



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

DAVDSON LUIZ DE SOUZA

**CARACTERIZAÇÃO DE MICROENCAPSULADOS CONTENDO PRÓPOLIS
VERMELHA DE ALAGOAS OBTIDOS POR GELIFICAÇÃO IÔNICA**

Maceió – AL

2022

DAVDSON LUIZ DE SOUZA

**CARACTERIZAÇÃO DE MICROENCAPSULADOS CONTENDO PRÓPOLIS
VERMELHA DE ALAGOAS OBTIDOS POR GELIFICAÇÃO IÔNICA**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Alagoas, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador (a): Prof. Dr. Edeildo Ferreira da Silva Junior

Coorientador (a): Prof. Dr. Johnnatan Duarte de Freitas

Maceió – AL

2022

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico

Bibliotecária: Taciana Sousa dos Santos – CRB-4 – 2062

S729c Souza, Davdson Luiz de.
Caracterização de microencapsulados contendo própolis vermelha de Alagoas obtidos por gelificação iônica / Davdson Luiz de Souza. – 2022. 79 f. : il. color.

Orientador: Edeildo Ferreira da Silva Júnior.

Coorientador: Johnnatan Duarte de Freitas.

Dissertação (Mestrado em Farmácia) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Maceió, 2022.

Bibliografia: f. 58-71.

Anexos: f. 72-79.

1. Própolis vermelha de Alagoas. 2. Microencapsulados. 3. Gelificação iônica. I. Título.

CDU: 615.453: 638.135

Folha de Aprovação

DAVDSON LUIZ DE SOUZA

CARACTERIZAÇÃO DE MICROENCAPSULADOS CONTENDO PRÓPOLIS VERMELHA DE ALAGOAS OBTIDOS POR GELIFICAÇÃO IÔNICA

Dissertação apresentada ao corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Alagoas, como requisito à obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas apresentado em 16/12/2022.

Banca examinadora:



Documento assinado digitalmente
EDEILDO FERREIRA DA SILVA JUNIOR
Data: 28/01/2023 20:44:09-0300
Verifique em <https://verificador.iti.br>

Orientador: Prof. Dr. Edeildo Ferreira da Silva Júnior
(Universidade Federal de Alagoas)



Documento assinado digitalmente
JOHNNATAN DUARTE DE FREITAS
Data: 24/12/2022 17:29:06-0300
Verifique em <https://verificador.iti.br>

Coorientador: prof. Dr. Johnnatam Duarte de Freitas
(Universidade Federal de Alagoas)



Documento assinado digitalmente
TICIANO GOMES DO NASCIMENTO
Data: 22/12/2022 08:30:13-0300
Verifique em <https://verificador.iti.br>

Examinador Interno: Prof. Dr. Ticiano Gomes do Nascimento
(Universidade Federal de Alagoas)



Documento assinado digitalmente
VANDERSON BARBOSA BERNARDO
Data: 21/12/2022 16:48:19-0300
Verifique em <https://verificador.iti.br>

Examinador Externo: Prof. Dr. Vanderson Barbosa Bernardo
(Universidade Federal de Alagoas)

Dedico este trabalho primeiro a Deus e à minha avó, Nerina Calaça de Lima, que sempre dedicou a sua vida na educação de seus dois netos, Davdson e Stephanie, e que Deus a tenha em um lugar bom no céu. À minha mulher Maria Lucia por todos os momentos bons e ruins juntos e ao meu filho Jeremias Menezes por ser compreensivo com o papai.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar quero agradecer a Deus por esse importante trabalho realizado, por ter me mantido de pé nessa longa caminhada e por ele demonstrar sempre a sua presença perto de mim nos momentos bons e ruins. E também à igreja católica por me apoiar desde criança nos momentos de dificuldade e nos momentos bons.

À minha família, em especial à minha avó, Nerina Calaça de Lima, que dedicou a sua vida para fazer de mim uma pessoa íntegra e educada. A senhora o meu muito obrigado por tudo e que Deus atenda em um bom lugar. À minha esposa Maria Lucia, pela compreensão e paciência nos momentos em que não dei a atenção devida. Ao meu Filho, Jeremias Menezes, Por compreender que o papai estava trabalhando para lhe proporcionar uma vida melhor.

A meu orientador, Dr. Edeildo Ferreira da Silva Junior, por ter acreditado que em mim existia potencial para realizar esse projeto, pelas inúmeras sugestões dadas para o avanço desse trabalho e por estar sempre ajudando nas minhas dificuldades no campo acadêmico e muitas vezes no pessoal. Mais do que um professor orientador um verdadeiro mestre que ensina o caminho e dá às ferramentas adequadas para que o aluno consiga vencer as barreiras encontradas ao longo da jornada. Por isso, deixo aqui os meus sinceros agradecimentos, muito obrigado professor.

Ao meu coorientador, Dr. Johnnatan Duarte de Freitas, pelo apoio com o projeto de pesquisa, pela confiança e pela atenção nos momentos que precisei das suas orientações e espaço físico para a realização de experimentos. Ao senhor, o meu muito obrigado.

Ao Instituto Federal de Alagoas, onde cursei minha Licenciatura em Química, pela parceria e contribuição com meus estudos e por manter sempre as portas abertas para o crescimento intelectual e profissional dos seus alunos e ex-alunos. E pela abertura dos laboratórios para o desenvolvimento das formulações e realização das análises necessárias para o projeto.

Aos técnicos e bolsistas do Instituto Federal de Alagoas (IFAL): Chico, Clara, Orlando e Ygor. Ao Chico, pelos conselhos e ensinamentos em alguns aparelhos de laboratório. À Clara pela ajuda no desenvolvimento do projeto, ao Orlando por me ajudar na análise térmica e ao Ygor por me ajudar com as soluções para a realização das amostras. A vocês os meus sinceros agradecimentos.

A todos os Meus colegas da Pós-Graduação e do laboratório da UFAL: Antony, Anderson, Maria Luiza, Mairla, Erika, por terem compartilhado comigo a sua amizade, por terem passado para mim as suas experiências acadêmicas e pelo apoio nos momentos em que

precisei. Desejo para todos vocês tudo de bom e peço-lhes que sempre continuem sendo luz na vida dos outros como foram na minha.

Aos laboratórios e instituição envolvidos no desenvolvimento desse projeto: LQM e ao IFAL e seus laboratórios. Os meus sinceros agradecimentos pela confiança a mim confiada.

À Universidade Federal de Alagoas e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, meus sinceros agradecimentos por ter me proporcionado essa experiência incrível e por ter me dado amigos para a vida inteira. Agradecer também ao secretário Daniel por todo apoio dado ao longo do mestrado e pela sua dedicação em ajudar nos momentos em que precisei. Ao coordenador Prof. Dr. Luciano Grillo por ser sempre disposto a resolver, junto com o aluno, as dificuldades em relação ao mestrado. Ao qualificado corpo docente da Pós-Graduação, fica os meus sinceros cumprimentos e respeito, pois são verdadeiros mestres na arte em que se comprometeram a desenvolver.

“Em algum lugar, alguma coisa incrível está esperando para ser descoberta.”

(Carl Sagan)

RESUMO

A própolis é um produto natural que apresenta uma mistura complexa, formada por um material resinoso e balsâmico coletado pelas abelhas dos ramos, flores, pólen, brotos e exsudatos de árvores. No território brasileiro, a própolis vermelha pode ser encontrada em diversas partes do litoral, principalmente, nas áreas de manguezal. Tendo como origem botânica a *Dalbergia ecastophyllum*, popularmente conhecida como “rabo-de-bugio”, Própolis Vermelha de Alagoas destaca-se por apresentar uma grande quantidade de flavonoides, compostos fenólicos e alguns outros compostos exclusivos. Esses compostos bioativos apresentam diversas atividades biológicas, tais como anti-inflamatória, cicatrizante, antioxidante, antimicrobiana, potencial antiviral, antifúngico, anticâncer, imunomodulador, dentre outros. Nesse estudo, nós desenvolvemos oito formulações, em triplicatas, de microencapsulados (*beads*) contendo extrato bruto de própolis vermelha (5%) a partir do método de gelificação iônica utilizando-se alginato de sódio (1% e 2%) e cloreto de cálcio (CaCl_2), em diferentes concentrações. Posteriormente, os *beads* gerados foram caracterizados por microscopia eletrônica de varredura (SEM), revelando diâmetros entre 330 e 337 μm para as microesferas, caracterizando a melhor formulação. Então, esta foi analisada por espectrofotometria de infravermelho por transformada de Fourier empregando reflectância total atenuada (FTIR-ATR), onde verificou-se estiramentos típicos de CO, C=C, C-H e O-H, compatíveis com estruturas presentes na amostra. A termogravimetria (TG) demonstrou 3 eventos de perda a partir da amostra, sendo responsáveis por 15, 46 e 10% de perda de massa, respectivamente. Já a calorimetria exploratória diferencial (DSC) exibiu eventos exotérmicos para amostra, compatíveis com um material amorfo. Posteriormente, os *beads* apresentaram boa solubilidade uma solução aquosa contendo uma mistura de EDTA e citrato de sódico (2% p/v), após 24h. Então, a cromatografia líquida de alta-eficiência com detector de arranjo diodo (HPLC-DAD) foi capaz de identificar e quantificar sete constituintes da PVA na formulação mais promissora, sendo estes liquiritigenina, daidzeína, pinobanksina, isoliquiritigenina, formononetina, pinocembrina e biochanina A. Por fim, os *beads* produzidos demonstraram ser estáveis. A partir dos resultados obtidos, os *beads* contendo PVA podem ser aplicados contra diferentes patógenos, ou até mesmo contribuindo com avanços na área alimentícia.

Palavras chave: Própolis Vermelha de Alagoas, alginato de sódio, análise térmica, cromatografia, *beads*

ABSTRACT

Propolis is a natural product that presents a complex mixture, formed by a resinous and balsamic material collected by bees from branches, flowers, pollen, buds and tree exudates. In Brazilian territory, red propolis can be found in several parts of the coast, mainly in mangrove areas. With *Dalbergia ecastophyllum* as its botanical origin, popularly known as “rabo-de-bugio”, Red Propolis from Alagoas stands out for presenting a large number of flavonoids, phenolic compounds and some other exclusive compounds. These bioactive compounds have several biological activities, such as anti-inflammatory, healing, antioxidant, antimicrobial, antiviral potential, antifungal, anticancer, immunomodulatory, among others. In this study, we developed microcapsules (beads) containing crude red propolis extract (5%), from the ionic gelation method using sodium alginate (1% e 2%) and calcium chloride (CaCl_2), in different concentrations. Subsequently, the generated beads were characterized by scanning electron microscopy (SEM), revealing diameters between 330 and 337 μm for the microspheres, characterizing the best formation. Then, this was analyzed by Fourier transform infrared spectrophotometry using attenuated total reflectance (FTIR-ATR), where typical stretching of CO, C=C, C-H and O-H, compatible with structures present in the sample. Thermogravimetry (TG) showed three loss events from the sample, accounting for 15, 46 and 10% weight loss, respectively. Differential scanning calorimetry (DSC) showed exothermic events for the sample, compatible with an amorphous material. Subsequently, the beads showed good solubility in an aqueous solution containing a mixture of EDTA and sodium citrate (2% w/v) after 24h. Then, high-performance liquid chromatography with diode array detector (HPLC-DAD) was able to identify and quantify seven PVA constituents in the most promising formulation, namely liquiritigenin, daidzein, pinobanksin, isoliquiritigenin, formononetin, pinocembrin and biochanin A. Finally, the beads produced proved to be stable. From the results obtained, the beads containing PVA may have biological applicability against different pathogens, or even contribute to advances in the food industry.

Keywords: Red Propolis of Alagoas, alginate, thermic analyzes, chromatography, beads

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	REVISÃO DA LITERATURA	15
2.1	A Própolis	15
2.2	Própolis Vermelhas e Suas Características	19
2.3	Formulações Contendo Própolis Vermelha	22
2.4	Microencapsulação	23
2.5	Gelificação Iônica	25
3	OBJETIVOS	29
3.1	Objetivo Geral	29
3.2	Objetivos Específicos	29
4	METODOLOGIA	30
4.1	Obtenção dos Microencapsulados (<i>Beads</i>) Contendo PVA Variando Concentrações de Alginato de Sódio e Cloreto de Cálcio	30
4.1.1	Planejamento experimental das formulações	30
4.1.2	Microencapsulados (<i>beads</i>) obtidos utilizando um aerógrafo como método de extrusão	32
4.1.3	Obtenção de microencapsulados pelo método de gelificação iônica	33
4.2	Avaliação dos Microencapsulados contendo PVA por Meio da Perda de Massa via Análise de Umidade	34
4.3	Caracterização das Composições dos Microencapsulados de PVA Usando Técnica de Microscopia Eletrônica de Varredura (SEM)	34
4.4	Caracterização das Composições dos Microencapsulados de PVA por Espectrofotometria de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR) com Reflectância Total Atenuada (ATR)	34
4.5	Caracterização das Composições dos Microencapsulados Contendo PVA por Termogravimetria (TG)	35
4.6	Caracterização das Composições dos Microencapsulados Contendo PVA por Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)	35
4.7	Avaliação do Conteúdo dos Microencapsulados Contendo PVA	35
4.7.1	Teste de solubilidade dos microencapsulados obtidos por gelificação iônica por gotejamento	35

4.8	Quantificação de Constituintes Fitoquímicos dos Presentes na Formulação de Microencapsulados Contendo PVA por Cromatografia Líquida de Alta-Eficiência com Detecção de Arranjo Diodo (HPLC-DAD)	36
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
5.1	Avaliação dos Microencapsulados contendo PVA por Meio da Perda de Massa Via Análise de Umidade.....	37
5.2	Caracterização das Composições dos Microencapsulados de PVA Usando Técnica de Fotomicrografia (SEM)	40
5.2.1	Microencapsulados utilizando um aerógrafo como método de extrusão	40
5.2.2	Microencapsulados obtidos por extrusão via gotejamento	41
5.3	Caracterização das Composições dos Microencapsulados de PVA por Espectrofotometria de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR) empregando Reflectância Total Atenuada (ATR)	45
5.4	Caracterização das Composições dos Microencapsulados Contendo PVA por Termogravimetria (TG).....	47
5.6	Avaliação da composição dos microencapsulados de PVA	50
5.6.1	Avaliação da solubilidade dos microencapsulados (<i>beads</i>) usando agentes quelantes (EDTA e Citrato de Sódio)	50
5.7	Detecção dos Constituintes dos Microencapsulados Contendo PVA por Cromatografia Líquida de Alta-Eficiência (HPLC) com Detector de Arranjo Diodo (DAD)	51
5.7.1	Determinação dos marcadores de PVA usando HPLC-DAD	51
6	CONCLUSÃO	57
	REFERÊNCIAS	58
	ANEXOS	72

1 INTRODUÇÃO

Na era contemporânea, a sociedade vem buscando cada vez mais utilizar produtos naturais para benefício da saúde, proporcionando maior visibilidade e espaço a estes, seja na aplicação terapêutica ou com o objetivo de conferir função aos alimentos (ALMEIDA, 2017). Com isso, diferentes produtos apícolas como o mel e o pólen são encontrados em produtos comerciais, bem como uma variedade de própolis, incluindo a própolis vermelha de Alagoas (PVA) (ALMEIDA, 2017).

Em geral, a própolis é uma mistura de matriz complexa, que as abelhas adicionam às suas colmeias, via secreção de saliva, para proteger a colmeia contra o crescimento microbiano, mantendo a temperatura interna da colmeia, bem como, reparando buracos ou rachadura se sendo responsável por afastar insetos invasores (SILVA, et al., 2006, ZILSE & SILVA 2012). De acordo com sua cor, cheiro e consistência, as propriedades da própolis estão relacionadas à sua origem, tanto botânica quanto química. Portanto, a própolis pode variar do verde e vermelho ao marrom, preto e amarelo (BANKOVA, 2005, LOPES, 2014). No Brasil, existem um total de 13 tipos de própolis, sendo a vermelha catalogada como o 13º tipo de própolis, que apresenta uma composição química rica em isoflavonas. Sua fonte botânica está associada à planta conhecida popularmente como rabo de bugio (*Dalbergia ecastophyllum*), uma leguminosa rica em flavonoides (LEE et al., 2008, BUENO-SILVA, et al., 2013), em que esta planta é predominante na região Nordeste do Brasil (LUSTOSA et al., 2008). A PVA é considerada um tipo diferenciado de resina, pois contém quantidades superiores de flavonoides, principal classe de compostos fitoquímicos responsáveis pela maioria das atividades biológicas desta, bem como, presença de outras substâncias exclusivas e majoritárias (ALENCAR et al., 2007). Dentre estas, ácidos fenólicos, ácidos aromáticos, ésteres, aldeídos, cetonas, terpenoides, fenilpropanoides, esteroides, aminoácidos, proteínas, vitaminas e diversos minerais podem ser encontrados nesse tipo de resina (HAVSTEEN, 2002; MENEZES, 2005; SOUSA et al., 2007; LUSTOSA et al., 2008; SILVA, 2019).

Ainda, a PVA destaca-se por apresentar diversas atividades biológicas, tais como anti-inflamatória, cicatrizante, antioxidante e antimicrobiana (SIQUEIRA et al., 2014). Além de demonstrar potencial antiviral, antifúngico, anticâncer, imunomodulador, dentre outras (TZANKOVA et al., 2019).

A utilização de hidrocoloides para o desenvolvimento de partículas de géis tem se mostrado um objetivo de crescente interesse por diversas áreas de aplicação, tais como

alimentícia, farmacêutica e cosmética (BUREY et al., 2008). Para isso, frequentemente, utiliza-se o alginato de sódio, um polissacarídeo que, devido a sua alta solubilidade em água fria e características de transição de solução para gel (de forma instantânea) é usado em formulações. Quando em contato com íons cálcio (Ca^{2+}), este gera um material encapsulante, que pode ser obtido por meio da gelificação iônica (FUNAMI et al., 2009; ETCHEPARE et al., 2016). Ademais, este possui fácil manejo, natureza não tóxica e baixo custo, o que favorece ainda mais sua utilização (SULTANA et al., 2003; ETCHEPARE et al. 2016).

Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi desenvolver microcápsulas à base de alginato de sódio contendo PVA, obtidas pelo método de gelificação iônica. Estas foram caracterizadas por microscopia eletrônica de varredura (SEM), espectrofotometria de infravermelho por transformada de Fourier com reflectância total atenuada (FTIR-ATR), termogravimetria (TG), calorimetria exploratória diferencial (DSC) e cromatografia líquida de alta-eficiência com detecção de arranjo diodo (HPLC-DAD).

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 A Própolis

Utilizada durante vários séculos da história da humanidade, a própolis é um produto natural que apresenta diversas formas e finalidades medicinais. No antigo Egito, a própolis era usada para embalsamar os mortos. Já durante a Segunda Guerra Mundial, esta era utilizada como agente cicatrizante. No entanto, essa mistura natural começou a ganhar prestígio no tratamento de problemas de saúde nos anos de 1950 e 1960, em países do Leste Europeu. Embora, apenas na metade dos anos 80 é que a própolis passou a ser um importante produto associado à medicina alternativa e/ou complementar (PEREIRA; SEIXAS; AQUINO NETO, 2002; LUSTOSA et al., 2008).

A própolis é uma mistura complexa de substâncias resinosas coletadas por abelhas (*Apis mellifera*) a partir de diversas plantas, o que permite variar sua consistência, textura e coloração (PINTO et al., 2011). O produto final é obtido a partir das colmeias, onde as abelhas adicionam secreções salivares e enzimáticas, sendo responsáveis também pela variação deste produto natural (LUSTOSA et al., 2008; PINTO et al., 2011).

