidant activity of brown, green and red propolis from Brazilian northeast region. **Food Research International**, v. 101, p. 129-138, 2017.

A.O.A.C. Official method of analysis of AOAC International. 16th ed. Virginia, USA: AOAC International, 1995.

ARZENI, C., PEREZ, O. E., LEBLANC, J. G., PILOSOFF, A. M. R. Egg albumin-folic acid nanocomplexes: Performance as a functional ingredient and biological activity. **Journal of Functional Foods**, v. 18, p. 379-386, 2015.

BAJAJ, P. R., TANG, J., SABLANI, S. S. Pea protein isolates: novel wall materials for microencapsulating flaxseed oil. **Food Bioprocess and Technology**, v. 8, p. 2418-2428, 2015.

BERNARDI, S., FAVARO -TRINDADE, C.S., TRINDADE, M.A., BALIEIRO, J.C.C., CAVENAGHI, A.D., CONTRERAS-CASTILLO, C.J. Italian -type salami with propolis as antioxidant. **Italian Journal of Food Science**, v. 25, p. 433-440, 2013.

BOTREL, D.A., DE BARROS FERNANDE, R.V., BORGES, S.V., YOSHIDA, M.I. Influence of wall matrix systems on the properties of spray-dried microparticles containing fish oil. **Food Research International**, v. 62, p. 344–352, 2014.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. **LWT - Food Science and Technology**, v. 28,p. 25-30, 1995.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento. Instrução Normativa nº 3, de 19 de janeiro de 2001. Aprova os regulamentos Técnicos de

Identidade e Qualidade de Apitoxina, Cera de Abelha, Geléia Real, Geléia Real Liofilizada, Pólen Apícola, Própolis e Extrato de Própolis, conforme consta dos Anexos desta Instrução Normativa. **Diário Oficial da União** de 23/01/2001, Seção 1, Página 18.

BRUSCHI, M. L., CARDOSO, M. L. C., LUCCHESI, M. B., GREMIÃO, M. P. D. Gelatin microparticles containing propolis obtained by spray-drying technique: preparation and characterization. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 264, p. 45–55, 2003.

BUSCH, V. M., PEREYRA-GONZALEZ, A., SEGATIN, N., SANTAGAPITA, P. R., ULRICH N. P., BUERA, M. P. Propolis encapsulation by spray drying: Characterization and stability. **LWT - Food Science and Technology**, v. 75, p. 227-235, 2017.

BUFALO, M. C.; FERREIRA, I.; COSTA, G.; FRANCISCO, V.; LIBERAL, J.; CRUZ, M. T.; SFORCIN, J. M. Propolis and its constituent caffeic acid suppress LPS-stimulated pro-inflammatory response by blocking NF-kappaB and MAPK activation in macrophages. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 149, p. 84–92, 2013.

CABRAL, I. S. R. et al. Composição fenólica, atividade antibacteriana e antioxidante da própolis vermelha brasileira. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 6, p. 1523-1527, 2009.

CASTRO, C.; MURA, F.; VALENZUELA, G.; FIGUEROA, C.; SALINAS, R.; ZUÑIGA, M. C.; TORRES, J. L.; E FUGUET, E.; DELPORTE, C. Identification of phenolic compounds by HPLC-ESI-MS/MS and antioxidant activity from Chilean propolis. **Food Research International**, v. 64, p. 873–879, 2014.

ÇAM, M., IÇYER, N. C., ERDOGAN, F. Pomegranate peel phenolics: Microencapsulation, storage stability and potential ingredient for functional food development. **LWT - Food Science and Technology**, v. 55, p. 117-123, 2014.

CHAO, D.; JUNG, S.; ALUKO, R. E. Physicochemical and functional properties of high pressure-treated isolated pea protein. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 45, p. 179–185, 2018.

CHOTIKO, A.; SUBRAMANIAM SATHIVEL, S. Three protective agents for pectin-rice bran capsules for encapsulating *Lactobacillus plantarum*. **Food Bioscience**. v. 16, p. 56–65, 2016.

COSTA, A. M. M., NUNES, J. C., LIMA, B. N. B., PEDROSA, C., CALADO, V., TORRES, A. G., PIERUCCI, A. P. T. R. Effective stabilization of CLA by microencapsulation in pea protein. **Food Chemistry**, v. 168, p. 157–166, 2015.