Derivada do grego *pro* (em defesa) e *polis* (cidade ou comunidade), a própolis para as abelhas, funciona como um mecanismo de defesa, sendo uma proteção à colônia visto que essas usam para protegê-las contra insetos e microrganismos invasores, evitando a degradação e contaminação da colmeia. Além disso, a mesma também é utilizada para reparos à colmeia, também servindo como material antisséptico, sendo depositada no interior dos alvéolos e permitindo um ambiente favorável para a postura de ovos pela abelha rainha (SILVA, 2019; LUSTOSA et al., 2008). As abelhas coletam os materiais lipofílicos nas folhas e gemas, látex, resinas, e o transformam em própolis na colmeia, via adição da cera e saliva. Depois de elaborada, a própolis é utilizada para diversas funções como as citadas anteriormente (CASTALDO & CAPASSO, 2002; SILVA, 2019).

Apesar de ser produzida por diversos tipos de abelhas, a composição da própolis consiste basicamente de resinas e bálsamos (50%), ceras (25 a 35%), óleos essenciais (10%), grãos de pólen e outros compostos, que são principalmente determinados pelas características fitogeográficas existentes ao redor da colmeia. No entanto, não se sabe ao certo quais os fatores que determinam ou direcionam as preferências das abelhas coletoras por uma determinada fonte vegetal (SALANTINO et al., 2005; TEIXEIRA et al., 2005; LUSTOSA et al., 2008). Além das

características fitogeográficas, a composição da própolis também pode variar sazonalmente em uma mesma região, assim como também pelas reservas de pólen e mel, pelo tempo da coleta, iluminação e altitude (MENEZES, 2005; ORYAN et al., 2018).

Sendo assim, a própolis apresenta uma variedade de ações/atividades farmacológicas, consequência desta composição química diferenciada. No Brasil, a própolis pode ser classificada em 13 tipos a partir de várias características, tais como a localização geográfica, o perfil físico-químico e a origem da planta (Tabela 1). Dentre os 13 tipos de própolis, 5 grupos estão localizados na região Sul, 1 no Sudeste, e outros 7 no Nordeste do país. No entanto, 3 tipos são mais comuns: (1) a própolis verde, produzida a partir da resina do alecrim do campo (*Baccharis dracunculifolia*), (2) a própolis marrom ou ainda própolis tradicional, que não necessita de uma flor ou planta específica para a sua produção, e (3) a própolis vermelha, produzida por uma planta conhecida popularmente como rabo-de-bugio (*Dalbergia ecastophyllum*), predominante na região Nordeste do Brasil (Figura 1).

Entretanto, a coloração da própolis pode variar do marrom escuro passando a uma tonalidade esverdeada indo até o marrom avermelhado, dependendo da sua procedência. Além disso, a própolis possui odor característico que pode variar de uma amostra para outra (MARCUCCI et al., 1996; LUSTOSA et al., 2008).

Tabela 1. Tipos de própolis brasileira e sua localização geográfica.

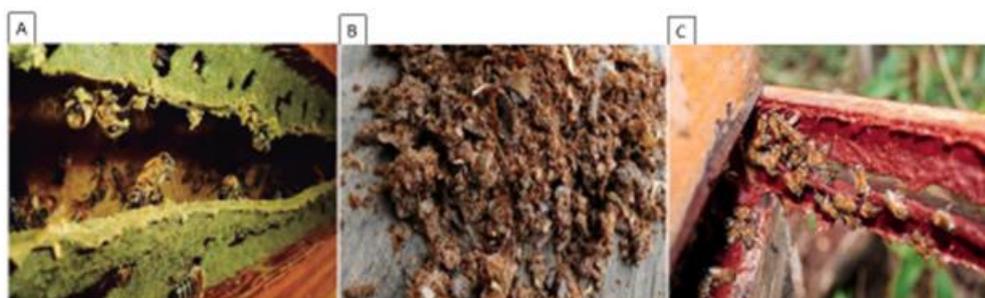
Própolis	COR	ORIGEM GEOGRÁFICA	REFERÊNCIA
Grupo 1	Amarelo	Sul (RS)	PARK et al., 2002
Grupo 2	Castanho Claro	Sul (RS)	PARK et al., 2002; SILVA,2008
Grupo 3	Castanho Escuro	Sul (PR)	PARK et al., 2000 e 2002; SILVA, 2008
Grupo 4	Castanho Claro	Sul (PR)	PARK et al., 2000 e 2002; SILVA, 2008
Grupo 5	Marrom Esverdeado	Sul (PR)	PARK et al., 2000 e 2002; SILVA, 2008
Grupo 6	Marrom Avermelhado	Nordeste (BA)	PARK et al., 2000 e 2002; SILVA, 2008; CASTRO et al., 2007
Grupo 7	Marrom Esverdeado	Nordeste (BA)	PARK et al., 2000 e 2002; SILVA, 2008;

Continua

Grupo 8	Castanho Escuro	Nordeste (PE)	PARK et al., 2000; SILVA, 2008;
Grupo 9	Amarelo	Nordeste (PE)	PARK et al., 2000 e 2002; SILVA, 2008;
Grupo 10	Amarelo Escuro	Nordeste (CE)	PARK et al., 2002
Grupo 11	Amarelo	Nordeste (PI)	PARK et al., 2002
Grupo 12	Verde ou Marrom Esverdeado	Sudeste (SP, MG)	PARK et al., 2004 e 2002; FUNARI e FERRO, 2006; SIQUEIRA 2008a.
Grupo 13	Vermelha	Nordeste (AL, BA, PB)	SILVA et al.2007; DAUGSCH et al. 2007.

Fonte: Adaptado de Silvino, (2011).

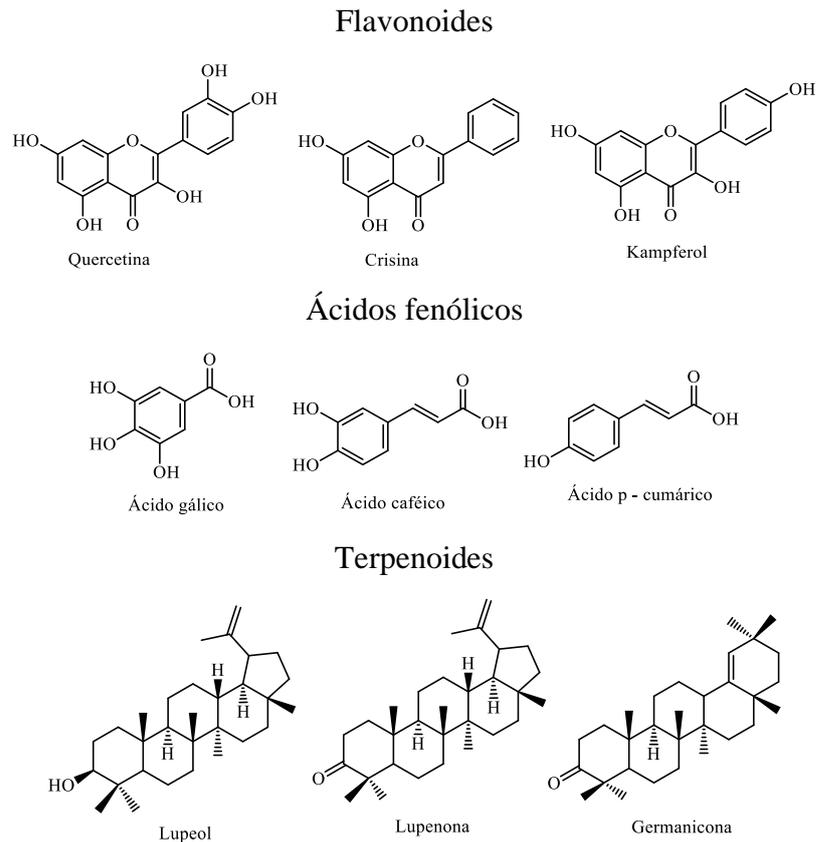
Figura 1 – Imagem dos 3 tipos de própolis mais comuns encontrados no Brasil. Em (A) própolis verde, (B) própolis marrom e em (C) própolis vermelha.



Fonte: Autor, 2022. Adaptado de <https://www.lojinhauai.com/blog/propolis-verde/>; <https://sba1.com/>; <https://www.blogs.unicamp.br/>.

Dentre esses compostos químicos, pode-se encontrar flavonoides (como a quercetina, crisina, kampferol, dentre outros), ácidos fenólicos (como o ácido gálico, ácido cafeico, ácido *p*-cumárico), os terpenoides (como o lupeol, lupenona e a germanicona) (Figura 2), além de aminoácidos, proteínas, vitaminas e diversos minerais. Ainda, a própolis pode apresentar na sua composição elementos inorgânicos como o alumínio, ferro, cromo, zinco, manganês e cálcio, além de outros (HAVSTEEN, 2002; MENENES, 2005; SOUSA et al., 2007; LUSTOSA et al., 2008; SILVA, 2019).

Figura 2 – Estrutura química básica de compostos químicos presentes na própolis.



Fonte: Autor, 2022. Adaptado de COSTA et al., 2009.

Dentre tais compostos, a classe dos flavonoides vem sendo amplamente estudada por pesquisadores de diversas partes do mundo (HAVSTEEN, 2002; MENENES, 2005). Essa classe de compostos químicos interfere em diversos processos fisiológicos, atuando nos processos de cicatrização ou antioxidantes, além de apresentarem atividade antimicrobiana e imunomoduladora (WILLIAMS et al., 2004; MENEZES., 2005).

Como citado, os flavonoides são os componentes da própolis mais estudados, no entanto eles não são os únicos responsáveis pelas atividades farmacológicas deste produto natural. A própolis é um dos poucos produtos naturais que vem sendo utilizados por um longo período de tempo e por diferentes civilizações como “medicamento natural” (LUSTOSA et al., 2008; PINTO et al., 2011).

Devido a essas atividades, a própolis brasileira têm se tornado objeto de grande interesse em pesquisas. Dentre os tipos de própolis citados anteriormente, a própolis vermelha é a que detém maior atividade antimicrobiana em relação às demais. Além disso, a mesma possui maior potencial antioxidante, que se deve a presença de compostos químicos exclusivos, ou seja, que não são encontrados nos outros tipos de própolis. Devido a essas propriedades, o produto

comercial mais conhecido popularmente é o seu extrato. Esta, que possui sabor amargo, pode ser consumida diariamente. Considerando seus diversos benefícios, a própolis vermelha tem atraído cada vez mais atenção do mercado externo, fator que impulsiona as pesquisas nessa área (FRANÇA et al., 2020).

2.2 Própolis Vermelhas e Suas Características

A própolis vermelha tem como origem botânica a *D. ecastophyllum*, popularmente conhecida como “rabo-de-bugio” ou “marmelo do mangue” (Figura 3), que apresenta coloração característica avermelhada, sendo encontrada principalmente nas áreas litorâneas (mangues) da região Norte e Nordeste do Brasil (SILVA et al., 2007; CABRAL, 2009; NUNES 2009).

Figura 3 – Rabo-de-Bugio (*Dalbergia ecastophyllum*).



Fonte: http://131.230.176.4/cgi-bin/dol/dol_terminal.pl?taxon_name=Dalbergia&rank=genus, 2008.

A *D. ecastophyllum* é uma espécie escandente ou semiprostrada, encontrada associada a estuários, mangues e dunas, onde auxilia a sua fixação na areia. É de fácil adaptação a locais de alta salinidade e seus frutos são capazes de flutuar. Sua ocorrência é muito vasta, estando presente em diversas regiões. Pode ser encontrada do Sul da Flórida (EUA) ao Sul do Brasil, onde tem domínios fitogeográficos na Amazônia e na Mata Atlântica, abrangendo as regiões Norte (Roraima, Pará e Amazonas), Nordeste (Maranhão, Ceará, Rio Grande do Norte, Paraíba, Pernambuco, Alagoas e Sergipe), Centro-Oeste (Mato grosso do Sul), Sudeste (Espírito Santo, São Paulo e Rio de Janeiro) e Sul (Paraná e Santa Catarina) (CAMARGO, 2005).

Conhecida pelo seu pigmento vermelho intenso, a “rabo-de-bugio” fornece exsudatos para as abelhas. É a partir da liberação desses exsudatos emitidos pelos galhos através de

pequenas perfurações, que as abelhas o transformam em uma mistura de coloração e odor que caracterizam a própolis vermelha (Figura 4) (PICCINELLI et al., 2011; SILVA, 2018).

Figura 4 – Processo de obtenção da Própolis Vermelha por abelhas. Coleta de resina da *Dalbergia ecastophyllum* efetuadas por abelhas da espécie *Apis mellifera*.

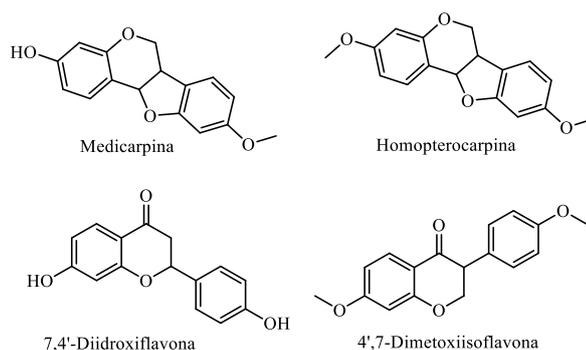


Fonte: Dausch, 2007.

A própolis vermelha possui uma composição química bastante complexa e variada, isso está relacionado com a ecologia e a flora de cada região, o que a torna um produto único (CABRAL et al., 2009; SILVA, 2011). Em 2006, TRUSHEVA *et al.* identificaram compostos presentes na própolis vermelha brasileira o anetol, eugenol, isoeugenol, metileugenol, álcool triterpênico, isoflavonoides e elimicina. SILVA *et al.* (2007) encontram ácido felúrico, quercetina, crisina e medicarpina em amostras de PVA. Alguns desses compostos estão presentes também no “rabo-de-bugio” e foram quantificados através de cromatografia líquida de alta-eficiência (do inglês, *high-performance liquid chromatography-HPLC*), tais como daidzeína, luteolina, rutina, pinocembrina, formononetina, dentre outras (DAUSGCH et al., 2007).

Além dos compostos citados anteriormente, a própolis vermelha apresenta em sua composição quatro isoflavonas, que não foram encontradas nos outros 12 grupos de própolis, sendo isoflavonas a 7,4'-diidroxisoflavona, homopterocarpina, medicarpina e 4',7'-dimetoxisoflavona (Figura 5) (ALENCAR et al., 2007). Em contrapartida, algumas pesquisas demonstram que a grande maioria das substâncias usadas como padrão nas demais própolis, como por exemplo, o ácido cinâmico, encontrado a própolis verde, não está presente na própolis vermelha, demonstrando que essa apresenta uma composição única (CABRAL et al., 2009).

Figura 5 – Alguns compostos exclusivos encontrados na própolis vermelha.



Fonte: Alencar et al., 2007.

Essa composição única faz com que a própolis vermelha apresente inúmeras atividades biológicas. Dentre essas atividades pode-se citar a antioxidante, que está relacionada à prevenção da formação, neutralização e remoção de radicais livres associados à inibição da cadeia de reações oxidativa (FROZZA et al., 2013); atividade antifúngica, uma vez que a própolis vermelha causa danos à membrana fúngica, afetando o ergosterol presente nessa membrana e alterando a sua permeabilidade (PIPPI et al., 2015). Além disso, a própolis vermelha pode apresentar também efeitos anti-inflamatórios e imunomoduladores, através da inibição da prostaglandina, prostanoídes e citocinas pró-inflamatórias (LUSTOSA et al., 2008). A própolis pode ainda ser utilizada na cicatrização de feridas cutâneas, devido à supressão do fator de transcrição NFκB, que está associado à inflamação (OLDONI et al., 2011).

O método de extração da própolis interfere diretamente no rendimento e seletividade de alguns componentes. A técnica comumente empregada utiliza etanol como solvente, mas a sua extração também pode ser realizada com fluido supercrítico (MACHADO et al., 2015; MACHADO et al., 2016). A depender do tipo de extração e solvente, a própolis vai apresentar constituintes distintos, por exemplo, a que é obtida por meio da extração aquosa contém aminoácidos, matéria orgânica e carboidratos, constituintes que não estão presentes na extração etanólica.

Os principais agentes farmacológicos da própolis possuem caráter polar, sendo assim, uma solução hidroalcolica é ideal como veículo extrator (HAYACIBARA et al., 2005; PONTES et al., 2018). Estudos ainda demonstram que as diferentes concentrações de etanol podem apresentar ou não diferenças em relação há algumas atividades farmacológicas (PARK et al., 1998), enquanto que o álcool a 70% apresenta uma melhor produção de compostos fenólicos, evidenciando melhor algumas propriedades biológicas (SIQUEIRA et al., 2009; PONTES et al., 2018).

2.3 Formulações Contendo Própolis Vermelha

Diversas pesquisas mostram a utilização de biofilmes na indústria alimentícia, visando a melhoria das características sensoriais (FERNÁNDES, et al., 2017). Sendo assim, biofilmes são revestimentos flexíveis de composições diversas, formados a partir de macromoléculas biológicas, capazes de formar substratos contínuos e altamente coesivos, utilizados para encapsular alimentos, principalmente alimentos altamente perecíveis, como frutas e hortaliças (OLIVEIRA, et al., 2011). Em outros estudos, agentes antimicrobianos, antioxidantes e conservantes também são adicionados às formulações de biofilmes (BITTANTE, et al., 2012; COSTA, 2013; TORLAK; SERT, 2013; SIRIPATRAWAN; VITCHAYAKITTI; 2016; THOMAS, 2016). Compostos naturais, como a própolis, são mais procurados, principalmente porque os biofilmes formados podem ser ingeridos juntamente com os alimentos (ABREU, 2019).

Em sua pesquisa ALMEIDA (2017), microencapsulou extrato de PVA usando caseinato como agente encapsulante, pela técnica de *spray-drying*. Depois da devida caracterização, os resultados demonstraram que foi possível comprovar a ocorrência da microencapsulação do extrato de PVA na matriz proteica. O pó obtido continha propriedades reológicas apropriadas e, por fim, o complexo se mostrou solúvel em meio aquoso. Outros resultados desse estudo mostraram que os caseinatos de PVA demonstram atividade antimicrobiana, podendo ser aplicados em terapias antibioticoterapias de amplo espectro para bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, especialmente *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* (ALMEIDA, 2017).

HAJINEZHAD e colaboradores (2020) buscaram investigar as propriedades mecânicas e antibacterianas de filmes de embalagens ativas à base de álcool polietileno vinílico pela adição de própolis vermelha. Para a própolis bruta utilizada foi incluída em uma matriz polimérica em diferentes proporções. A gelificação iônica foi utilizada como método de microencapsulação. Os autores chegaram à conclusão que o filme produzido com a inclusão da própolis vermelha obteve melhor homogeneidade, assim como uma melhor proteção contra o oxigênio (oxidação), bem com maior permeabilidade na presença de umidade. A resistência mecânica dos filmes ativos produzidos foi diminuída, no entanto, aceitáveis. Por fim, esses filmes ativos produzidos mostram ter boas propriedades antimicrobianas e, especificamente, contra a *E. coli* e *S. aureus*.

Portanto, as diversas formulações criadas à base de própolis vermelha têm sempre o objetivo de proteger o material encapsulado ativo para que os produtos bioativos das substâncias fiquem estáveis, bem como melhorar suas propriedades físico-químicas.