CUEVAS-BERNARDINO, J. C.; LEYVA-GUTIERREZ, F. M. A.; VERNON-CARTER, E. J.; LOBATO-CALLEROS, C.; ROM, A.; ROMÁN-GUERRERO, A.; DAVIDOV-PARDO, G. Formation of biopolymer complexes composed of pea protein and mesquite gum e Impact of quercetin addition on their physical and chemical stability. **Food Hydrocolloids**, v. 77, p. 736-745, 2018.

DEVI, N.; SARMAH, M.; KHATUN, B.; MAJI, T. K. Encapsulation of active ingredients in polysaccharide–protein complex coacervates. **Advances in Colloid and Interface Science**, v.239, p136-145, 2017.

DIAS, D. R.; BOTREL, D. A.; FERNANDES, R. V. DE B.; BORGES, S. V. Encapsulation as a tool for bioprocessing of functional foods. **Current Opinion in Food Science**, v. 13, p. 31–37, 2017.

DURÁN, N., MARCATO, P. D., BUFFO, C. M. S., AZEVEDO, M. M. M. DE; ESPOSITO, E. Poly(ϵ -caprolactone)/propolis extract: microencapsulation and antibacterial activity evaluation. **Pharmazie**, v. 62, p. 287–290, 2007.

ELBAZ, N. M., KHALIL, I. A.; ABD-RABOU, A. A., EL-SHERBINY, I. M. Chitosan-based nano-in-microparticle carriers for enhanced oral delivery and anticancer activity of própolis. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 92, p. 254–269, 2016.

EZHILARASI, P. N., INDRANI, D., JENA, B. S., ANANDHARAMAKRISHNAN, C. Microencapsulation of Garcinia fruit extract by spray drying and its effect on bread quality. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 94, p. 1116-1123, 2014.

FALCÃO, S., VILAS-BOAS, M., ESTEVINHO, L. M., BARROS, C., DOMINGUES, M. R. M., CARDOSO, S. M. Phenolic characterization of Northeast Portuguese Propolis: usual and unusual compounds. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 396, p. 887-897, 2010.

FILOMENI, G.; GRAZIANI, I.; DE ZIO, D.; DINI, L.; CENTONZE, D.; ROTILIO, G.; CIRIOLO, M. R. Neuroprotection of kaempferol by autophagy in models of rotenone-mediated acute toxicity: Possible implications for Parkinson's disease. **Neurobiology of Aging**, v. 33(4), p. 767–785, 2012.

FIRUZI, O., LACANNA, A., PETRUCCI, R., MARROSU, G., SASO, L. Evaluation of the antioxidant activity of flavonoids by "ferric reducing antioxidant power" assay and cyclic voltammetry. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1721, p. 174–184, 2005.

FRANCHIN, M.; FREIRES, I. A., LAZARINI, J. G., NANI, B. D., DA CUNHA, M. G., COLÓN, D. F., ROSALEN, P. L. Review. The use of Brazilian propolis for discovery and development of novel anti-inflammatory drugs. **European Journal of Medicinal Chemistry**, 2017 <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.06.050>

DE FRANCISCO, L.; PINTO, D.; ROSSETO, H.; TOLEDO, L.; SANTOS, R.; TOBALDINI-VALÉRIO, F.; SVIDZINSKI, T.; BRUSCHI, M.; SARMENTO, B.; OLIVEIRA, M. B. P. P.; RODRIGUES, F. Evaluation of radical scavenging activity, intestinal cell viability and antifungal activity of Brazilian propolis by-product. **Food Research International**, v.105, p. 537–547, 2018.

FUTURE, M. R. (2016). Global & US Propolis Market Research Report – Forecast 2016–2027. <https://www.marketresearchfuture.com/reports/propolis-market>.

GALLARDO, G.; GUIDA, L.; MARTINEZ, V.; LÓPEZ, M. C.; BERNHARDT, D.; BLASCO, R.; PEDROZA-ISLAS, R.; HERMIDA, L. G. Microencapsulation of linseed oil by spray drying for functional food application. **Food Research International**, v. 52, p. 473–482, 2013.