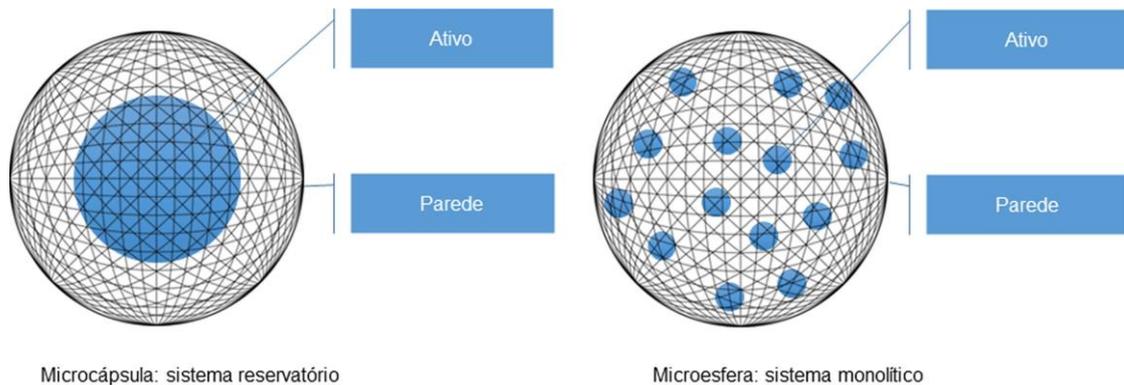
2.4 Microencapsulação

A microencapsulação pode ser entendida como um conjunto de técnicas que permitem o desenvolvimento de formulações, do qual o seu conteúdo é protegido e a sua liberação pode ser modificada com a finalidade de agir em um determinado local, por um determinado período de tempo em uma velocidade específica (SUAVE et al., 2006). Essa técnica tem por finalidade o “empacotamento” do material ativo na forma sólida líquida ou gasosa, contando com o auxílio de uma vasta gama de “material de parede”, da qual a escolha certa influencia a eficiência da microencapsulação e a estabilidade da micropartícula formada (GUEVARA; JIMÉNEZ, 2008; RAY et al., 2016; SILVA et al., 2014).

O material encapsulado é chamado de recheio ou núcleo e o material que forma a cápsula chama-se de encapsulante, cobertura ou parede (GIBBS, 1999). As micropartículas resultantes são classificadas em termos de tamanho e morfologia, dependendo do agente e processo de encapsulamento utilizado (BAKRY et al., 2015; ESTEVINHO et al., 2013). Segundo SILVA et al. (2014), as partículas podem ser classificadas de acordo com seu tamanho de: (a) partículas ($\geq 5.000 \mu\text{m}$), (b) micropartículas (0,2 a $5.000 \mu\text{m}$) e (c) nanopartículas ($\leq 0,2 \mu\text{m}$).

Em termos de morfologia, muitos autores utilizam o termo microcápsula para se referir às micropartículas. No entanto, as micropartículas incluem dois grupos: (i) microcápsulas, que consistem em um sistema tipo reservatório, e (ii) microesferas, que são um sistema monolítico (MATTÉ; ROSA, 2013; NUNES et al., 2015). Abaixo, a figura 6 mostra comparação entre as morfologias de microcápsulas e microesferas.

Figura 6 – Morfologia da micropartícula e microesfera.



Fonte: MATTÉ; ROSA, 2013; NUNES et al., 2015.

Nos sistemas de microencapsulação, o material ativo é bem definido e completamente envolvido pelo encapsulamento. Já no sistema monolítico, a microesfera, a estrutura do tipo matriz e a matéria ativa estão dispersas em uma matriz contínua. Neste caso, o material ativo pode ser disperso no agente de encapsulamento ou terminado em sua superfície (AZEREDO, 2005; MATTÉ; ROSA, 2013; NAZZARO et al., 2012; NESTERENKO et al., 2013; PASIN et al., 2012; RAY et al., 2016).

Um número expressivo de agentes encapsulantes vem sendo usado, justamente por envolver os compostos bioativos, dando forma à microcápsula (AZEREDO, 2005). As diferentes origens desses agentes encapsulantes podem ser desde natural, semissintético ou sintético (ANSON, 2005). Também podem envolver materiais poliméricos, hidrófilos ou hidrófobos, ou uma associação de ambos (JAIN, 2004). Abaixo, na tabela 2, são mostrados alguns exemplos de agentes encapsulantes classificados de acordo com a sua origem.

Tabela 2. Agentes encapsulantes versus origem.

Agentes encapsulantes	Materiais
Naturais	Gelatina, goma Agar-Agar, alginato de sódio, alginato de cálcio, dextrano, quitosano, caseinato, agarose e cera
Semissintéticos	Acetato de celulose, nitrato de celulose, etilcelulose, hidroxipropilcelulose, metilcelulose, carboximetilcelulose de sódio, álcool miristílico, monoglicerol ou dipalmitato, mono, di e triestearato de glicerol
Sintéticos	Polímeros do ácido acrílico e co-polímeros

Fonte: Adaptado de ANSON, 2005.

Muitas técnicas podem ser usadas para encapsular compostos bioativos, e a escolha, dependendo da aplicação, será responsável pelo tamanho, mecanismo de liberação e propriedades físico-químicas, tanto em termos do ingrediente ativo encapsulado quanto do agente de encapsulamento (JACKSON; LEE, 1991; BRASILEIRO 2011). A seleção do agente de encapsulamento deve ser baseada em determinados critérios, a saber, as propriedades físico-químicas do material bioativo encapsulado, o tipo de aplicação pretendida e o método de encapsulamento selecionado (SUAVE et al., 2006). Muitas áreas como na indústria farmacêutica, alimentícia e cosmética vêm utilizando a técnica de microencapsulação para proteção de compostos bioativos, tendo como finalidade a proteção do material encapsulado das condições adversas do meio e liberá-lo em seu sítio de ação em quantidade e no tempo conveniente para desempenhar a função pretendida (SHAHIDI; HAN, 1993; GIBBS, 1999).

Dentre as vantagens da microencapsulação podemos citar: (1) estabilizar o material encapsulado; (2) controlar reações oxidativas; (3) liberar o material ativo de forma controlada; (4) mascarar sabores, cores ou odores indesejáveis; (5) reduzir a toxicidade do material ativo; (6) aumentar a vida útil do material final (FAVARO-TRINDADE et al., 2008; MENEZES et al., 2013).

A microencapsulação de compostos bioativos vem sendo usada na proteção de diversos produtos, como óleos, ácidos, bases, vitaminas, sais, gases, aminoácidos, corantes, flavorizantes, extratos de plantas, enzimas, microrganismos, entre outros (DEYPERE et al., 2003; PSZCZOLA, 1998; REINECCIUS, 1991; SOUSA et al., 2015).

No entanto, o uso de outras técnicas de encapsulamento, como gelificação iônica, pode proporcionar melhor proteção aos compostos encapsulados dependendo das condições utilizadas para a produção das micropartículas (KRASAEKOOPT et al., 2003).

2.5 Gelificação Iônica

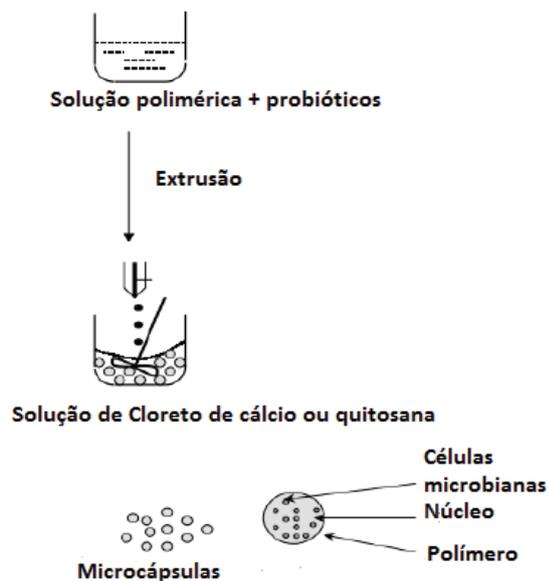
A gelificação iônica é uma técnica que vem sendo bastante utilizada na modificação de hidrocoloides para microcápsulas (ETCHEPARE et al., 2015). Tal técnica é comum, acessível e realizada em condições brandas para não degradar o material a ser encapsulado (KING, 1995; MORTAZAVIAN et al., 2007). É um método físico-químico que se baseia nas interações iônicas entre compostos de cargas opostas (SARAVANAN; RAI, 2010).

A formação de microesferas por gelificação iônica é dependente da capacidade de vários polissacarídeos, como pectina, alginato de sódio e carragenina, em formar géis na presença de

íons polivalentes (ROCHA, 2017). Essencialmente, este método consiste em derramar ou pulverizar uma solução de polissacarídeo aniônico sobre uma solução de cátions, em uma concentração apropriada (AGUILAR et al., 2015). Com as microcápsulas de gel ionizado, forma-se uma estrutura tridimensional, que é responsável por proteger o composto ativo (NAZARENO et al., 2016).

Existem dois métodos de gelificação iônica, podendo ser interno ou externo. De acordo com CHAM *et al.* (2006), o método mais utilizado para que se ocorra a gelificação iônica é o externo, da qual consiste em colocar uma solução de alginato de sódio (polímero) com carga negativa em uma solução iônica contendo CaCl_2 , carregada positivamente, em agitação constante. Com o transporte de cátions de uma região mais concentrada para outra menos concentrada dentro da solução de alginato de sódio, produzindo *beads* (esferas) de diferentes forma e tamanhos. Os principais fatores que influenciam a formação destas são: (1) concentração da solução de CaCl_2 ; (2) concentração da solução de alginato de sódio; (3) comprimento da agulha; (4) velocidade de gotejamento e (5) agitação. Abaixo, um sistema de extrusão por gotejamento é mostrado na figura 7.

Figura 7 – Esquema de extrusão para gelificação iônica de materiais.

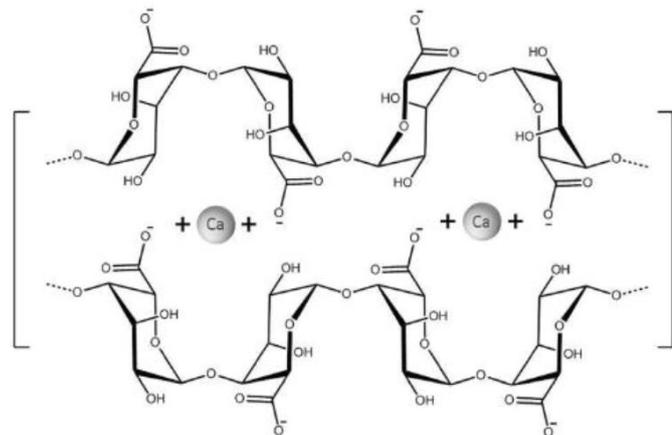


Fonte: KRASAEKOOPT, BHANDARI & DEETH, 2000. Probióticos Foi usado como um exemplo para o esquema apresentado.

Em presença de Ca^{2+} e outros íons divalentes, o polissacarídeo pode, por meio de um processo de ligação cruzada, trocar o íon de sua estrutura por um íon divalente, gelificando o meio em que se encontra (ETCHEPARE et al., 2015). Os cátions monovalentes e o íon Mg^{2+} não induzem a essa gelificação. Íons como Pb^{2+} , Cu^{2+} , Cd^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} e Mn^{2+} possuem uso limitado por apresentarem certa toxicidade (KRASAEKOOPT; BHANDARI; DEETH, 2003).

Devido a essa propriedade de gelificação, o alginato de sódio pode ser usado como uma matriz e, dessa forma, envolver moléculas de significância biológica, tais como, enzimas, plantas, células animais e medicamentos (VALENGA, 2007). O alginato de sódio gelifica após ligação dos íons Ca^{2+} aos blocos de ácido glicurônico das cadeias de alginato, formando uma rede tridimensional, constituindo o modelo da “caixa de ovos”, conforme figura 8 (GOMBOTZ & WEE, 1998).

Figura 8 – Modelo caixa de ovos para complexação do alginato de sódio em solução de cloreto de cálcio (CaCl_2).



Fonte: Adaptado de CORONA-HERNANDEZ et al. 2013

WANG *et al.* (2013) investigaram a possibilidade de encapsular óleo de canola enriquecido com quartetina, utilizando alginato de sódio em diferentes concentrações e pectina, como material de encapsulamento. As formulações de alginato de sódio e pectina demonstraram bons resultados na preservação do óleo de canola, mostrando-se uma boa opção para encapsulamento desta substância.

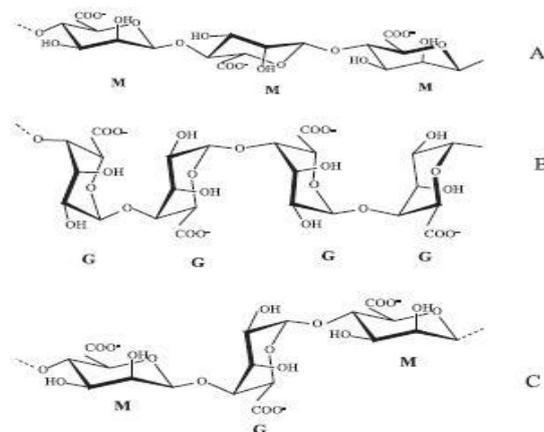
As principais vantagens do método de gelificação iônica estão associadas com a técnica ser simples, barata e necessitar de condições suaves que não agridem o material a ser encapsulado (KING, 1995; MORTAZAVIAN et al., 2007). Outra vantagem desse método diz

respeito às características comuns e de reprodução, tendo em vista a rapidez do método na produção de micropartículas na ausência de condições drásticas, diminuindo perdas de atividade biológica do composto que deverá ser encapsulado (ETCHEPARE et al., 2015). Ainda, a técnica não necessita de condições extremas de pH, permitindo que o método seja ideal e com uma perspectiva promissora para a microencapsulação de compostos bioativos (CHEW et al., 2015; WANG et al., 2013; LI et al., 2010).

Hidrocoloides são particularmente atraentes por causa de suas propriedades de formação de gel e mudança de viscosidade quando dispersos em meios aquosos como o alginato de sódio, usado como material de encapsulamento devido à sua capacidade de absorver água e facilidade de manuseio. Ainda, possui outras propriedades como espumação, estabilidade e espessamento, razões pelas quais tem despertado grande interesse na indústria alimentícia (PASIN, AZON & GARRIGA, 2012). Dentre os sais de alginato mais utilizados está o alginato de sódio, devido à sua alta capacidade de produzir filmes, géis e hidrogéis (PASQUALIM et al., 2010).

O alginato quimicamente tem uma estrutura linear composta de resíduos de ácido β -D-manurônico (M) e ácido α -L-glicurônico (G) (Figura 9), na forma de sais de sódio e ligados por ligações glicosídicas α 1-4 (STEPHEN et al., 2006). As propriedades do alginato em solução são fortemente influenciadas pela remoção de resíduos, que ocorre em blocos de homopolímeros (MM e GG) intercalados por blocos de heteropolímeros (MG) ao longo da cadeia (STEPHEN et al., 2006).

Figura 9 – Estrutura do alginato em blocos homopoliméricos M- e G- e heteropoliméricos MG.



Fonte: Adaptado de SMIDSRØD, 1970.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Desenvolver e caracterizar microencapsulados contendo PVA obtidas por gelificação com alginato de sódio e CaCl_2 .

3.2 Objetivos Específicos

- Obter microencapsulados (*beads*) contendo PVA variando concentrações de alginato de sódio e CaCl_2 por gelificação iônica;
- Avaliar os microencapsulados (*beads*) contendo PVA, por meio da perda de massa via análise de umidade;
- Avaliar a morfologia dos microencapsulados (*beads*) contendo PVA por microfotografias usando microscopia eletrônica de varredura (SEM);
- Determinar a composição química dos microencapsulados (*beads*) contendo PVA por cromatografia líquida de alta-eficiência com detecção de arranjo diodo (HPLC-DAD);
- Caracterizar os microencapsulados (*beads*) contendo PVA por espectrofotometria de infravermelho por transformada de Fourier com reflectância total atenuada (FTIR-ATR);
- Caracterizar os microencapsulados (*beads*) contendo PVA por análises termogravimétricas (TG) e calorimetria exploratória diferencial (DSC);
- Avaliar a solubilidade dos microencapsulados (*beads*) contendo PVA usando agentes quelantes;
- Quantificar os compostos fitoquímicos presentes nos microencapsulados (*beads*) contendo PVA por meio de cromatografia líquida de alta-eficiência com detecção de arranjo diodo (HPLC-DAD).

4 METODOLOGIA

A produção e as caracterizações espectrofotométricas e térmicas dos microencapsulados (*beads*) contendo PVA foram realizadas no Instituto Federal de Alagoas, *campus* Maceió, sob supervisão do Prof. Dr. Johnnatan Duarte de Freitas. Já a quantificação dos componentes da formulação foi realizada no Laboratório de Análises Farmacêuticas e de Alimentos (LAFa) – coordenado pelo Prof. Dr. Ticiano Gomes do Nascimento, da Universidade Federal de Alagoas, *campus* AC. Simões, Maceió. No total, 10 mL de extrato comercial de PVA da marca Beeva® (composição: 11% de PVA, 59% de álcool grau alimentício, 30% de água. Não contém quantidades significativas de valor calórico, carboidratos, proteínas, gorduras totais, gorduras trans, gorduras saturadas, fibra alimentar e sódio), que foi adquirido no município de Marechal Deodoro junto aos produtores locais da região e utilizado para obtenção dos microencapsulados. Registro no Ministério da Agricultura SIF/DIPOA sob N° 0005/3884.

4.1 Obtenção dos Microencapsulados (*Beads*) Contendo PVA Variando Concentrações de Alginato de Sódio e Cloreto de Cálcio

4.1.1 Planejamento experimental das formulações

Para a realização dos experimentos e produção dos microencapsulados de alginato de sódio contendo PVA, foi inicialmente traçado um planejamento experimental para o desenvolvimento de oito formulações, em triplicata, totalizando 24 experimentos possíveis, contendo diferentes concentrações de PVA (0 ou 5%), alginato de sódio e CaCl_2 . Para este, o Microsoft Office Excel 16 foi utilizado. A tabela 3 fornece a composição das formulações planejadas.

Tabela 3. Formulações desenvolvidas variando-se as concentrações de CaCl₂, alginato de sódio e Própolis Vermelha de Alagoas (PVA).

Ordem Aleatória das Triplicatas das Formulações	Ordem de Execução das Triplicatas das Formulações	% CaCl₂	% Alginato de Sódio	%PVA
15	1	0,5	2	5
2	2	1	1	0
13	3	0,5	1	5
1	4	0,5	1	0
22	5	1	1	5
20	6	1	2	0
11	7	0,5	2	0
18	8	1	1	0
17	9	0,5	1	0
10	10	1	1	0
24	11	1	2	5
5	12	0,5	1	5
12	13	1	2	0
3	14	0,5	2	0
7	15	0,5	2	5
19	16	0,5	2	0
21	17	0,5	1	5
6	18	1	1	5
4	19	1	2	0
8	20	1	2	5
16	21	1	2	5
23	22	0,5	2	5
14	23	1	1	5
9	24	0,5	1	0

Fonte: Autor, 2022.

Inicialmente, os microencapsulados alginato de sódio contendo PVA foram preparados em um balão volumétrico de 200 mL, onde foi adicionada uma solução de 200 mL de alginato de sódio (a 1 ou 2%) e 5% de PVA. Para os *beads* brancos, PVA não foi adicionada. Em seguida, as amostras prontas foram colocadas em 4 frascos onde foram rotuladas com respectivos nomes e concentrações (Figura 10) e, subsequentemente, mantidas sob refrigeração (5 °C). O potencial

hidrogeniônico (pH) das amostras (20 mL) foi avaliado por pHmetro para se obter informações sobre acidez e basicidade das mesmas.

Figura 10 – Amostras de alginato de sódio e PVA (A) e pHmetro utilizado na determinação da acidez/basicidade (B).

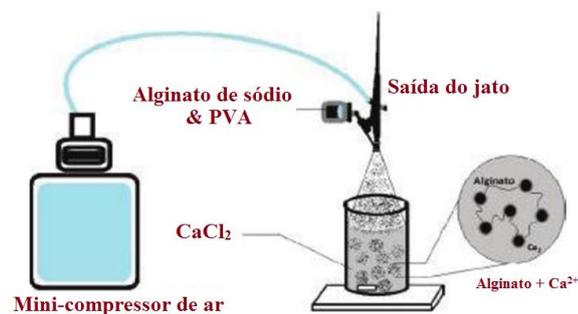


Fonte: Autor, 2022.

4.1.2 Microencapsulados (*beads*) obtidos utilizando um aerógrafo como método de extrusão

Essa variação do método de extrusão foi utilizada com o objetivo de se obter partículas de diâmetros reduzidos. Para isso, foi utilizado um aerógrafo acoplado a um mini-compressor de ar (Consumo de ar do aerógrafo: 0,07 pcm (2 L/min); Pressão de trabalho do aerógrafo: 50 lbf/pol²; Diâmetro do bico: 0,4 mm). Abaixo, um esquema representativo para o método de extrusão acoplado a um mini-compressor de ar é mostrado abaixo (Figura 11).

Figura 11 – Processo de microencapsulação utilizando um aerógrafo acoplado a um mini-compressor de ar.



Fonte: ETCHEPARE et al., 2016.

Assim, 10 mL de uma solução de alginato de sódio a 2% e PVA (5%), em um Becker de 100 mL, com agitação de 700 rpm. Em seguida, a solução resultante foi adicionada ao aerógrafo para proceder a extrusão. Colocou-se em um outro Becker (posicionado abaixo do aerógrafo) contendo 80 mL de uma solução de CaCl₂ (0,5%) em agitação vigorosa (700 rpm),

sem aquecimento. A pressão do jato do aerógrafo foi mantida constante. Depois que os 10mL da solução foram totalmente jateados à solução de CaCl_2 a 0,5%, as microesferas permaneceram sob agitação durante 20 minutos, para que as mesmas ganhassem maior espessura de suas paredes, assim, aumentando a sua capacidade de resistência à ruptura mecânica (RACOVITA et al., 2009; PASQUALIM et al., 2010). Por fim, os *beads* gerados foram coletados, após filtração a vácuo, e mantidos posteriormente em filtros de papel, permanecendo em dessecador durante 48 horas. Após o processo de lavagem das microesferas, estas foram colocadas em placas de Petri para perderem umidade no processo de secagem, utilizando sílica em um dessecador.

4.1.3 Obtenção de microencapsulados pelo método de gelificação iônica

Para a obtenção dos *beads* pelo método de gelificação iônica foi utilizada uma seringa de vidro de 20 mL, onde se colocou 10 mL de amostra (branco: alginato de sódio (2%) apenas; ativo: alginato de sódio (2%) e PVA (5%). Esta foi gotejada em uma solução gelificante em um Becker contendo 80 mL de solução de CaCl_2 (0,5%), com agitação a 700 rpm, à temperatura ambiente. À medida que as gotas entraram em contato com solução de CaCl_2 , as mesmas assumiram forma esféricas, ocorrendo a gelificação iônica propriamente dita. Depois que os 10 mL da solução foram totalmente gotejados na solução gelificante, as microesferas permaneceram sob agitação durante 20 minutos, para que as esferas ganhassem estabilidade mecânica, como mostrado na figura 12. Após esse tempo, as microesferas passaram pelo processo de lavagem para retirar a solução residual de CaCl_2 . As esferas formadas na solução de CaCl_2 foram transferidas para um funil de 75 mm, onde foram lavadas com água destilada pelo menos 6 vezes. Em seguida, estas foram colocadas em placas de Petri para perderem umidade no processo de secagem com sílica em um dessecador.

Figura 12 – Método de extrusão por gotejamento para a gelificação iônica.



4.2 Avaliação dos Microencapsulados contendo PVA por Meio da Perda de Massa via Análise de Umidade

Foi pesado e verificado o peso médio das formulações produzidas em uma balança analítica de quatro casas decimais da Shimadzu série AUX. Para isso, as amostras foram pesadas imediatamente após a retirada da solução/lavagem e, em seguida, as mesmas foram pesadas durante 3 semanas, sendo uma vez por semana.

4.3 Caracterização das Composições dos Microencapsulados de PVA Usando Técnica de Microscopia Eletrônica de Varredura (SEM)

A SEM foi usada para obter fotomicrografias das morfologias observadas nos microencapsulados. O aparelho Vega III TESCAN, operando em 15 kV, com aumentos de x100, x200, x500, x1000, x2000 e x5000, foi usado para obtenção das fotomicrografias das formulações, com distância de trabalho de 15,97 mm. Para se achar o diâmetro das partículas foi utilizado um software VEGA TESCAN. Os microencapsulados (*beads*) foram fixados com fita adesiva dupla-face de carbono e, então, revestidos com ouro 40 mA, sob vácuo e analisado em equipamento Hitachi[®], modelo TM 3000. Durante as análises, uma corrente de 45 mA por 200 segundos e aceleração de voltagem igual a 20 kV.

4.4 Caracterização das Composições dos Microencapsulados de PVA por Espectrofotometria de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR) com Reflectância Total Atenuada (ATR)

Foram realizados 24 experimentos de FTIR-ATR, onde as referidas formulações foram submetidas à leitura na faixa de 4000 a 400 cm^{-1} , para obtenção dos espectros. Inicialmente, um branco foi realizado para remover os ruídos e interferentes do ambiente, usando 32 *scans*. Em seguida, um *bead* de cada triplicata obtida foi posicionado no prisma do aparelho para obtenção dos correspondentes espectros de FTIR-ATR. Por fim, os resultados foram tratados no software IRsolution, Shimadzu.

4.5 Caracterização das Composições dos Microencapsulados Contendo PVA por Termogravimetria (TG)

A curva termogravimétrica foi obtida por equipamento da Shimadzu, modelo TGA – 51H. Foi usada para curva de TG uma massa no valor de 5,961 mg, disposta em um cadinho de platina, razão de aquecimento, $10^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ e tendo como faixa de temperatura de 10 a 900°C , em atmosfera ar.

4.6 Caracterização das Composições dos Microencapsulados Contendo PVA por Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

As curvas calorimétricas (do inglês, *differential scanning calorimetry*) das amostras foram obtidas em um calorímetro modelo DSC 60 da Shimadzu, utilizando uma massa de $2,0 \pm 10\%$ mg, embalado em um cadinho de alumínio hermeticamente fechado *via* prensa. A taxa de aquecimento foi de $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$, iniciando em 19°C e finalizando em 600°C , sob atmosfera de nitrogênio com fluxo de $50\text{ mL}/\text{min}$.

4.7 Avaliação do Conteúdo dos Microencapsulados Contendo PVA

4.7.1 Teste de solubilidade dos microencapsulados obtidos por gelificação iônica por gotejamento

As formulações obtidas pelo método de gotejamento foram submetidas ao ensaio de dissolução para avaliar a solubilidade das mesmas e a velocidade de dissolução dos *beads*, bem como, verificar se havia a presença de PVA no conteúdo dos *beads* (que foi posteriormente confirmado por HPLC-DAD). Inicialmente, para analisar a solubilidade das formulações obtidas, foram feitos testes com EDTA e citrato de sódio (agentes quelantes). Foram pesados 15 mg dos *beads* de alginato de sódio, 9 mg de EDTA e 5 mg de citrato de sódio, e colocados em tubos para análise em triplicatas. No tubo 1 foram colocados 15 mg de *beads* contendo alginato de sódio e 9 mg de EDTA e volume total de 2 mL água destilada, rendendo uma solução a 0,02% (p/v) do agente complexante. No tubo 2 foram colocados 15 mg de *beads* contendo alginato de sódio e 5 mg de citrato de sódio em 2 mL de água destilada, rendendo uma solução a 0,02% (p/v) do agente quelante. No tubo 3 foram colocados 15 mg de *beads* contendo apenas

alginato de sódio, 4,5 mg de EDTA, 2,5 mg de citrato de sódio e 2 mL de água destilada, rendendo uma 0,02% (p/v). Os tubos foram colocados em um agitador magnético à temperatura ambiente. Foi analisado a cada 60 minutos, afim de verificar a solubilidade das amostras. Após 24 horas, verificou-se que o tubo 3 apresentava a melhor solubilização dentre as demais. Em seguida, o pH das três amostras presentes nos tubos 1, 2 e 3 foi determinado por pHmetro. Todos os passos desta etapa foram realizados em triplicatas.

4.8 Quantificação de Constituintes Fitoquímicos dos Presentes na Formulação de Microencapsulados Contendo PVA por Cromatografia Líquida de Alta-Eficiência com Detecção de Arranjo Diodo (HPLC-DAD)

Para a realização das análises de HPLC-DAD foi necessário extrair o conteúdo dos *beads* (após a solubilização dos mesmos, como descrita no tópico anterior) via extração líquido-líquido, usando acetato de etila como solvente extrator, em triplicatas. As triplicatas foram colocadas em um Becker, onde foram adicionados 20 mL de acetato de etila P.A. Após isso, o conteúdo do Becker foi depositado em um funil de separação para obtenção das frações orgânica e aquosa. A substituição da fase aquosa foi realizada quatro vezes (adicionando-se 20 mL de água a cada extração) para remover completamente os resíduos de quelantes e alginato. Posteriormente, 1 mL da fração orgânica foi extraída para análise da via HPLC-DAD, com coluna C18 Phenomenex (15 cm; 5 µm D). O mesmo operou nos seguintes parâmetros: corrida de 47 min, fluxo de 0,3 mL/min, com 2 µL de volume de injeção, forno a 33 °C, e com fase móvel em gradiente de acetonitrila e água mili-Q, variando de 30 a 100% de acetonitrila. Por fim, os compostos foram identificados e quantificados utilizando curva de calibração/quantificação desenvolvida pelo Laboratório de Análises Farmacêuticas e Alimentícias (LAFA), publicada por NASCIMENTO et al. (2016).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Avaliação dos Microencapsulados contendo PVA por Meio da Perda de Massa Via Análise de Umidade

Após a obtenção (~30 g/experimento) dos *beads*, foi possível observar que após a lavagem das formulações (Figura 13A). Os *beads* contendo alginato de sódio e PVA apresentaram-se com formas esféricas intumescidas e com coloração amarelo intenso (Figura 13B). Já os *beads* contendo apenas alginato de sódio também apresentaram formas esféricas, porém sem coloração (Figura 13C). Houve variação no número de *beads* por experimento. As formulações foram pesadas três vezes para observar a perda de umidade.

Figura 13 – *Beads* contendo alginato de sódio (1%) + PVA (5%) (em A e B), *beads* com alginato de sódio (1%) e sem PVA (em C) obtidos por extrusão via gotejamento.



Fonte: Autor, 2022.

Dessa forma, verificou-se que tanto amostras de PVA e alginato e aquelas contendo apenas alginato apresentaram massas semelhantes, como demonstradas na tabela 4. Entretanto, os pesos médios dos *beads* foram avaliados considerando as concentrações alginato e PVA, como descrito adiante.

Tabela 4. Relação da pesagem das formulações com a perda de umidade.

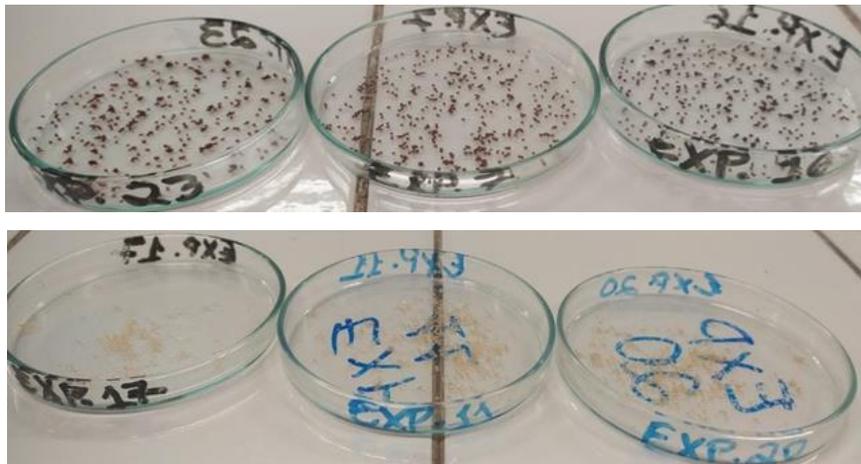
Formulação	Massa (g)			
	Instante zero*	1ª Semana	2ª Semana	3ª Semana
1	35,248	32,019	32,019	32,019
2	44,863	39,277	39,276	39,275
3	34,896	31,788	31,784	31,784
4	32,569	29,302	29,299	29,298
5	31,356	28,961	28,960	28,960
6	31,879	28,768	28,767	28,766
7	30,899	28,843	28,841	28,841
8	30,702	29,777	29,776	29,775
9	32,051	29,845	29,844	29,843
10	33,258	30,349	30,344	30,344
11	30,369	28,550	28,550	28,550
12	31,125	29,075	29,071	29,071
13	32,659	29,364	29,364	29,364
14	30,694	28,913	28,912	28,912
15	33,258	39,697	39,697	39,697
16	30,465	29,314	29,313	29,311
17	32,168	30,104	30,104	30,104
18	39,324	35,942	35,941	35,941
19	23,164	21,396	21,391	21,391
20	29,468	26,254	26,253	26,253
21	34,786	31,237	31,237	31,236
22	33,335	30,457	30,456	30,456
23	31,586	29,279	29,275	29,275
24	33,245	30,652	30,649	30,649

Fonte: Autor, 2022. *: Instante zero significa pesagem após filtração e lavagem dos beads, durante o processo de obtenção dos mesmos. As massas dos beads na tabela correspondem ao conjunto.

As três pesagens das formulações, em semanas diferentes, mostram o processo de perda de umidade e secagem dos *beads*. Na medida em que os valores das massas das formulações foram estabilizados foi possível perceber que os *beads* estavam secos. Considerando todas as amostras obtidas, tem-se que: a média da pesagem do primeiro dia teve valor de $30,38 \pm 3,72$

g. Em adição, a média do segundo dia de pesagem teve valor de $30,38 \pm 3,72$ g. Por fim, a média do terceiro dia de pesagem teve o valor de $30,38 \pm 3,72$ g. Não teve variação do peso médio. Já considerando as amostras contidas em quatros grupos, sendo (1) PVA (5%) + alginato de sódio (1%) + CaCl_2 (0,5%), (2) PVA (5%) + alginato de sódio (2%), (3) Alginato de sódio (1%) + CaCl_2 (0,5%), e (4) Alginato de sódio (2%) + CaCl_2 (1%), observou-se valores de $29,611 \pm 1,002$ g, $30,921 \pm 4,394$ g, $32,916 \pm 3,856$ g, e $24,926 \pm 7,115$ g, respectivamente. Quando comparando os grupos 1 e 3, pode-se afirmar que as formulações “branco” contendo apenas 1% de alginato de sódio apresentam um maior peso médio, o que sugere que estas absorvem mais água do meio. Já comparando-se os grupos 2 e 4, observa-se o inverso, as formulações contendo 2% de alginato de sódio resultam *beads* com pesos médios inferiores aqueles obtidos para formulações contendo PVA (5%) + alginato de sódio (2%), mesmo considerando os valores de desvio padrão. Abaixo, a figura 14 mostra os *beads* depois do processo de secagem.

Figura 14 – Formulações nº 7, 16, 23, 17, 11 e 20 obtidas pelo método de gelificação iônica por gotejamento e após o processo de secagem com sílica em dessecador



Fonte: autor, (2022).

Após o processo de secagem foi possível observar que algumas formulações se mantiveram esféricas, como os *beads* contendo PVA e alginato de sódio, enquanto outras perderam suas morfologias definidas. A maioria dos *beads* de alginato de sódio sem a PVA também perdeu a forma esférica. Para observar se as formulações perderam ou mantiveram a forma foi preciso analisar as mesmas por meio da microscopia eletrônica de varredura (SEM).

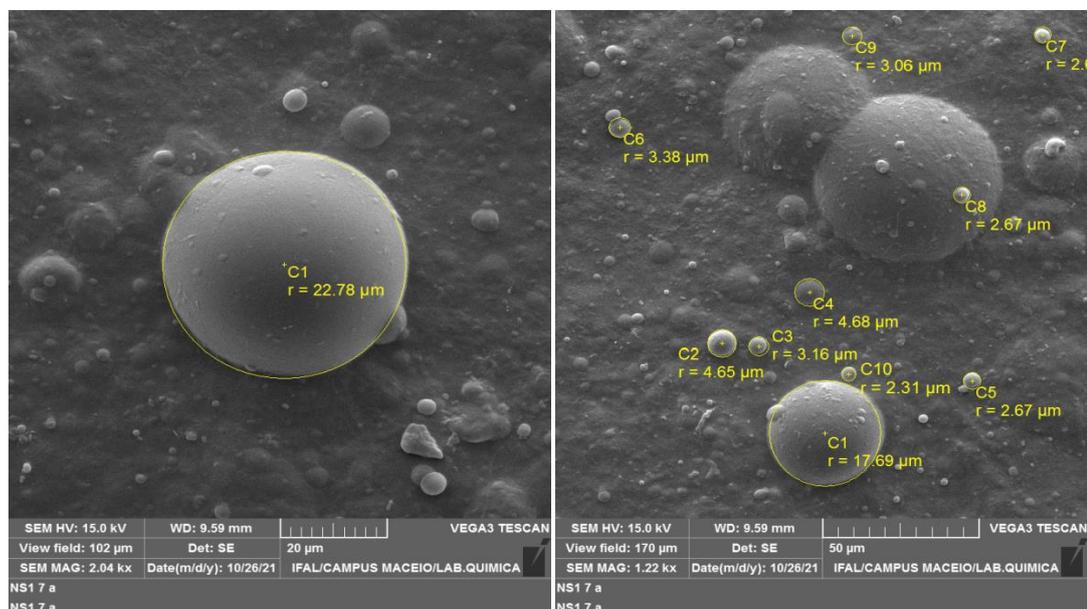
5.2 Caracterização das Composições dos Microencapsulados de PVA Usando Técnica de Fotomicrografia (SEM)

5.2.1 Microencapsulados utilizando um aerógrafo como método de extrusão

A técnica de extrusão utilizando um aerógrafo foi utilizada para obtenção de experimentos de microencapsulados de PVA e alginato de sódio. Essa técnica é muito pesquisada para o desenvolvimento de partículas ou filmes a partir da solução de alginato de sódio (FARIAS, 2018). À medida que foram desenvolvidos os experimentos, percebeu-se aparentemente que os *beads* não estavam sendo formados. Ao invés disso, filmes de PVA e alginato de sódio estavam sendo obtidos. Segundo Rodrigues (2015) a obtenção de filmes, começa pelo desenvolvimento do gel através de ligações intra e intermoleculares cruzadas entre as cadeias do alginato de sódio, o que forma uma matriz tridimensional semirrígida.

Após o processo de secagem em um dessecador contendo sílica, análises de microscopia eletrônica de varredura (SEM) confirmaram que se tratava de uma mistura de filme e beads de PVA. Na figura 15, uma fotomicrografia de uma formulação contendo PVA 5% obtida via aerógrafo.

Figura 15 – Microfotografias de uma formulação de microencapsulados contendo 5% PVA obtida por aerógrafo.