GHARSALLAOUI, A., SAUREL, R., CHAMBIN, O., VOILLEY, A. Pea (*Pisum sativum*, L.) Protein Isolate Stabilized Emulsions: A Novel System for Microencapsulation of Lipophilic Ingredients by Spray Drying. **Food Bioprocess Technology**, v. 5, p. 2211–2221, 2012.

GHORBANZADE, T., JAFARI, S. M., AKHAVAN, S., HADAVI, R. Nano encapsulation of fish oil in nano-liposomes and its application in fortification of yogurt. **Food Chemistry**, v. 216, p. 146–152, 2017.

GOUIN, S. Microencapsulation. **Trends in Food Science & Technology**, v. 15, p. 330–347, 2004.

GÓMEZ-ESTACA, J., GAVARA, R., HERNÁNDEZ-MUÑOZ, P. Encapsulation of curcumin in electrosprayed gelatin microspheres enhances its bioaccessibility and widens its uses in food applications. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 29, p. 302–307, 2015.

GONÇALVES, N. D.; PENA, F. DE L.; SARTORATTO, A.; DERLAMELINA, C.; DUARTE, M. C. T.; ANTUNES, A. E. C.; PRATA, A. S. Encapsulated thyme (*Thymus vulgaris*) essential oil used as a natural preservative in bakery product. **Food Research International**, v. 96, p. 154–160, 2017.

GREGORIS, E.; STEVANATO, R. Correlations between polyphenolic composition and antioxidant activity of Venetian propolis. **Food Chemistry**, London, v. 48, n. 1, p. 76-82, 2010.

GUERIN, J.; PETIT, J.; BURGAIN, J.; BORGES, F.; BHANDARI, B.; PERROUD, C.; DESOBRY, S.; SCHER, J.; GAIANI, C. Lactobacillus rhamnosus GG encapsulation by spray-drying: Milk proteins clotting control to produce innovative matrices. **Journal of Food Engineering**, v. 193, p. 10-19, 2017.

HOFFMANN, J. F., ZANDONÁ, G. P., SANTOS, P. S. DOS, DALLMANN, C. M., MADRUGA, F. B., ROMBALDI, C. V., CHAVES, F. C. Stability of bioactive compounds in butiá (*Butia odorata*) fruit pulp and nectar. **Food Chemistry**, v. 237, p. 638–644, 2017.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e estatística. Apicultura, 2013. [online] Disponível na internet via WWW URL: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/pesquisas/sintese.php> Acesso em: 11.06.2017.

JAFARINEJAD, S.; GILANI, K.; MOAZENI, E.; GHAZI-KHANSARI, M.; NAJAFABADI, A. R.; MOHAJEL, N. Development of chitosan-based nanoparticles for pulmonary delivery of itraconazole as dry powder formulation. **Powder Technology**, v. 222, p. 65–70, 2012.

JIA, Z.; DUMONT, M-J.; ORSAT, V. Encapsulation of phenolic compounds present in plants using protein matrices. **Food Bioscience**, v. 15, p. 87–104, 2016.

JOYE, I. J.; MCCLEMENTS, D. J. Biopolymer-based nanoparticles and microparticles: fabrication, characterization, and application. **Current Opinion in Colloid Interface Science**, v. 19 (5), p. 417–427, 2014.

KOGA, C. C.; SOO-YEU, L.; YOUNGSOO, L. Consumer Acceptance of Bars and Gummies with Unencapsulated and Encapsulated Resveratrol. **Journal of Food Science**, v. 81 (5), p. 1222-1229, 2016.

LIN, M.; TAY, S. H.; YANG, H.; YANG, B.; LI, H. Formulation optimization of lecithin-enhanced pickering emulsions stabilized by chitosan nanoparticles for hesperidin encapsulation. **Food Hydrocolloids**, v. 69, p. 440-449, 2017.

MASCHERONI, E.; FIGOLI, A.; MUSATTI, A.; LIMBO, S.; DRIOLI, E.; SUEVO, R.; ROLLINI, M. An alternative encapsulation approach for production of active chitosan–propolis beads. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 49, p. 1401–1407, 2014.

MATSUDA, A. H.; ALMEIDA-MURADIAN, L. B. Validated method for the quantification of Artepillin C in Brazilian propolis. **Phytochemical Analysis**, Sussex, v. 19, n. 2, p. 179-183, 2008.

MASTERS, K. **Spray drying handbook**. 5th ed., London: Longman Scientific & Technical, 725p, 1991.

MENDANHA, D. V., ORTIZ, S. E. M., FAVARO-TRINDADE, C. S., MAURI, A., MONTERREY-QUINTERO, E. S., THOMAZINI, M. Microencapsulation of casein hydrolysate by complex coacervation with SPI/pectin. **Food Research International**, v. 42, p. 1099–1104, 2009.

MOSER, P., TELIS, V. R. N., NEVES, N. DE A., GARCÍA-ROMERO, E., GÓMEZ-ALONSO, S., HERMOSÍN-GUTIÉRREZ, I. Storage stability of phenolic compounds in powdered BRS Violeta grape juice microencapsulated with protein and maltodextrin blends. **Food Chemistry**, v. 214, p. 308–318, 2017.

DO NASCIMENTO, T. G., SILVA, P. F. DA, AZEVEDO, L. F., ROCHA, L. G. DA; PORTO, I. C. C. DE M., MOURA, T. F. A. L., BASÍLIO-JÚNIOR, I. D., GRILLO, L. A. M., DORNELAS, C. B., FONSECA, E. J. DA S., OLIVEIRA, E. DE J., ZHANG, A. T., WATSON, D. G. Polymeric Nanoparticles of Brazilian Red Propolis Extract: Preparation, Characterization, Antioxidant and Leishmanicidal Activity. **Nanoscale Research Letters**, 11:301, 2016, DOI 10.1186/s11671-016-1517-3

NESTERENKO, A., ALRIC, I., SILVESTRE, F., DURRIEU, V. Review. Vegetable proteins in microencapsulation: A review of recent interventions and their effectiveness. **Industrial Crops and Products**, v. 42, p. 469– 479, 2013.

NETO, M. S. R.; TINTINO, S. R.; DA SILVA, A. R. P.; COSTA, M. DO S.; BOLIGON, A. A.; MATIAS, E. F. BALBINO, V. DE Q.; MENEZES, I. R. A.; COUTINHO, H. D. M. Seasonal variation of Brazilian red propolis: Antibacterial activity, synergistic effect and phytochemical screening. **Food and Chemical Toxicology**, v. 107, 572-580, 2017.

das NEVES, M. V., DA SILVA, T. M., LIMA, E. DE, DA CUNHA, E. V., OLIVEIRA, E. DE. Isoflavone formononetin from red propolis acts as a fungicide against *Candida* sp. **Brazilian Journal Microbiology**, v. 47, p. 159–166, 2016.

NIKAIDO, H. Prevention of drug access to bacterial targets: permeability barriers and active efflux. **Science**, v. 264, p. 382–388, 1994.

NORI, M. P., FAVARO-TRINDADE, C. S., ALENCAR, S. M., THOMAZINI, M., BALIEIRO, J. C. C., CASTILLO, C. J. C. Microencapsulation of propolis extract by complex coacervation. **LWT- Food Science Technology**, v. 44, p. 429–435, 2011.

ORTIZ, S. E. M.; MAURI, A.; MONTERREY-QUINTERO, E. S.; TRINDADE, M. A.; SANTANA, A. S.; FAVARO-TRINDADE, C. S. Production and properties of casein hydrolysate microencapsulated by spray drying with soybean protein isolate. **LWT - Food Science and Technology**, v. 42, p. 919–923, 2009.

PANG, S. F.; YUSOFF, M. M.; GIMBUN, J. Assessment of phenolic compounds stability and retention during spray drying of *Orthosiphon stamineus* extracts. **Food Hydrocolloids**, v. 37, p. 159-165, 2014.

PASRIJA, D.; EZHILARASI, P. N.; INDRANI, D.; ANANDHARAMAKRISHNAN, C. Microencapsulation of green tea polyphenols and its effect on incorporated bread quality. **LWT - Food Science and Technology**, v. 64, p. 289-296, 2015.

PARK, Y. K.; ALENCAR, S. M.; AGUIAR, C. L. Botanical origin and chemical composition of Brazilian propolis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50 (9), p. 2502-2506, 2002.

PARK, Y.K.; IKEGAKI, M.; ALENCAR, S.M.; MOURA, F.F. Evaluation of Brazilian propolis by both physicochemical methods and biological activity. **Honeybee Science**, v. 21, p. 85–90, 2000.