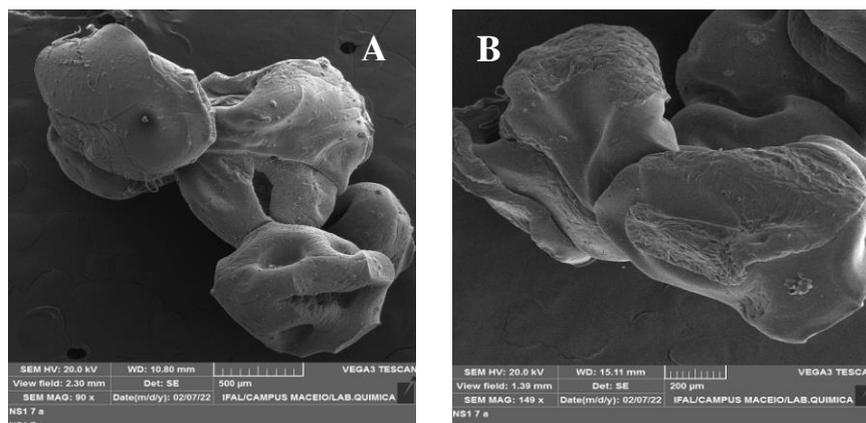
Fonte: Autor, 2022.

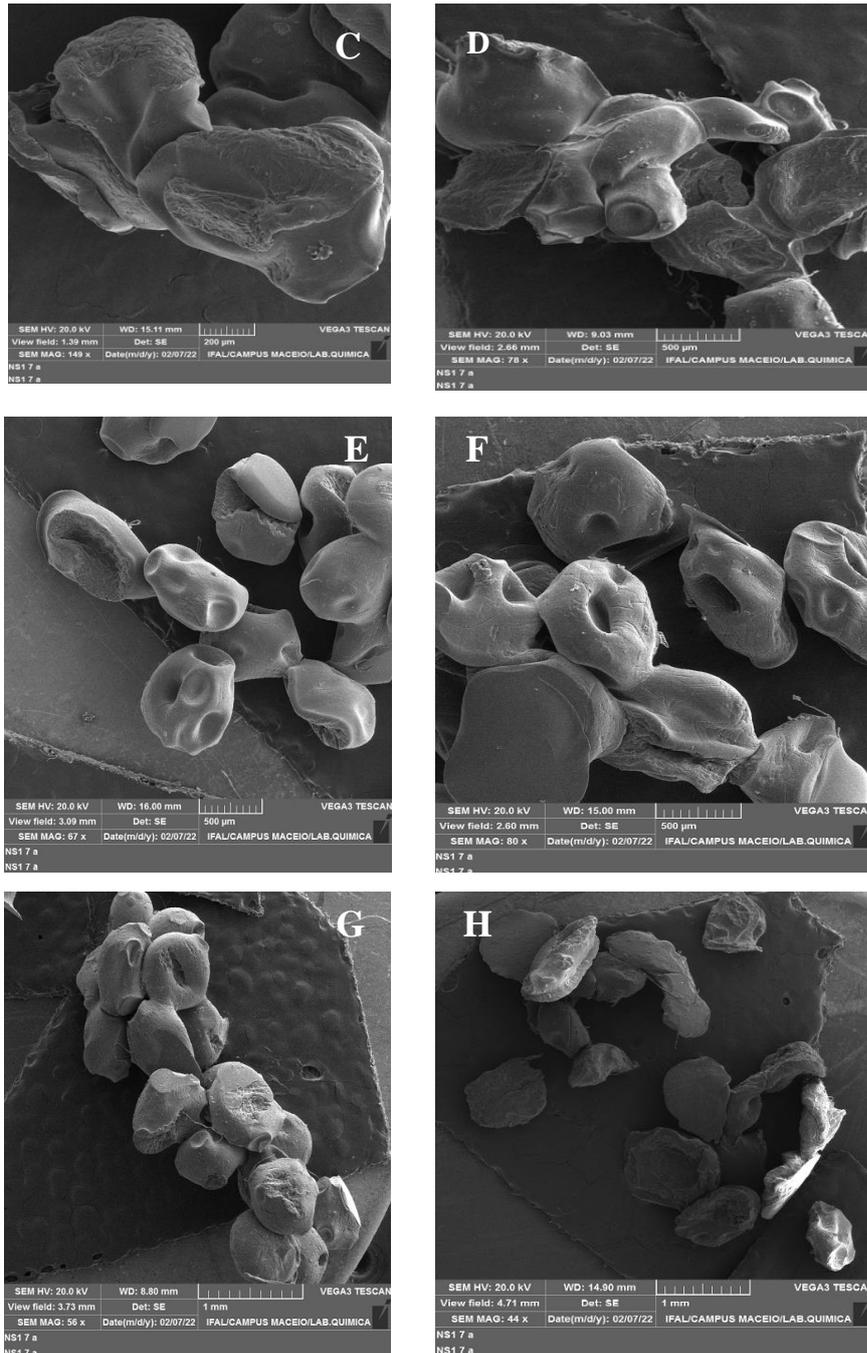
As fotomicrografias mostram algumas micropartículas esféricas com diâmetros variando entre 2, 31 e 22,78 μm . Dentre todas as composições analisadas, a triplicata n° 15 (0,5 CaCl_2 + 2% alginato de sódio + 5% PVA) foi analisada pelo SEM. Entretanto, o intuito do referido estudo é a obtenção de microencapsulados contendo PVA e não um filme. Portanto, a técnica empregada levou à formação de uma grande quantidade de filme e por conta disso resolve-se interromper os experimentos e começar utilizando outro método para a obtenção dos microencapsulados. Dessa forma, decidiu-se mudar o método de extrusão para obtenção dos *beads*.

5.2.2 Microencapsulados obtidos por extrusão via gotejamento

Os microencapsulados contendo PVA (0% a 5%) e alginato de sódio (1% a 2%) foram submetidos à análise da SEM para avaliar a morfologia externa das micropartículas das formulações. Com a referida análise foi observado que as fotomicrografias revelaram uma superfície irregular. A microencapsulação do extrato de própolis com alginato de sódio (Figura 16 – A, C, G, H) resultou em microencapsulados com formato e superfície mais uniforme e com poucas rugosidades, além de tamanhos variados. As micropartículas produzidas apenas com alginato de sódio sem a PVA (Figura 16 – B, D, E, F) não apresentam formato esférico, superfícies com concavidades e tamanhos variados. Na figura 16 encontra-se ilustrada 8 formulações que foram realizadas em triplicatas, contendo PVA e alginato de sódio e apenas alginato de sódio.

Figura 16 – Fotomicrografias das Formulações: (A) e (G) PVA (5%), alginato de Sódio (2%); (B) e (D) PVA (0%), alginato de sódio (1%); (C) e (H) PVA (5%), alginato de sódio (1%); (E) e (F) PVA (0%), alginato de sódio (2%).





Fonte: Autor, 2022. N° das Formulações: (A) 15; (B) 2; (C) 13; (D) 1; (E) 20; (F) 11; (G) 16 e (H) 22. As concentrações de cloreto de cálcio (CaCl_2) variaram entre 0,5% a 1% nas formulações.

Em quase todas as formulações foi possível observar microencapsulados que apresentam cavidades e características de partículas vazias. Em seus estudos, RAFFIN (2006) mostrou que as micropartículas que possuem características de uma partícula vazia (murcha) são formadas por forças de retração desiguais que ocorrem à medida que as microesferas perdem umidade. Paralelamente, ALMEIDA (2017), em seu estudo envolvendo microencapsulação de PVA usando caseína, obteve partículas com aspecto murcho e cavidades na superfície, sugerindo que a caseína não encapsulou a PVA efetivamente. Os resultados das

fotomicrografias apresentada mostram que partículas com aspectos vazios e com cavidade na superfície, observadas nas diferentes formulações, trata-se do alginato de sódio que não encapsulou o extrato de PVA e se encontra disperso.

A grande maioria das formulações e suas triplicatas demonstraram aglomerações nas micropartículas. Segundo ANDRADE *et al.* (2018), a aglomeração é uma característica típica do tipo de secagem das partículas obtidas.

Dentre os microencapsulados das formulações contendo PVA e alginato de sódio demonstradas nas fotomicrografias (A, C, G e H) a que apresenta melhor morfologia esférica, menos cavidade, parede lisa e menos rugosidade é a fotomicrografia da triplicata 16 (G). Já em relação aos microencapsulados das fotomicrografias (B, D, E e F) apenas contendo alginato de sódio, revelam partículas com cavidade, rugosidade, com aparência vazia e com fissuras em sua parede. Sendo assim, todos os experimentos das oito formulações realizadas em triplicatas, as triplicatas que melhor apresentaram resultados pelo SEM foram as de nº 8, 16 e 24, onde percebe-se a microencapsulação do extrato de PVA. Sendo que das três triplicatas contendo PVA (5%) e alginato de sódio (2%), a de nº 24 apresentou microencapsulados com parede mais lisa, poucas cavidades, tamanhos de partículas (diâmetro) uniformes e formação de filme contínuo na parede externa. Abaixo, na tabela X é mostrada as características morfológicas das formulações em triplicatas.

Tabela 5. Formulações em triplicata e suas principais características morfológicas

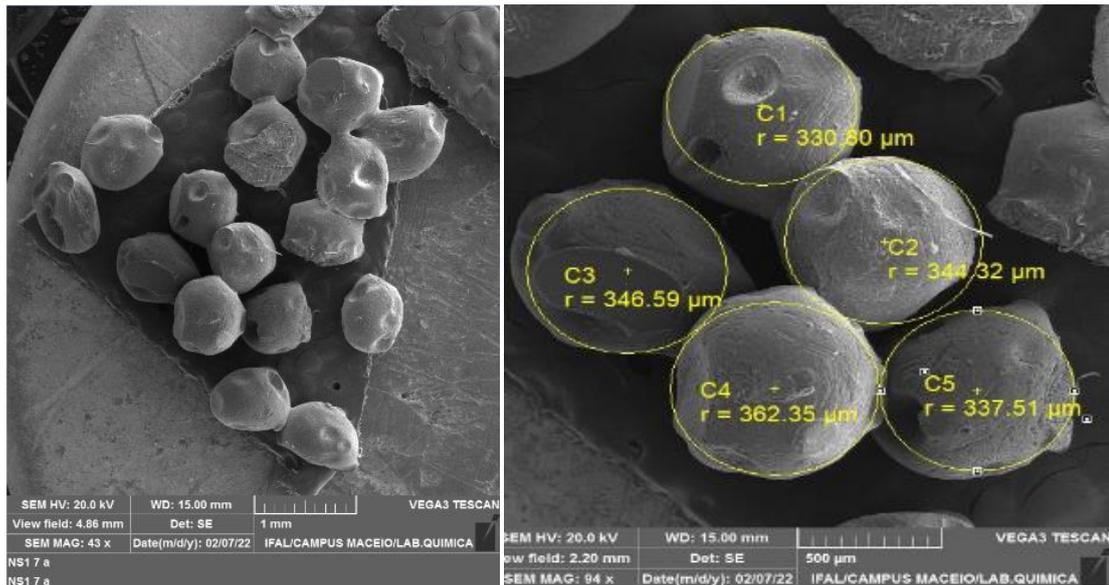
Nº da Triplicata da Formulação	Tamanho da Partícula (diâmetro em µm)	Forma da partícula	Aparência Física da partícula
1	420 – 494	Não esférica	Vazia
2	322 – 449	Não esférica	Vazia
3	411 – 523	Não esférica	Fissurações, deformações e partícula vazia
4	271 – 573	Esférica e não esférica	Fissurações e sulcos
5	347 – 491	Não esférica	Parede externa rugosa, não lisa e partícula vazia
6	500 – 635	Não esférica	Vazia, Parede externa rugosa e com fissurações
7	329 – 493	Esférica e não esférica	Parede externa lisa, fissurações e sulcos
8	267 – 383	Esférica	Parede externa Lisa, poucas fissurações, rugosidade e aglomeradas
9	295 – 564	Não esférica	Parede externa não lisa, fissurações, partículas vazias e aglomeradas

10	328 – 701	Não esférica	Aglomeradas, vazias, fissurações e lisas
11	326 – 485	Não esférica	Fissurações, sulcos e parede externa lisa
12	301 – 537	Não esférica	Aglomeradas, parede externa lisa e poucas fissurações
13	210 – 309	Não esféricas	Aglomeradas, parede externa não lisa, fissurações, sulcos e rugosa
14	314 – 488	Não esférica	Aglomeradas, vazia, Parede externa rugosa, com fissurações e sulcos
15	217 – 552	Não esférica	Aglomeradas, parede externa rugosa, fissurações e sulcos
16	287 – 500	Esférica	Aglomeradas, parede externa lisa, fissurações e sulcos
17	352 – 467	Não esférica	Vazia, parede externa rugosa, fissurações e sulcos
18	329 – 459	Não esférica	Vazia, Parede externa rugosa e fissurações
19	365 – 532	Não esférica	Aglomerada, Parede externa rugosa, fissurações e sulcos
20	299 – 485	Esférica e não esférica	Aglomerada, parede externa com fissurações e sulcos
21	319 – 423	Não esférica	Parede externa rugosa, fissurações e impureza
22	375 – 632	Não esférica	Vazia, parede externa rugosa, fissurações e sulcos
23	187 – 468	Não esférica	Aglomerada, parede externa rugosa, fissurações e sulcos
24	358 – 300	Esférica	Parede externa lisa e poucas fissurações

Fonte: Autor, 2022.

A partir destas análises foi possível observar que boa parte das microcápsulas se apresentou relativamente não esféricas e com algumas fissuras, sulcos e/ou depressões em suas paredes externas. A figura 16 mostra as fotomicrografias dos microencapsulados gerados a partir da triplicata nº 24, obtidas com aumentos de $\times 100$ e $\times 5000$. Foi possível verificar que esta triplicata apresentou a morfologia mais definida e compatível com microesferas. Segundo TONON *et al.* (2009), partículas que apresentam aspectos de superfície lisa e uniforme promovem uma melhor cobertura para envolver os compostos, dificultando reações de degradação, como a oxidação.

Figura 17 – Fotomicrografias da triplicata n° 24 de microencapsulados contendo PVA.



Fonte: Autor, 2022.

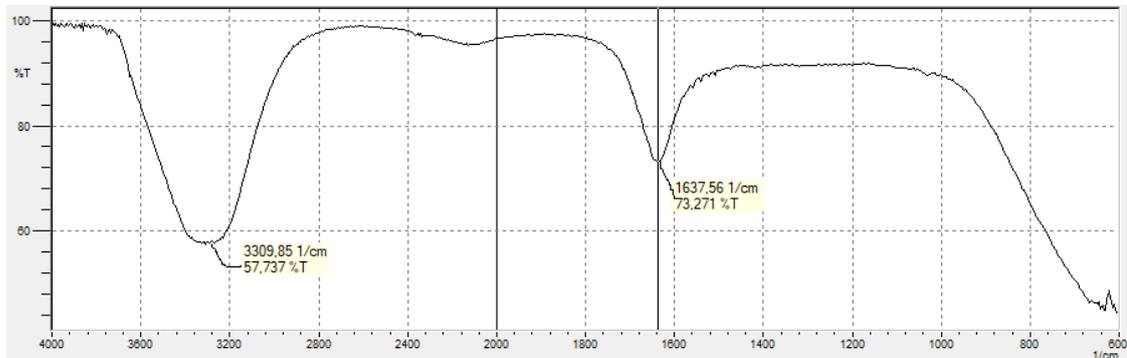
As fotomicrografias mostram partículas esféricas com o diâmetro variando entre 330,8 e 337,51 µm. A relativa uniformidade no diâmetro das microesferas se deve à viscosidade da solução de PVA, do diâmetro do orifício de gotejamento e da distância entre a sua saída e a solução gelificante (2,5 cm). Os encapsulados foram classificados de acordo com o tamanho de suas partículas, que variaram entre 1 a 1000 µm, assim, podendo ser chamados de microencapsulados (VYAS e KHAR, 2006). Dentre todas as composições analisadas, a triplicata n° 24 (1% CaCl₂+ 2% alginato de sódio + 5% PVA) apresentou os melhores resultados por MEV. Entretanto, faz-se necessário verificar os índices de encapsulação de PVA. A média de tamanho das esferas tem o valor de $358,68 \pm 30,56 \mu\text{m}$.

5.3 Caracterização das Composições dos Microencapsulados de PVA por Espectrofotometria de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR) empregando Reflectância Total Atenuada (ATR)

A espectroscopia infravermelha consiste basicamente na interação da radiação infravermelha com a matéria, fornecendo informações sobre as vibrações moleculares presentes no material. Conforme mostrado na Figura 18, a transformada de Fourier da espectroscopia de infravermelho tem uma alta relação sinal-ruído e é um método analítico padrão frequentemente usado para caracterizar estruturas de polímeros como alginato de

sódio (PASQUINI, 2003; CARNEIRO, 2004). Abaixo, na figura 18 um espectro de FTIR é mostrado para alginato de sódio.

Figura 18 – Espectro de FTIR para a formulação de alginato de sódio (2%) e sem PVA.

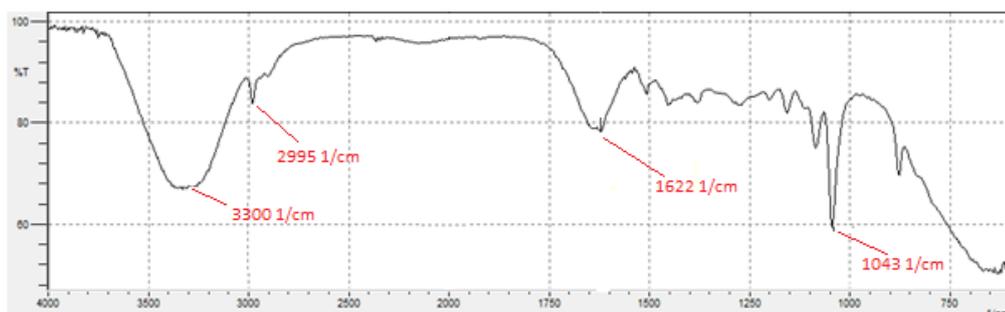


Fonte: Autor, 2022.

O espectro no infravermelho obtido para o alginato de sódio mostra dois picos em 1635 cm^{-1} existe um estiramento fraco–médio para $\nu(\text{C}=\text{C})$ e em 3309 cm^{-1} corresponde à deformação axial de grupo hidroxila $\delta(\text{O}-\text{H})$. Resultados condizentes com o trabalho de (FERNANDES, 2016).

Essa técnica também foi utilizada para verificar grupos funcionais orgânicos que se encontram em alguns metabólitos secundários presentes na PVA, tais como os flavonoides, flavonas, compostos fenólicos, terpenos, dentre outros. Os flavonoides possuem subclasses que por sua vez possuem grupos funcionais orgânicos como carbonilas, grupo OH, aromáticos e alcenos referente à flavonoides e isoflavonoides (formononetina) e chalconas presentes no extrato de PVA. Com isso, verificou-se na triplicata n° 24 (Figura 19) a presença desses grupamentos orgânicos nos espectros de FTIR.

Figura 19 – Espectro de FTIR para a triplicata n° 24.