PATEL, J.; KETKAR, S.; PATIL, S.; FEARNLEY, J.; MAHADIK, K. R.; PARADKAR, A. R. Potentiating antimicrobial efficacy of propolis through niosomal-based system for administration. **Integrative Medicine Research**, v. 4, p. 94–101, 2015.

PELLATI, F.; ORLANDINIA, G.; PINETTI, D.; BENVENUTI, S. HPLC-DAD and HPLC-ESI-MS/MS methods for metabolite profiling of propolis extracts. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 55, p. 934–948, 2011.

PEANPARKDEE, M.; IWAMOTO, S.; BOROMPICHAICHARTKUL, C.; DUANGMAL, K.; YAMAUCHI, R. Microencapsulation of bioactive compounds from mulberry (*Morus alba* L.) leaf extracts by protein–polysaccharide interactions. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 51, p. 649–655, 2016.

PIERUCCI, A. P. T. R.; ANDRADE, L. R.; BAPTISTA, E. B.; VOLPATO, N. M.; ROCHA-LEÃO, M. H. M. New microencapsulation system for ascorbic acid using pea protein concentrate as coat protector. **Journal of Microencapsulation**, v. 23(6), p. 654–662, 2006.

PIERUCCI, P. T. R.; ANDRADE, L. R.; FARINA, M.; PEDROSA, C.; ROCHA-LEÃO, M. H. M. Comparison of α -tocopherol microparticles produced with different wall materials: pea protein a new interesting alternative. **Journal of Microencapsulation**, v. 24(3): p. 201–213, 2007.

PREMIA, M.; SHARMA, H. K. Effect of different combinations of maltodextrin, gum arabic and whey protein concentrate on the encapsulation behavior and oxidative stability of spray dried drumstick (*Moringa oleifera*) oil. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 105, p. 1232–1240, 2017.

QUIRINO LACERDA, E. C.; DE ARAÚJO, C.V. M.; MONTEIROC, M.; FINOTELLID, P. V.; GUEDES TORRESA, A.; PERRONE, D. Starch, inulin and maltodextrin as encapsulating agents affect the quality and stability of jussara pulp microparticles. **Carbohydrate Polymers**, v. 151, p. 500–510, 2016.

RASSU, G.; COSSU, M.; LANGASCO, R.; CARTA, A.; CAVALLI, R.; GIUNCHEDI, P.; GAVINI, E. Propolis as lipid bioactive nano-carrier for topical nasal drug delivery **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 136, p. 908–917, 2015.

Dos REIS, A. S.; DOS, DIEDRICH, C.; MOURA, C. DE; PEREIRA, D.; ALMEIDA, J. DE F.; SILVA, L. D. Da; PLATA-OVIEDO, M. S. V.; TAVARES, R. A. W.; CARPES, S. T. Physico-chemical characteristics of microencapsulated propolis co-product extract and its effect on storage stability of burger meat during storage at 15 °C. **LWT - Food Science and Technology**, v. 76 p. 306-313, 2017.

ROCHA, G. A.; FÁVARO-TRINDADE, C. S.; GROSSO, C. R. F. Microencapsulation of lycopene by spray drying: Characterization, stability and application of microcapsules. **Food and Bioproducts Processing**, v. 90, p. 37–42, 2012.

DA ROSA, C. G.; BORGES, C. D.; ZAMBIAZI, R. C.; RUTZ, J. K.; DA LUZ, S. R.; KRUMREICH, F. D.; BENVENUTTI, E. V.; NUNES, M. R. Encapsulation of the phenolic compounds of the blackberry (*Rubus fruticosus*). **LWT - Food Science and Technology**, v. 58, p. 527-533, 2014.

ROY, F.; BOYE, J. I.; SIMPSON, B. K. Review. Bioactive proteins and peptides in pulse crops: Pea, chickpea and lentil. **Food Research International**, v. 43, p. 432–442, 2010.

ROSSETO, H. C., DE TOLEDO, L. DE A. S., DE FRANCISCO, L. M. B., ESPOSITO, E., LIM, Y., VALACCHI, G., CORTESI, R., BRUSCHI, M. L. Nanostructured lipid systems modified with waste material of propolis for wound healing: Design, *in vitro* and *in vivo* evaluation. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 158, p. 441–452, 2017.