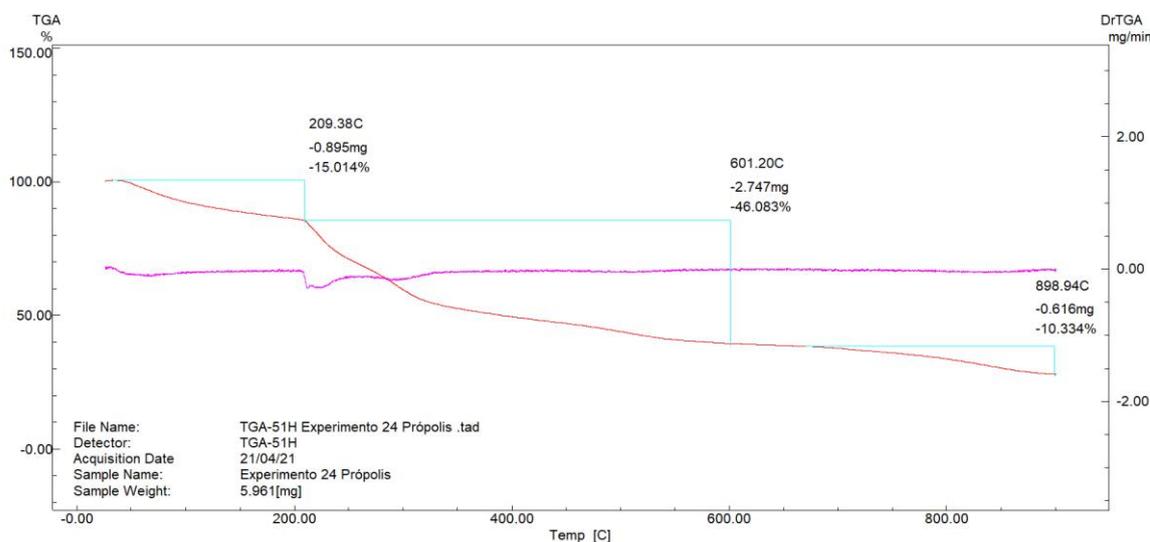
Fonte: autor, 2022.

Nesse espectro, em 1043 cm^{-1} existe um estiramento forte para $\nu(\text{C-O})$, em 1622 cm^{-1} um estiramento fraco-médio condizente com grupo $\nu(\text{C=C})$, em 2995 cm^{-1} apresenta-se uma deformação axial $\nu(\text{C-H})$, já em 3300 cm^{-1} há uma banda de deformação correspondente à presença de hidroxila na amostra, $\delta(\text{O-H})$. Por fim, o FTIR da triplicata n° 24 sugere possuir grupos funcionais típicos encontrados nos constituintes da PVA. Todos os resultados de FTIR para as bandas em estiramentos reportadas nessa dissertação estão de acordo com o trabalho de REDONDO, 2018.

5.4 Caracterização das Composições dos Microencapsulados Contendo PVA por Termogravimetria (TG)

A figura 18 apresenta degradação térmica das microcápsulas contendo PVA. Na curva de TG, verifica-se uma perda inicial de 15,014% (0,895 mg) da massa até atingir temperatura de $209,38\text{ }^{\circ}\text{C}$, evento que pode estar associado à eliminação de umidade adquirida e despolimerização das cadeias glicosídicas da PVA (ALMEIDA, 2017). A despolimerização das cadeias glicosídicas é a degradação de uma macromolécula em moléculas mais simples como, por exemplo, a liberação de monossacarídeos (BERG et al., 2004). Um segundo evento de perda de massa (46,083%), referente à variação da temperatura de 209 a $601,20\text{ }^{\circ}\text{C}$, está relacionado com a decomposição do material orgânico contido na formulação de PVA, bem como, degradação termo-oxidativa da amostra, correspondente a 2,74 mg da triplicata. Por fim, ao atingir $898,94\text{ }^{\circ}\text{C}$, observa-se uma terceira perda de massa (10,334%), correspondendo a 0,616 mg. Esta está associada à carbonização da amostra. Os somatórios destes eventos correspondem a 71,431% da perda de massa total da amostra de *beads* contendo 5% de PVA, da triplicata n° 24; onde o residual da massa usada corresponde às cinzas resultantes do processo de análise. A tabela 5 sumariza os dados físico-químicos obtidos a partir da curva de TG.

Figura 19 – Curva termogravimétrica da triplicata n° 24 contendo PVA 5%



Fonte: Autor, 2022. Análise realizada em 21/04/2021. Em vermelho: Curva termogravimétrica (TG) referente à triplicata n° 24; Em rosa: A derivação à segunda da curva termogravimétrica, gerando DTG; Em azul: Eventos de percas de massa ao longo da análise.

Tabela 6. Sumário físico-químico para a curva TG da triplicata n° 24 sob fluxo de nitrogênio a 50 mL/min.

	T_i / °C	T_f / °C	Perda de massa%
1º Evento	50	209	15,01
2º Evento	209	601	46,08
3º Evento	601	898	10,33

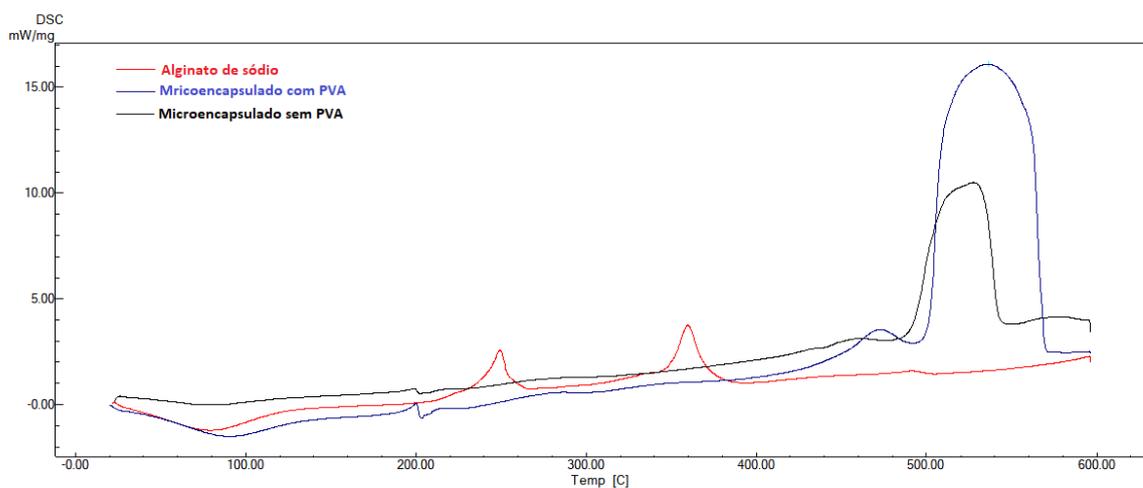
Fonte: Autor, 2022. T_i : temperatura inicial; T_f : temperatura final.

5.5 Caracterização das Composições dos Microencapsulados Contendo PVA por Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

Na figura 19 são mostradas as curvas calorimétricas obtidas por DSC para o alginato de sódio puro (vermelho), microencapsulados de PVA pertencentes à triplicata n° 24 (azul) e microencapsulados obtidos a partir de 2% de alginato de sódio e 1% de CaCl_2 , sem PVA (preto). Inicialmente, verifica-se que o alginato de sódio apresenta uma oscilação da curva em 80 °C, caracterizando um evento endotérmico, que provavelmente pode estar associado à perda de compostos voláteis e perda de água. Posteriormente, observam-se dois picos de eventos

exotérmicos, sendo estes em 220 e 330 °C, em que o primeiro deste pode estar associado à fusão do material. Já o segundo pico ter sido original a partir da degradação do próprio material ou impurezas presentes na amostra. Ainda, a feição estreita dos picos fornece a informação de que se trata de um material semicristalino. Com relação à triplicata n° 24, percebe-se um acentuado evento endotérmico inicial, em ~90 °C, que pode estar associado à perda de umidade da amostra. Em 197 °C nota-se um modesto evento exotérmico, compatível com a transição vítrea (*glass transition*) do material, referente à estrutura polimérica da formulação. Entre 250 e 300 °C observa-se um evento exotérmico sutil, sugerindo a decomposição dos constituintes da PVA. Por fim, é possível verificar a presença de um pico muito acentuado para um evento exotérmico (entre 500 e 570 °C), sugerindo que a triplicata n° 24 tem uma grande habilidade de resistir a altas temperaturas e, de certo modo, protegendo seu recheio, nesse caso a PVA. A formulação sem PVA exibiu um perfil muito similar. Entretanto, o seu pico endotérmico mais evidente foi encontrado ligeiramente deslocado para a esquerda, iniciando em 487 °C e finalizando em 535 °C. Tal fato sugere que a formulação contendo PVA é ainda mais resistente à degradação térmica. Por fim, tanto a formulação sem PVA e a triplicata n° 24 apresenta comportamento típico de um material amorfo, considerando a feição de seus picos no DSC.

Figura 20 – Curvas de DSC para os microencapsulados contendo PVA da triplicata n° 24 (2% alginato de sódio + 1% CaCl₂).



Fonte: Autor, 2022.

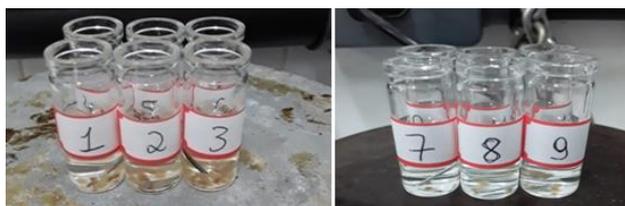
5.6 Avaliação da composição dos microencapsulados de PVA

5.6.1. Avaliação da solubilidade dos microencapsulados (*beads*) usando agentes quelantes (EDTA e Citrato de Sódio)

Agentes quelantes são moléculas responsáveis por conjugar íons metálicos por meio de ligações covalentes coordenadas para formar complexos com estruturas em anel. Os compostos formados por todos esses componentes são chamados de quelatos (FLORA e PACHAURI, 2010).

Um importante parâmetro utilizado na caracterização química é a solubilidade dos compostos orgânicos presentes nos microencapsulados de PVA. Esse teste foi utilizado para prever a presença ou ausência de grupos funcionais. O teste de solubilidade em primeira análise permite classificar um composto como ácido, básico ou neutro. São realizadas em água, solução de EDTA, citrato de sódio, hidróxido de sódio, solução de bicarbonato de sódio, ácido clorídrico diluído, éter e ácido sulfúrico concentrado (SOLOMONS, FRYHLE, 2004). Com isso, solubilizou – se os *beads* contendo PVA e sem PVA, para perceber se os mesmos liberavam seus conteúdos. Foi perceptível que após 3 horas, de agitação dos tubos que continha os *beads* de PVA, foi possível perceber o início da solubilização dos *beads* (Figura 21), acompanhado de um suave turvamento da solução, indicando que o conteúdo dos *beads* estava sendo liberados para a solução. Entretanto, a cada 60 minutos os tubos foram verificados para avaliar a solubilidade das formulações/triplicatas. Após um período de 24 horas sob agitação, os tubos contendo as formulações apresentavam-se completamente solúveis. A figura 21 mostra como ficaram os *beads* após solubilização. Foi possível observar uma mudança na coloração da solução dentro dos tubos que continham PVA, pois demonstra que o EDTA e o citrato de sódio juntos foram capazes de dissolverem os *beads*. O tubo 1, que continha apenas EDTA, possuía pH de 5,1. O tubo 2, que continha apenas o citrato de sódio, apresentou pH de 5,5; enquanto o tubo 3, contendo citrato de sódio e EDTA, exibiu pH igual a 4,0.

Figura 21 – Aspecto do estudo de solubilidade das triplicatas dos beads do início de PVA.



Tempo Zero

Fonte: Autor, 2022.

Figura 22 – Aspectos dos tubos contendo os beads de PVA após solubilização com EDTA e citrato de sódio (24 horas).



Fonte: Autor, 2022.

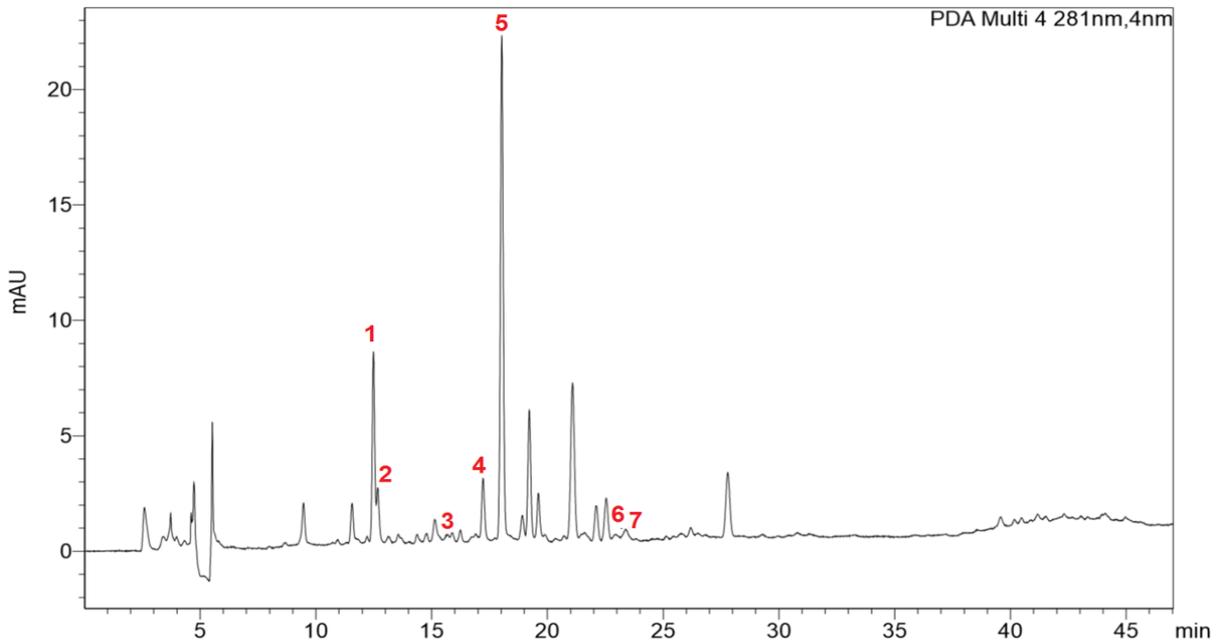
5.7 Detecção dos Constituintes dos Microencapsulados Contendo PVA por Cromatografia Líquida de Alta-Eficiência (HPLC) com Detector de Arranjo Diodo (DAD)

5.7.1 Determinação dos marcadores de PVA usando HPLC-DAD

Inicialmente, as amostras foram extraídas com uma mistura de acetato de etila e água (1:2), onde as fases orgânicas coletadas foram juntas e evaporadas, para concentrar o conteúdo dos mesmos. Uma pequena fração foi coletada, diluída em metanol grau HPLC e analisada.

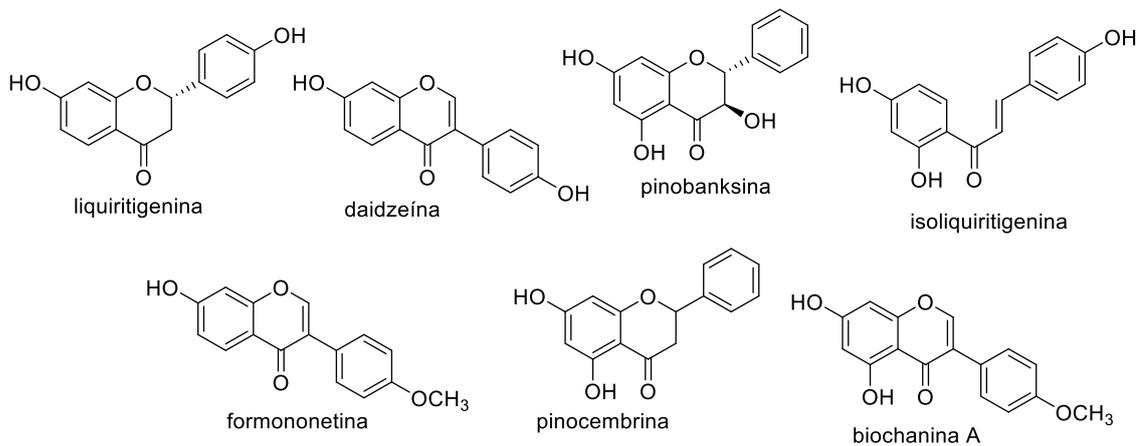
Para se obter um padrão de comparação para a triplicata n° 24, uma corrida com o extrato bruto comercial Beeva[®], usando uma concentração de 500 µg/mL, foi realizado por HPLC-DAD. Dessa forma, a partir da análise do cromatograma obtido (Figura 22), sete metabólitos típicos da PVA foram identificados pelo tempo de retenção comparando os padrões analíticos e o extrato e microencapsulados, sendo eles uma flavanona: liquiritigenina (1), um flavonol: pinobanksina (3), uma chalcona: isoliquiritigenina (4), um flavonoide: pinocembrina (6), e três isoflavonas: daidzeína (2), formononetina (5) e biochanina A (7). As estruturas químicas destes estão mostradas na figura 23.

Figura 23 – Perfil cromatográfico para a amostra de extrato bruto comercial da marca Beeva.



Fonte: Autor, 2022. Cromatograma obtido usando-se concentração de 500 µg/mL; fluxo de 0,3 mL/min; pressão inicial de 50 kgf/cm²; gradiente de solventes (Acetonitrila/água). 1: Liquiritigenina; 2: Daidzeína; 3: Pinobanksina; 4: Isoliquiritigenina; 5: Formononetina; 6: Pinoembrina; 7: Biochanina A.

Figura 24 – Estruturas químicas para os compostos identificados na PVA bruta comercial da marca Beeva[®].



Fonte: Autor, 2022.

Posteriormente, foi possível quantificar a concentração desses metabólitos na amostra comercial do extrato bruto de PVA (Tabela 6), utilizando a curva de calibração do LAFA, publicada em NASCIMENTO *et al.* (2016). Assim, verifica-se que a liquiritigenina e

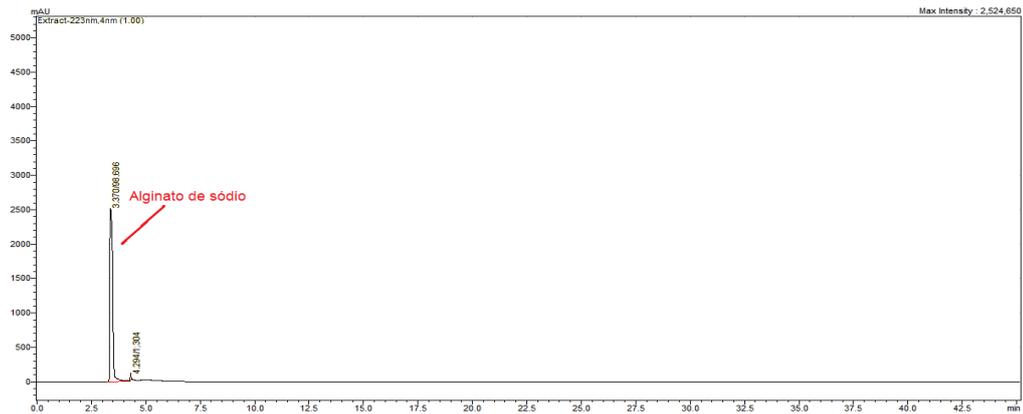
formononetina são os componentes mais abundantes na amostra, apresentando ~5 µg/mL de cada. Já os compostos daidzeína e isoliquiritigenina podem ser considerados como presentes em quantidades moderadas, entre 2 e 3 µg/mL. Já as substâncias pinobanksina, pinocembrina e biochanina A são encontradas em menores quantidades, com valores menores que 0,7 µg/mL. Abaixo, tabela 7 mostra a quantificação dos compostos realizados pela curva de calibração de acordo com NASCIMENTO *et al.*, 2016.

Tabela 7. Dados de HPLC-DAD obtidos a partir da curva de calibração* para amostra de PVA bruta comercial da marca Beeva®

Metabólitos	Tempo de retenção (RT/min)	Área dos picos	Concentração (µg/mL)	Comprimento de onda (λ em nm)
Liquiritigenina	12,48	70315	5,88	275
Daidzeína	12,67	33918	2,35	249
Pinobanksina	15, 89	3294	0,71	291
Isoliquiritigenina	17,20	68937	3,39	366
Formononetina	18,04	113277	5,29	249
Pinocembrina	22,93	3065	0,21	291
Biochanina A	23,37	11626	0,38	260

* Curva de calibração utilizada foi desenvolvida por NASCIMENTO, 2016.