RUTZ, J. K.; BORGES, C. D.; ZAMBIAZI, R. C.; DA ROSA, C. G.; DA SILVA, M. M. Elaboration of microparticles of carotenoids from natural and synthetic sources for applications in food. **Food Chemistry**, v. 202, p. 324–333, 2016.

SFORCIN, J. M. Review Biological Properties and Therapeutic Applications of Propolis. **Phytotherapy Research**, v. 30 (6), p. 894–905, 2016.

SHAHIDI, F.; HAN, X. Encapsulation of food ingredients. **Critical review in food science and nutrition**, v.33, n.6, p.501-547. 1993.

SHANG-JUNG, Y., JIA-JIUAN, W., YUAN-CHUEN, W., CHIH-FENG, H., TZONG-MING, W., CHWEN-JEN, S., CHIEH-MING, J. C. Encapsulation of propolis flavonoids in a water soluble polymer using pressurized carbon dioxide anti-solvent crystallization. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 94, p.138–146, 2014.

SHAPIRA, A. β -casein nanoparticle-based oral drug delivery system for potencial treatment of gastric carcinoma: stability, target-activated release and cytotoxicity. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 80, n. 2, p. 298-305, 2012.

SHAO, Y.; TANG, C. H. Gel-like pea protein Pickering emulsions at pH 3.0 as a potential intestine-targeted and sustained-release delivery system for β -carotene. **Food Research International**, v.79, p.64–72, 2016.

SILICI, S.; KUTLUCA, S. Chemical composition and antibacterial activity of propolis collected by three different races of honeybees in the same region. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 99, p. 69-73, 2005.

Da SILVA, F. C., DA FONSECA, C. R., DE ALENCAR, S. M., THOMAZINI, M., BALIEIRO, J. C. DE C., PITTIA, P., FAVARO-TRINDADE, C. S. Assessment of production efficiency, physicochemical properties and storage stability of spray-dried propolis, a natural food additive, using gum Arabic and OSA starch-based carrier systems. **Food and Bioproducts Processing**, v. 91, p. 28–36, 2013.

SILVA, J. C., RODRIGUES, S., FEÁS, X., ESTEVINHO, L. M. Antimicrobial activity, phenolic profile and role in the inflammation of própolis. **Food and Chemical Toxicology**, v. 50, p. 1790–1795, 2012.

SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTOS, R. M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. **Methods in Enzymology**, v. 299, p. 152-178, 1999.

SIRIPATRAWAN, U.; VITCHAYAKITTI, W. Improving functional properties of chitosan films as active food packaging by incorporating with propolis. **Food Hydrocolloids**, v. 61,p. 695-702, 2016.

SPINELLI, S., CONTE, A., LECCE, L., INCORONATO, A. L., NOBILE, A. D. M. Microencapsulated propolis to enhance the antioxidant properties of fresh fish burgers. **Journal of Food Process Engineering**, v. 38, p. 527–535, 2015.

SPONTON, O. E.; PEREZ, A. A.; RAMEL, J. V.; SANTIAGO, L. G. Protein nanovehicles produced from egg white. Part 1: Effect of pH and heat treatment time on particle size and binding capacity. **Food Hydrocolloids**, v.73, 67-73, 2017.

STONE, A. K.; KARALASH A.; TYLER, R. T.; WARKENTIN, T. D.; NICKERSON, M. T. Functional attributes of pea protein isolates prepared using different extraction methods and cultivars. **Food Research International**, v. 76, p. 31–38, 2015.

SUAVE, J.; DALL'AGNOL, E. C.; PEZZIN, A. P. T.; SILVA, D. A. K.; MEIER, M. M.; SOLDI, V. Microencapsulação: Inovação em diferentes áreas. **Revista Saúde e Ambiente**, v. 7(2), 2006.

SZLISZKA, E.; CZUBA, Z. P.; DOMINO, M.; MAZUR, B.; ZYDOWICZ G.; KROL, W. Ethanollic Extract of Propolis (EEP) Enhances the Apoptosis- Inducing Potential of TRAIL in Cancer Cells. **Moléculas**, v.14 (2), p. 738-754, 2009.

TAMM, F.; HERBST, S.; BRODKORB, A.; DRUSCH, S. Functional properties of pea protein hydrolysates in emulsions and spray-dried microcapsules. **Food Hydrocolloids**, v. 58, p. 204-214, 2016.

TIVERON, A. P., ROSALEN, P. L., FRANCHIN, M., LACERDA, R. C. C., BUENO-SILVA, B., BENSO, B., DENNY, C., IKEGAKI, M., DE ALENCAR, S. M. Chemical Characterization and Antioxidant, Antimicrobial, and Anti-Inflammatory Activities of South Brazilian Organic Propolis. *PLoS ONE* 11, 2016.
doi:10.1371/journal.pone.0165588

TRIFKOVIĆ, K. T., MILAŠINOVIĆ, N. Z., DJORDJEVIĆ, V. B., KRUŠIĆ, M. T., KNEŽEVIĆ-JUGOVIĆ, Z. D., NEDOVIĆ, V. A., BUGARSKI, B. M. Chitosan microbeads for encapsulation of thyme (*Thymus serpyllum* L.) polyphenols. **Carbohydrate Polymers**, v. 111, p. 901–907, 2014.

VISENTINI, F. F., SPONTON, O. E., PEREZ, A. A., SANTIAGO, L. G. Biopolymer nanoparticles for vehiculization and photochemical stability preservation of retinol. **Food Hydrocolloids**, v. 70, p. 363-370, 2017.

WOLF, S. E.; LEITERER, J.; PIPICH, V.; BARREA, R.; EMMERLING, F.; TREMEL, W. STRONG. Stabilization of Amorphous Calcium Carbonate Emulsion by Ovalbumin: Gaining Insight into the Mechanism of ‘Polymer-Induced Liquid Precursor’ Processes. **Journal of the American Chemical Society**, v. 133, p. 12642–12649, 2011.

XIAOJING, L.; NA, J.; CHAO, Q.; MINGTAO, X.; LIU, X.; QINGJIE, S. The effect of peanut protein nanoparticles on characteristics of protein- and starch-based nanocomposite films: A comparative study. **Industrial Crops and Products**, v. 77, p. 565–574, 2015.

XUE-PING, C.; YI-FAN, C.; JIANG-LIN, Z.; MENG-MENG, Y.; KAI, W.; FU-LIANG, H. Mechanisms underlying the wound healing potential of propolis based on its *in vitro* antioxidant activity. **Phytomedicine**, v. 34, p.76–84, 2017.

YAJING, L.; MINLI, C.; HONGZHUAN, X.; FULIANG, HU. Effects of Encapsulated Propolis on Blood Glycemic Control, Lipid Metabolism, and Insulin Resistance in Type 2 Diabetes Mellitus Rats. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, 2012. doi:10.1155/2012/981896

ZANCANELA, D. C.; HERCULANO, R. D.; FUNARI, C. S.; MARCOS, C. M.; ALMEIDA, A. M. F.; GUASTALDI, A. C. Physical, chemical and antimicrobial implications of the association of propolis with a natural rubber latex membrane. **Materials Letters**, v. 209, p. 39–42, 2017.

Apêndice

Apêndice A - Tabela de liberação de compostos fenólicos do extrato de própolis microencapsulado em condições gastrointestinais simuladas após aplicação em matrizes alimentares

Tabela 1. Digestão *in vitro* dos compostos fenólicos do extrato de própolis microencapsulado por *spray drying*

Proteínas	Queijo						
	Tempo						(minutos)
	0	60	120	180	240	300	360
Arroz	2,88±1,46b	7,28±0,1b	14,67±2,2b	26,00±1,9c	23,23±0,6b	32,85±1,5b	33,06±2,5c
Ervilha	22,08±8,2a	13,65±2,8a	41,36±16,2a	68,23±0,6a	82,91±18,7a	89,64±11,0a	82,48±4,4a
Soja	3,29±0,5b	9,86±3,1ab	15,21±0,3b	29,82±3,0c	25,17±2,6b	31,79±0,9b	28,48±1,0c
Ovoalbumina	5,25±2,7b	15,27±0,1a	22,64±1,7ab	37,58±0,6b	49,11±10,0b	43,85±0,8b	45,28±2,6b
Proteínas	Pudim						
	Tempo						(minutos)
	0	60	120	180	240	300	360
Arroz	19,88±1,8a	45,50±6,4b	54,03±3,8ab	100,56±0,4a	100,60±7,5a	100,50±0,1a	100,71±0,3a
Ervilha	14,49±2,9b	74,63±0,2a	65,41±10,0a	80,18±10,0b	86,67±14,0a	95,35±2,7 ^a	83,69±8,4b
Soja	6,50±0,4c	34,62±7,7b	39,33±0,9b	54,33±0,8c	56,37±0,3b	57,04±2,9c	53,31±6,6c
Ovoalbumina	12,15±0,2b	67,31±0,3a	67,83±6,9 ^a	84,60±2,0b	94,07±2,8a	89,83±1,0b	95,79±4,0ab