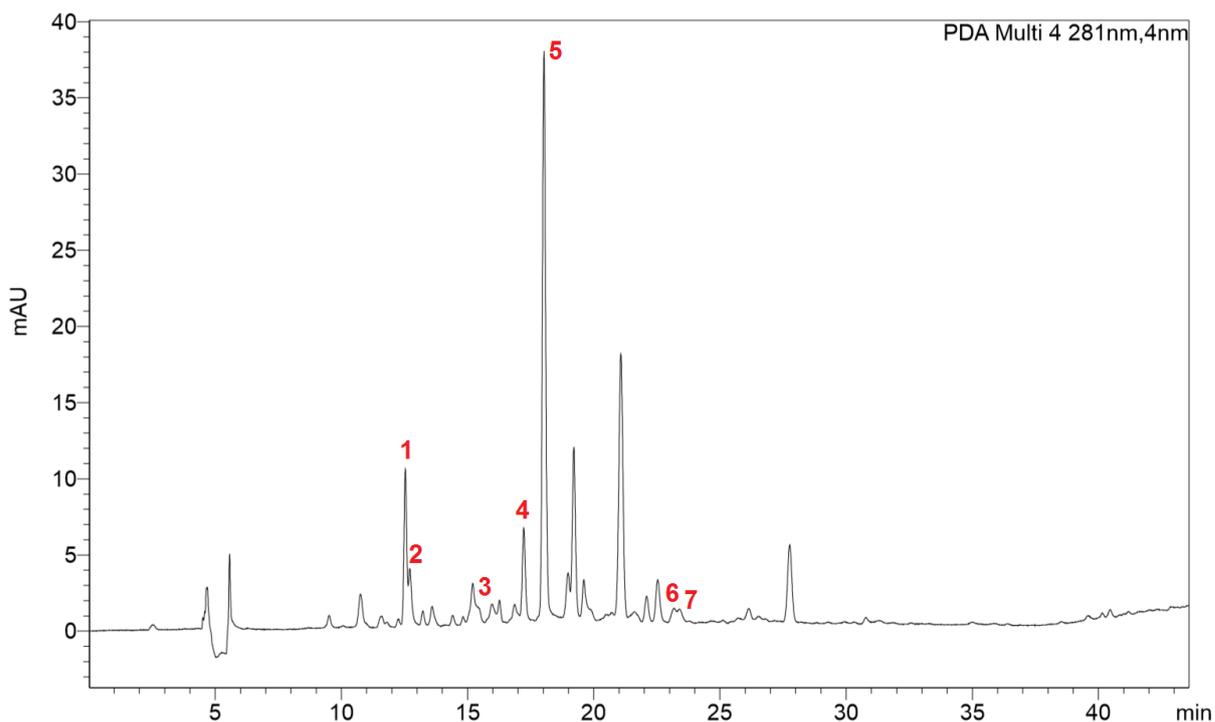
Antes de analisar o perfil cromatográfico da triplicata nº 24, fizeram-se necessário verificar a feição do pico e tempo de retenção do alginato de sódio, uma vez que este é o agente encapsulante presente nos *beads*. Dessa forma, o alginato de sódio puro (1 mg/mL) foi analisado inicialmente, em que seu tempo de retenção foi detectado em 3,36 min, com pureza de 96,6%, em comprimento de onda (λ) ideal de 213 nm (Figura 24). Esta etapa foi realizada para verificar se havia quantidades de alginato ainda na triplicata nº 24 por solubilização e extração líquido-líquido.

Figura 25 – Perfil cromatográfico do alginato de sódio.

Fonte: Autor, 2022.

Em seguida, a triplicata nº 24 foi analisada por HPLC-DAD, sendo uma amostra de 1 mg/mL (massa obtida a partir da extração de todos os *beads* (300 mg) de uma única replicata). Assim, do mesmo modo que no extrato bruto comercial Beeva[®], os mesmos sete metabólitos secundários foram detectados (Figura 25) e quantificados (Tabela 7), confirmando que a PVA foi encapsulada pela metodologia aplicada nessa dissertação. Por fim, o pico do alginato não foi detectado, indicando que o processo de extração da PVA a partir dos *beads* foi efetivo. Além disso, acredita-se que a combinação dos agentes quelantes tenha sido efetiva para destruir toda a rede do biopolímero e fazendo com esta liberasse o conteúdo do *bead*, nesse caso, a PVA.

Figura 26 – Perfil cromatográfico para os *beads* da triplicata n° 24.



Fonte: Autor, 2022. Cromatograma obtido usando-se concentração de 1 mg/mL; fluxo de 0,3 mL/min; pressão inicial de 50 kgf/cm²; gradiente de solventes (Acetonitrila/água). 1: Liquiritigenina; 2: Daidzeína; 3: Pinobanksina; 4: Isoliquiritigenina; 5: Formononetina; 6: Pinocebrina; 7: Biochanina A.

Tabela 8. Dados de HPLC-DAD obtidos a partir da curva de calibração para a triplicata n° 24.

Metabólitos	Tempo de retenção (RT/min)	Área dos picos	Concentração (µg/mL)	Comprimento de onda (λ em nm)
Liquiritigenina	12,53	90548	7,57	275
Daidzeína	12,71	76836	5,30	249
Pinobanksina	15,97	22388	0,53	289
Isoliquiritigenina	17,23	146313	7,18	366
Formononetina	18,06	209550	9,76	249
Pinocebrina	23,17	16191	0,90	291
Biochanina A	23,40	21943	0,63	260

Fonte: Autor, 2022.

Considerando os dados da tabela 7 acima, verifica-se que a liquiritigenina, isoliquiritigenina e formononetina são os componentes mais abundantes na amostra,

apresentando 7,57; 7,18 e 9,76 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Diferenciando-se da amostra da comercial bruta de PVA da marca Beeva[®]. De algum modo, provavelmente a formulação teve uma melhor capacidade encapsulante da isoliquiritigenina, que foi tida como em quantidade moderada no extrato bruto. Já a daidzeína pode ser considerada como presente em quantidade moderada, apresentando 5,3 $\mu\text{g/mL}$. Já as substâncias pinobanksina, pinocembrina e biochanina A são encontradas em menores quantidades, com valores menores que 0,9 $\mu\text{g/mL}$, similar ao que foi observado para o extrato bruto comercial de PVA da marca Beeva[®].

As proporções mostradas na tabela que traz os compostos do extrato são diferentes da que traz o produto em termo da concentração. Comparando a concentração do composto liquiritigenina obtida através do extrato bruto de PVA que foi em tono de 5,88 $\mu\text{g/mL}$ e o mesmo composto na triplicata n° 24 que ficou em torno de 7, 57 $\mu\text{g/mL}$, se percebe que houve diferença nas concentrações dos compostos, pois a concentração utilizada para detecção dos compostos no produto próxima a do extrato.

Em termo de aplicabilidade dos beads formados, vários estudos comprovam a utilização do extrato de PVA presente nos beads para a cicatrização de feridas. De acordo os autores SILVA et al. 2017; ORYAN et al., 2018; MEDEIROS et al. 2019; STANICZEK et al., 2021, as propriedades do extrato de própolis presentes nos microencapsulados de PVA para a cicatrização de feridas vêm sendo muito estudadas aos longos dos anos. Segundo BATISTA et al., 2015, a utilização do extrato de própolis no tratamento de feridas diminui o tempo de cicatrização, acelera o processo de contração e de reparação tecidual.

Em seus estudos PUSPASARI e colaboradores (2018) descreveu aplicação tópica do extrato de PVA em gel presente nos microencapsulados aumenta a expressão de FGF-2 e fibroblastos no processo de cicatrização de úlcera traumática em *Ratus norvegicus* diabético.

Em suas pesquisa, PEREIRA, et al., 2022 realizaram estudos clínicos e experimentais e mostraram a eficácia da própolis vermelha no tratamento de lesões como agentes cicatrizante, antimicrobiano e anti-inflamatório. Por fim, SUSAN, et al., 2021 demonstram que a aplicação do extrato de própolis proporcionou uma melhora notável em termos de cicatrização de feridas dentro de uma semana após a cirurgia.

Contudo, como foi discutido acima aplicabilidade de extrato de PVA quando microencapsulado pode trazer efeitos terapêuticos benéficos para a cicatrização de feridas dentre outros.

6 CONCLUSÃO

De modo geral, o método de extrusão usando aerógrafo não foi capaz de gerar microencapsulados, apenas biofilmes de própolis. Dessa forma, o método foi substituído pela gelificação iônica por gotejamento, o que permitiu 24 triplicatas, em que algumas apresentaram a formação de microesferas. As formulações contendo PVA e alginato de sódio obtidas após a lavagem demonstraram ter características esféricas e coloração amarela intenso. Já as formulações sem PVA não apresentaram coloração e também se mantiveram com característica esférica. Após o processo de secagem, algumas formulações contendo PVA não mantiveram a forma esférica, o contrário foi observado para as formulações em PVA. Nesse sentido, as fotomicrografias de microscopia eletrônica de varredura (SEM) das 24 triplicatas revelaram a triplicata nº 24 apresentou morfologia mais definida e compatível com microesfera. Ainda, a espectrofotometria de infravermelho por transformada de Fourier com reflectância total atenuada (FTIR-ATR) demonstram que a triplicata nº 24 possui grupos funcionais típicos encontrados nos constituintes da PVA. Quanto às análises térmicas, a termogravimetria (TG) revelou que o material de parede desacelera a degradação termo-oxidativa da PVA, protegendo a o conteúdo da microesfera. Já as curvas de calorimetria exploratória diferencial (DSC) demonstrou eventos termoquímicos, como a transição vítrea (*glass transition*) do material e feições de material cristalino (para a microesfera de alginato sem PVA) e material amorfo (para a triplicata nº 24). Os microencapsulados demonstraram serem solúveis em meio aquoso contendo 2% de citrato de sódio e EDTA (p/v). Após um período de 24 horas sob agitação, os tubos contendo as formulações apresentavam-se completamente solúveis. Os resultados das análises de detecção e quantificação dos marcadores de PVA por HPLC-DAD demonstram que os metabólitos liquiritigenina, pinobanksina, isoliquiritigenina, pinocembrina, daidzeína, formononetina e biochanina A, encontrados no extrato bruto comercial Beeva[®], também foram detectados e quantificados na triplicata nº 24 contendo PVA, confirmando que a PVA foi encapsulada pela metodologia aplicada para obtenção dos *beads*. Por fim, o pico do alginato não foi detectado, indicando que o processo de extração da PVA a partir dos *beads* foi efetivo. Contudo, espera-se que essa dissertação seja capaz de contribuir com outros estudos que visam desenvolver pesquisa de formulações de *beads* contendo PVA.

REFERÊNCIAS

ABREU, C. T. A.; JUNIOR, I. D. B. **Desenvolvimento de Biofilme Comestível enriquecido com própolis vermelha aplicado no revestimento de acerola (*Malpighia/ emarginata*)**. Maceió, 2019. 101 f. Dissertação (Mestrado em Nutrição) – Universidade Federal de Alagoas Faculdade de Nutrição. Programa de Pós–Graduação em Nutrição.

AGUIAR, G. R. **Estudo químico e avaliação biológica da própolis vermelha de Alagoas / Gisele Rocha Aguiar**. – 2015. 104 f.: il color. Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Departamento de Química Orgânica e Inorgânica, Programa de Pós – Graduação em Química, Fortaleza, 2015.

ALENCAR S M, OLDONI TLC, CASTRO M L, CABRAL I R S, COSTA – NETO C M, CURY J A, ROSOLEN P L, IKEGAKI M. Chemical composition and biological activity of a new type of brazilian propolis: Red propolis. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 113, p. 278 – 283, 2007.

ALMEIDA, P. C. **Obtenção e caracterização de microencapsulados de caseinatos carregados com extrato de própolis vermelha**. 2017. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal de Alagoas. Escola de Enfermagem e Farmácia. Maceió, 2017.

ANDRADE, J. K. S. et AL. Development and characterization of microencapsulates containing spray dried powder obtained from Brazilian brown, green and red propolis. **Food Research International**, v. 109, p. 278-287, 1 jul, 2018.

ANSON, R. Microencapsulation: For enhanced textile performance. **Performance ApparelMarkets**, v. 12, p. 21 – 39, 2005.

ARRUDA, R. E. S. **Efeito da sazonalidade na composição química e atividades antimicrobiana, antioxidante e tripanossomicida de extratos brutos de própolis vermelha de Alagoas**. 2019. 94f. Dissertação (Mestre em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal de Alagoas, 2019.

AZEREDO, H. M. C. Encapsulação: aplicação à tecnologia de alimentos. **Alimentos e Nutrição**, v. 16, p. 89-97, 2005.

BAKRY, A. M.; ABBAS, S.; ALI, B.; MAJEED, H.; ABOUELWAFI, M. Y.; MOUSA, A.; LIANG, L. Microencapsulation of oils: a comprehensive review of benefits, techniques, and applications. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 15, n. 1, p. 143-182, 2015.

BANKOVA V. Recent trends and important developments in propolis. **Research Evidence-Based on Complementary Alternative Medicine**, 2(1):29-32, 2005.

BATISTA, E. K. F., BATISTA, M. D. C. D. S., SOBRINHO, J., TRINDADE, H. I. D., SILVA, L. L. B., & MULLER, J. B. (2015). Influência da própolis sobre os perfis leucocitário e proteico de camundongos e tempo de fechamento de feridas excisionais limpas e infectadas por *Staphylococcus aureus*. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, 17, 413-419.

BERG, J. M.; TYMOCZKO, J. L.; STRYER, L. Bioquímica. 5 ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2004.

BITTANTE, A. M. Q. B. et al. Aplicação de compostos antimicrobianos naturais em biofilmes para embalagens de alimentos. **Higiene Alimentar**, v. 26, n. 214, p. 102 – 109, 2012.

BLANDINO, A.; MACIAS, M.; CANTERO, D. Formation of calcium alginate gel capsules: influence of sodium alginate and CaCl₂ concentration on gelation kinetics. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v.88, n.6, p.686-689, 1999.

BRASILEIRO, L. S. J. **Microencapsulação de compostos bioativos: inovação em diferentes áreas**. 2011.71f. (Dissertação de Mestrado) – Universidade Fernando Pessoa. Faculdade de Ciências da Saúde. Porto.

BUENO-SILVA B et al. Anti-Inflammatory and antimicrobial evaluation of neovestitol and vestitol isolated from brazilian red propolis. **J. Agric. Food Chem.** v.61, n.19, p. 4546-4550, 2013.

BUREY, P., BHANDARI, B. R, HOWES, T., GIDLEY, M. J. Hydrocolloid Gel Particles: Formation, Characterization, and Application. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 48, p. 361-377, 2008.

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

CAMARGO, R. A. **A tribo Dalbergieae (Leguminosae – Faboideai) no estado de Santa Catarina, Brasil**. Departamento de Botânica: UFRGS, 2005.

CASTALDO, S.; CAPASSO, F. Propolis, na oldremedused in modern medicine. **Fitoterapia**. v. 73, n. 1, p. 51 – 56, nov. 2002.

CASTRO, M. L.; CURY, J. A.; ROSALEN, P. L.; Própolis do sudeste e do nordeste do Brasil: influência da sazonalidade na atividade antibacteriana e composição fenólica. **Química Nova**. São Paulo, v.30, n 7, p.1512–1516, ago. 2007.

CARVALHO-ZILSE G.A. & NUNES-SILVA C.G. **Threats to the Stingless Bees in the brazilian Amazon: How to deal with scarce biological data and an increasing rate of destruction**. In: Florio R.M. (Ed.), Bees: Biology, Threats and Colonies. Nova Science Publishers, New York. p. 147–168, 2012.

COSTA, S. S. **Filme de fécula de mandioca e glicerol, reforçados com nanocelulose e ativados com própolis vermelha**. 2013. 126 f. Dissertação (Mestrado em Ciências de Alimentos) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2013.

COSTA, A. S. et al. Levantamento dos estudos com a própolis produzida no estado da Bahia. **Sitientibus série Ciências Biológicas**, v. 13, 2009.

CORONA-HERNANDEZ, R. I., PARRILLA, E. A., LIZARDIMENDOZA, J., ISLAS-RUBIO, A. R., ROSA, L. A., WALL-MEDRANO, Structural Stability and Viability of Microencapsulated Probiotic Bacteria: A Review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v.12, p. 614-628. 2013.

CHANDRAMOULI, V. et al. An improved method microencapsulation and its evaluation to protect Lactobacillus spp. in simulated gastric conditions. **Journal of Microbiological Methods**, v. 56, p. 27– 35, 2004.

CHAN, L.W.; LEE, H.Y.; HENG, P.W.S. Mechanisms of external and internal gelation and their impact on the functions of alginate as a coat and delivery system. **Carbohydrate Polymers**, v.63, p.176–187, 2006.

CHEW, S., C. In-vitro evaluation of kenaf seed oil in chitosan coated-high methoxyl pectin alginate microcapsules. **Industrial Crops and Products**, v.76, p. 230–236, 2015.

DAUGSCH, A.; MORAES, C. S.; FORT, P.; PARK, Y. K. Brazilian Red Propolis-Chemical Composition and Botanical Origin. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, Oxford, v. 5, n. 4, p. 435-441, 2007.

DEPYPERE, F. Food powder microencapsulation: principles, problems and opportunities. **Applied Biotechnology Food Science and Policy**, v.1, n. 2, p.75-94, 2003.

DING, W. K.; SHAH, N. P. Acid, Bile, and Heat Tolerance of Free and Microencapsulated Probiotic Bacteria. **Journal of Food Science**, v. 72, n. 9, 2007.

DOUMÈCHE, B. et al. New approaches to the visualization, quantification and explanation of acid-induced water loss from Ca-alginate hydrogel beads. **Journal of Microencapsulation**, v. 21, n. 5, p. 565–573, 2004.

ESTEVINHO, B. N.; ROCHA, F.; SANTOS, L.; ALVES, A. Microencapsulation with chitosan by spray drying for industry applications: a review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 31, n. 2, p. 138-155, 2013.

E. TORLAK *et al* Eficácia antibacteriana de filmes de polipropileno revestidos com quitosona e própolis contra patógenos de origem alimentar. **Journal internacional de Macromoléculas Biológicas**, (2013).

ETCHEPARE, A. M., MENEZES, C. S. F. M., RODRIGUES, Z. L., CODEVILLA, F. C., MENEZES, R. C. **Microencapsulação de compostos bioativos pelo método de extrusão**. Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil. Ciência e Natura. Ed. Especial-Nano e Microencapsulação de compostos bioativos e probióticos em alimentos, v. 37, p. 97– 105, 2015.

ETCHEPARE, M. A., RADDATZ, C. G., FLORES, E. M. M., ZEPKA, L. Q., JACOB-LOPES, E., BARIN, J. S., GROSSO, C. R. F., MENEZES, C. R. Effect of resistant starch and chitosan on survival of *Lactobacillus acidophilus* microencapsulated with sodium alginate. **LWT -Food Science and Technology**, v. 65, p. 511-517, 2016.

FARIAS, N. S. **BIOFILMES ATIVOS DE ALGINATO DE SÓDIO COM EXTRATO DE ERVA-MATE (*Ilex paraguariensis* St. Hil.): Avaliação das propriedades físico-químicas e cinética de liberação de compostos fenólicos**. 2018. 96f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós – Graduação em Ciências dos Alimentos, Florianópolis, 2018.

FAVARO-TRINDADE, C. S.; PINHO, S. C.; ROCHA, G. A. Revisão: microencapsulação de ingredientes alimentícios. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 11, p. 103-112, 2008.

FRANÇA, A. Z. **Própolis vermelha como melhorador do desempenho de codornas japonesas macho**. 2021. 62p. Dissertação (Mestrado) – Universidade do Estado de Santa

Catarina, Centro de Educação de Ensino Superior do Oeste, Programa de Pós – Graduação em Zootecnia , Chapecó, 2021.