Médias seguidas por letras minúsculas diferentes na mesma coluna diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$) avaliando as proteínas utilizadas como material de parede, dentro de cada tempo. Média de três repetições $\pm$ desvio padrão.

Apêndice B – Teste de comparação múltipla utilizado para avaliação sensorial de bolos com adição de extrato de própolis e de micropartículas com extrato de própolis

Você está recebendo um bolo identificado como P (padrão) e três bolos identificados. Compare cada bolo com o padrão e identifique se é melhor, igual ou inferior quanto aos critérios abaixo:

Código das amostras	ODOR	SABOR	TEXTURA	COR
_____	_____	_____	_____	_____
_____	_____	_____	_____	_____
_____	_____	_____	_____	_____

- (9) Extremamente melhor
- (8) Muito melhor
- (7) Moderadamente melhor
- (6) Ligeiramente melhor
- (5) Igual ao padrão
- (4) Ligeiramente inferior
- (3) Moderadamente inferior
- (2) Muito inferior
- (1) Extremamente inferior

Comentário adicional:

Apêndice C: Termo de consentimento livre e esclarecido utilizado na análise sensorial dos bolos

Análise Sensorial de bolo

Você está sendo convidado (a) a participar de uma avaliação sensorial sobre bolo. Para que possa decidir se quer ou não participar, você precisa conhecer as características da pesquisa.

JUSTIFICATIVA

O presente estudo será realizado para aplicação de teste sensorial.

OBJETIVO DO ESTUDO

Caracterizar e analisar sensorialmente as propriedades de bolo composto de farinha de trigo, açúcar, leite integral, ovos, margarina e fermento químico.

PROCEDIMENTOS DO ESTUDO

Você receberá 4 unidades de bolo codificados com números aleatórios de três dígitos, sendo que um deles é o “bolo padrão”. O teste sensorial aplicado será o de comparação múltipla, com duração de aproximadamente 10 minutos. Neste teste você terá que comparar cada amostra de bolo com a padrão e identificar se é melhor, igual ou inferior, baseando-se na escala que varia de 1 a 9 (sendo 1 extremamente inferior e 9 para extremamente melhor).

RISCOS

O consumo do produto não oferece riscos à saúde, desde que, não seja ingerido por pessoas intolerantes ao glúten ou alérgicas a algum outro componente da formulação dos bolos.

BENEFÍCIOS

O benefício de participar da pesquisa relaciona-se ao fato que os resultados serão incorporados ao conhecimento científico e posteriormente a situações de ensino-aprendizagem, além do uso futuro pelas indústrias farmacêuticas e alimentícias.

ANÔNIMATO

Seu nome não será revelado ainda que informações sejam utilizadas para propósitos educativos ou de publicação, que ocorrerão independentemente dos resultados obtidos.

CUSTOS

Não haverá qualquer custo ou forma de pagamento para sua participação no estudo.

BASES DA PARTICIPAÇÃO

É importante que você saiba que a sua participação neste estudo é completamente voluntária e que pode recusar-se a participar ou interromper sua participação a qualquer momento.

ESCLARECIMENTOS

Em caso de qualquer dúvida a respeito da pesquisa e/ou dos métodos utilizados, poderá procurar a qualquer momento o pesquisador (a) responsável.

CONCORDÂNCIA NA PARTICIPAÇÃO

Eu _____ li as informações acima e entendi o propósito deste estudo, assim como, os riscos potenciais da participação no mesmo. Tive a oportunidade de fazer perguntas e todas foram respondidas. Eu, por intermédio deste, dou meu livre consentimento para participar deste estudo de forma voluntária.

Assinatura do Avaliador

_____/_____/_____
Data