FERNÁNDEZ, N. M. et al. Estado actual del uso de recubrimientos comestibles em frutas y hortalizas. **Revista Biotecnología en el sector Agropecuario y agroindustrial**, v.15, n. 2, p. 134 – 141, 2017.

FERRO, D. Fitoterapia: Conceitos clínicos. São Paulo, SP. (Ed) **Atheneu**, Cap 19, p 319-322, 2006.

FLORA, S. J. S. e PACHAURI, V. (2010). Chelation in Metal Intoxication. *International Journal of Environmental Research Public Health*, 7, pp. 2745-2788.

FROZZA, C. O. S., *et al.* Chemical characterization, antioxidant and cytotoxic activities of Brazilian red propolis. **Food and Chemical Toxicology**, v. 52, p. 137-142, 2013.

FROZZA, C. O. S. **Caracterização química e avaliação da atividade biológica da própolis vermelhas em células tumorais e não tumorais**. 2013. 98 f. ;il ; 30 cm. Dissertação (Mestrado) – Universidade de Caxias do Sul, Programa de Pós – Graduação do Mestrado de Biotecnologia, 2013.

FUNAMI, T.; FANG, Y.; NODA, S.; ISHIHARA, S.; NAKAUMA, M. Rheological properties of sodium alginate in an aqueous system during gelation in relation to supermolecular structures and Ca⁺² binding. **Food Hydrocolloids**, v. 23, n.7, p. 1746 – 1756, 2009.

FUNARI, C. S.; FERRO, V, O. Análise de Própolis. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 1, p. 171-178, 2006.

GIBBS, S. Encapsulation in the food industry: a review. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v. 50, n. 3, p. 213-224, 1999.

GOMBOTZ, W.R.; WEE, S.F. Protein release from alginate matrices. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.31, p.267–285, 1998.

GUEVARA, N. A.; JIMÉNEZ, M. T. Materiles utilizados en la encapsulation. **Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos**, v. 2, p. 22-27, 2008.

HAJINEZHAD, S., RAZAVIZADEH, B. M., NIAZMAND, R., & GHASEMI, I. Antimicrobial, mechanical, and physicochemical properties of ethylene vinyl alcohol (EVOH) extruded films blended with propolis. **International Journal of Food Properties**, v.23, n.1, p. 2020-2032, 2020.

HAVSTEEN, B. H. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 96, p. 67-202, 2002.

HAYACIBARA, M. F.; KOO, H.; ROSALEN, P. L.; DUARTE, S.; FRANCO, E. M.; BROWEN, W. H.; IKEGAKI, M.; CURY, J. A. In vitro and in vivo effects of isolated fractions of Brazilian propolis on caries development. **Journal of ethnopharmacology**, v. 101, n. (1–3), p.110–115, 2005.

JACKSON, L. S.; LEE, K. Microencapsulation and Food Industry. **LWT – Food Science and Technology**, v.24, n. 4, p. 289-297, 1991.

JAIN, N. K. Controlled and novel drug delivery. Delhi, CBS Publishers & Distributors, 2004.

KRASAEKOOPT, W.; BHANDARI, B.; DEETH, H. Review: Evaluation of encapsulation techniques of probiotics for yoghurt. **International Dairy Journal**, v.13, p. 3-13, 2003.

KING, A. H. Evaluation of the mechanism associated with the release of encapsulated flavor materials. **Encapsulation and controlled release of food ingredients**, p.1-160, 1995.

KRASAEKOOPT, W., BHANDARI, B., DEETH, H. Review: Evaluation of encapsulation techniques of probiotics for yoghurt. **International Dairy Journal**, v.13, p. 3-13, 2000.

KRASAEKOOPT, W., BHANDARI, B. DEETH, H. The influence of coating materials on some properties of alginate beads and survivability of microencapsulated probiotic bacteria. **International Dairy Journal**, v.14, p.737-743, 2003.

LEE, S., CHA, D. S., PARK, H. J. Survival of Freeze-Dried *Lactobacillus bulgaricus* KFRI 673 in Chitosan-Coated Calcium Alginate Microparticles. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 24, p. 7300-7305, 2004.

LI, Y. X. et al. Phlorotannins as bioactive agents from brown algae. **Process Biochemistry**, v. 46, p. 2219-2224, 2010.

LOPES, B. G. C. et al. Phytochemical markers of different types of red propolis. **Food Chemistry**, v. 146, p. 174–180, 1 mar. 2014.

LUSTOSA, S. et al. Própolis: atualizações sobre a química e a farmacologia. **Revista brasileira de Farmacognosia**, João Pessoa, v. 18, n. 3, p. 447 – 454, Setembro, 2008.

MACHADO, B. A. S. et al. Estudo prospectivo da própolis e tecnologias correlatas sob o enfoque em documentos de patentes depositados no Brasil. **Revista GEINTEC**, v. 2, n. 3, p.221-235, 2015.

MACHADO, B. A. S. *et al.* Chemical Composition and Biological Activity of Extracts Obtained by Supercritical Extraction and Ethanolic Extraction of Brown, Green and Red Propolis Derived from Different Geographic Regions in Brazil. **Public Library of Science**, v.11, n.1, p.1-26, 2016.

MARCUCCI, M.C. Propriedades biológicas e terapêuticas dos constituintes químicos da propolis. **Química Nova**, v.19, n.5, p. 529-536, 1996.

MATTÉ, G. M.; ROSA, S. A tecnologia da microencapsulação através das microesferas de quitosana. **Revista Iberoamericana de Polímeros**, v. 14, p. 206-218, 2013.

MEDEIROS, H. H., FACHINI, V., PUPIN, M. A. F., DANEZE, E. R., & de PAULA, C. J. S. . Uso de solução de extrato de própolis como antimicrobiano e cicatrizante em feridas cutâneas causadas por acidente automobilístico em cão. *Archives of Veterinary Science*, 24(2), 2019.

MENDONÇA, L. S. **Aspectos ambientais, químicos e biológicos relacionados à própolis vermelha**. 2011. Dissertação (Mestrado em Saúde e Ambiente), Universidade Tiradentes, Aracajú, 2011.

MENEZES, C. R.; BARIN, J. S.; CHICOSKI, A. J.; ZEPKA, L. Q.; JACOB-LOPES, E.; FRIES, L. L. M.; TERRA, N. N. Microencapsulação de probióticos: avanços e perspectivas. **Ciência Rural**, v. 43, n. 7, p. 1309-1316, 2005.

MORTAZAVIAN, A. M., SOHRABVANDI, S. Probiotics and Food Probiotic Products. **Eta Publication**, p.131-169, 2007.

NASCIMENTO, et al. Polymeric Nanoparticles of Brazilian Red Propolis Extract: Preparation, Characterization, Antioxidant and Leishmanicidal Activity. **Nanoscale Research Letters**, v. 11, p.301, 2016.

NAZZARO, F.; ORLANDO, P.; FRATIANNI, F.; COPPOLA, R. Microencapsulation in food science and biotechnology. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 23, n. 2, p. 182-186, 2012.

NAZARENO, L.; MONTA, C.; OLIVEIRA, J.; GOESH, C.; LOURDES, I. C.; OLIVERA, M. Encapsulating betalains from *Opuntia ficus-indica* fruits by ionic gelation: Pigment chemical stability during storage of beads. **Food Chemistry**, [s.l.], v. 202, p. 373-382, 2016.

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

NUNES, L. C. C. Variabilidade sazonal dos constituintes da própolis vermelha e bioatividade em *Artemia salina*. **Revista Brasileira de Farmagnosia**, Curitiba, v.19, n. 2, p. 524–529. Jun. 2009.

NUNES, G. L.; SILVA, T. M.; HOLKEM, A. T.; SCHLEY, V.; MENEZES, C. R. Microencapsulação de culturas probióticas: princípios do método de spray drying. **Ciência e Natura**, v. 37, p. 132-141, 2015.

OLDONI, T. L. C. et al. Isolation and analysis of bioactive isoflavonoids and chalcone from a new type of Brazilian propolis. **Separation and Purification Technology**, v. 77, n. 2, p. 208-213, 2011.

OLIVEIRA, T. A. et al. Efeito do revestimento de tomate com biofilme na aparência e perda de massa durante o armazenamento. **Revistaverde**, v.6, n. 1, p. 230 – 234, 2011.

ORYAN, A.; ALEMZADEH, E.; MOSHIRI, A. Potential role of propolis in wound healing: Biological properties and therapeutic activities. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 98, p. 468-483, 2018.

PARK, Y. K.; IKEGAKIN, M.; ABREU, J. A. S.; ALCICI, M. N. F.; **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.18, p.313. 1988.

PARK, Y. K. et al. Classification of Brazilian propolis by both physicochemical methods and biological activity. **MensagemDoce**, v. 58, n. 1, p. 2-7, 2000.

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

PASIN, B. L.; AZÓN, C. G.; GARRIGA, A. M. Microencapsulación con alginato en alimentos: técnicas y aplicaciones. **Revista Venezolana de Ciencia y Tecnología de Alimentos**, v. 3, p. 130-151, 2012.

PASQUALIM, P. T. A. et al. Microcápsulas de alginato de cálcio e óleo vegetal pela técnica de gelificação iônica: um estudo da capacidade de encapsulamento e aplicação dermatológica. **Visão Acadêmica**, Curitiba, v. 11, n. 1, p. 1518-5192, 2010.

PEDROSO, D. D. L., THOMAZINI, M., HEINEMANN, R. J. B., FAVAROTRINDADE, C. S. Protection of Bifido bacterium lactis and Lactobacillus acidophilus by microencapsulation using spray chilling. **International Dairy Journal**, v. 26, n. 2, p. 127– 132. 2012.

PEREIRA, A. S.; SEIXAS, F. R. M. S.; AQUINO NETO, F. R.; Própolis: 100 anos de pesquisa e suas perspectivas futuras. **Química Nova**, v. 25, n.2, p. 321 – 326, 2002.

PEREIRA, C. A. T et al. **Efeito do extrato de própolis sobre o processo de cicatrização da pele: uma revisão da literatura**. Research, Society and Development, v. 11, n. 5, e44911528284, 2022.

PREVOST, H.; DIVIES, C. Cream fermentation by mixed culture of lactococci entrapped in two-layer calcium alginate gel beads. **Biotechnology Letters**, v. 14, n. 7, p. 583–588, 1992.

PICCINELLI, A. L. *et al.* Cuban and Brazilian red propolis: botanical origin and comparative analysis by high-performance liquid chromatography-photodiode array detection/electrospray ionization tandem mass spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.59, n.12, p.6484-6491, 2011.

PINTO, L. M. A. Do PRADO, N. R. T. De CARVALHO, L. B. Propriedades, Usos E Aplicações Da Própolis. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. VIII, n. 3, p.76 - 100, 2011.

PIPPI, B.; LANA, A. J. D.; MORAES, R. C.; GUEZ, R. C.; MACHADO, M.; OLIVEIRA, L. F. S.; POSER, G. L. V.; FUENTEFRÍA, A. M. In vitro evaluation of the acquisition of resistance, antifungal activity and synergism of Brazilian red propolis with antifungal drugs on *Candida* ssp. **Journal of Applied Microbiology**, v. 118, p.839–850, 2015.

PONTES, M. L. C.; DINIZ, M. F. F. M. **Própolis vermelha oriunda de *Dalbergia ecastophyllum* Ltaub (Paraíba, Brasil) : Avaliação da Toxicidade in vitro e in vivo e da atividade sobre bactérias de importância odontológica**. João Pessoa, 2018. 115 f.; il. Tese (Doutorado)–UFPB/CCS.

PRISCO, A., MARESCA, D., ONGENG, D., MAURIELLO, G. Microencapsulation by vibrating technology of the probiotics strain *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 to enhanced survival in food sand in gastrointestinal environment. **LWT - Food Science and Technology**, v. 61, p. 452-462. 2015.

PSZCZOLA, D. (1998). Encapsulated ingredients: providing the rightfit. **Food Technology**, v. 52, n. 12, p.70-77, 1998.

PUSPASARI, A., HARIJANTI, K., SOEBADI, B., HENDARTI, H. T., RADITHIA, D., & ERNAWATI, D. S. Effects of topical application of propolis extract on fibroblast growth factor-2 and fibroblast expression in the traumatic ulcers of diabetic *Rattus norvegicus*. *Journal of oral and maxillofacial pathology: JOMFP*, 22(1), 54, 2018.

RACOVITĂ, S. et al. Polysaccharides based on micro- and nanoparticles obtained by ionic gelation and their applications as drug delivery systems. **Revue Roumaine de Chimie**, v. 54, p.709–718, 2009.

RAFFIN, R. P. et al. Sodium pantoprazole – loaded enteric microparticles prepared by spray drying: effect of the scale of production and process validation. **International Journal of Pharmaceutics**. V. 324, n. 1, p. 10–18, out. 2006.

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.

REDONDO, G. P.; JUNIOR, B. D. I. **Desenvolvimento, caracterização e estudo de dissolução de microencapsulados poliméricos de liberação controlada de extrato de própolis vermelha obtidos através da técnica de secagem *Splay Drying***. 2018. 65 f.: Il. col., grfas

REINECCIUS, G. A. (1991). Carbohydrates for flavorencapsulation. **Food Technology**, v. 51, n. 3, p. 144-146, 149, 1991.

RIBEIRO, M. C. E., CHAVES, K. S., GEBARA, C., INAFATE, F. N. S., GROSSO, C. R.F., GIGANTE, M. L. Effect of microencapsulation of *Lactobacillus acidophilus* LA-5 on physicochemical, sensory and microbiological characteristics. **Food Research International**, v. 66, p. 424–431. 2014.

ROCHA, L. C. R.; BOTREL, D. A. **Desenvolvimento de micropartículas contendo suco de tomate via gelificação iônica**. Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Lavras, 2017. 87 p. : il.

RODRIGUES, M. S. A. **Biofilme a base do extrato de própolis vermelha e seu efeito na conservação pós – colheita de tomate tipo italiano**. 2015. 82f. Dissertação (Mestrado em Sistemas Agroindustriais), Universidade Federal de Campina Grande, Pombal, 2015.

SALATINO, A. et al. Origin and chemical variation of Brazilian propolis. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2, n. 1, p. 33-38, 2005.

SARAVANAN, M.; RAO, K. P. Pectin-gelatin and alginate-gelatin complex coacervation for controlled drug delivery: Influence of anionic polysaccharides and drugs being encapsulated on physicochemical properties of microcapsules. **Carbohydrate Polymers**, v. 80, n. 3, p. 808–816, 2010.

SHAHIDI, F.; HAN, X. Encapsulation of food ingredients. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 33, n. 6, p. 501-547, 1993.

SMIDSROD, O. Solution Properties of Alginate. **Carbohydrate Research**, v. 13, n. 3, p. 359-372, 1970.

STEPHEN, A.M.; PHILLIPS, G.O.; WILLIAMS, P.A. **Food Polysaccharides and their applications**, 2nd ed., CRC Press: Florida, 2006.

SILVA, R.A.; RODRIGUES, A.E.; RIBEIRO, M.C.M.; CUSTÓDIO A. R.; ANDRADE, N.E.D.; PEREIRA, W.E. **Características físico-químicas e atividade microbiana de extratos de própolis da Paraíba, Brasil**. *Ciência Rural*, Santa Maria, v.36, n.6, p.1842-1848, 2006.

SILVA, R. C. P. A. **Estudo da cadeia produtiva do mel no contexto da apicultura Paranaense – uma contribuição para a identificação de políticas públicas prioritárias**. 2007. 103f. Monografia (Especialista em Formulação e Gestão de Políticas Públicas) – Universidade Federal do Ceará, 2007.

SILVA, M. A. et al. Compostos fenólicos e atividade antioxidante de *Leiothrixflavescens* (Bong) Ruhland (Eriocaulaceae). **Revistas de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, São Paulo, v. 28, n 3, p. 319–324, abr, 2008.

SILVA, D. F.; FAVARO-TRINDADE, C. S.; ROCHA, G. A.; THOMAZINI, M. Microencapsulation of lycopene by gelatin-pectin complex coacervation. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 36, p. 185-190, 2011.

SILVA, P. T.; FRIES, L. L. M.; MENEZES, C. R.; HOLKEM, A. T.; SCHWAN, C. L.; WIGMANN, E. F.; BASTOS, J. O.; SILVA, C. B. Microencapsulation: concepts, mechanisms, method sand some applications in food technology. **Ciência Rural**, v. 44, n. 7, p. 1304-1311, 2014.

SILVA, A. P. R., SOARES, A. P. S., da SILVA PESSANHA, C., ROZA, C. M., SAINT, L., TAVARES, C., & SILVA, A. T. M. F. Uso terapêutico da pomada de própolis em diferentes feridas crônicas. *Biológicas & Saúde*, 7(24), 2017.

SILVA, M. G. et al. Perfil dos criadores de Apis mellifera no município de Aparecida, Paraíba. **Acta ApicolaBrasilica**, v. 6, n. 1, p. 01-05, 2018.

SILVA, B.B. **Caracterização da própolis vermelha: sua origem botânica e o efeito sazonal sobre sua composição química e atividade biológica**. 40 f. Dissertação (Mestrado em odontologia) - Universidade Estadual de Campinas, Piracicaba, SP, 2019.

SILVINO, J. N. O. **Caracterização de iogurtes elaborados com soro de leite e própolis vermelha**. 2014. Dissertação (Mestrado em Nutrição) – Universidade Federal de Alagoas, Maceió, 2014. Orientador: Ticiano Gomes do Nascimento.

SIQUEIRA, A. B. et al. Trichophyton species susceptibility to green and red propolis from Brazil. **Letters in Applications in Microbiology**, v. 48, n. 1, p. 90-6, 2009.

SIQUEIRA, A. L. et al. Estudo da ação antibacteriana do extrato hidroalcoólico de própolis vermelha sobre Enterococcusfaecalis. **Revista de Odontologia da UNESP**, v. 43, n. 6, p. 359-366, 2014.

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.

SOLOMONS, T.W., FRYHLE, C. B. Organic Chemistry, 8 ed. (2004).

SOMAYEH HAJINEZHAD, BIBI MARZIEH RAZAVIZADEH, RAZIEH NIAZMAND & ISMAEL GHASEMI. Antimicrobial, mechanical, and physico chemical property esofethylenevinyl alcohol (EVOH) extruded films blended with propolis, **International Journal of Food Properties**, v. 23, n. 1, p. 2020-2032, 2020.

SOUZA, C. M. M. et al. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 351 – 355, jan. 2007.

SOUSA, S., GOMES, A. M., PINTADO, M. H., SILVA, J. P., COSTA, P., AMARAL, M. H., DUARTE, A. C., RODRIGUES, D., ROCHA-SANTOS, T. A. P., FREITAS, A. C. Characterization of freezing effect upon stability of, probiotic loaded, calcium-alginate microparticles. **Food and Bioproducts Processing**, v. 93, p. 90–97, 2015.

STANICZEK, J., JASTRZEBSKA-STOJKO, Ż., & STOJKO, R. Biological Activity of Propolis Ointment with the Addition of 1% Nanosilver in the Treatment of Experimentally-Evoked Burn Wounds. *Polymers*, 13(14), 2312, 2021.

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/Health and Environment Journal**, v. 7, n. 2, p.12-20, 2006.

SULTANA, K.; GODWARD, G.; REYNOLDS, N.; ARUMUGASWAMY, R.; PEIRIS, P.; KAILASAPATHY, K. Encapsulation of probiotic bacteria with alginate – strach and evaluation of survival in simulated gastrointestinal conditions and in yogurt. **International Journal of Food Microbiology**, v. 62, p. 47–55, 2003.

SUSAN, S., RAVALIA, M., & ZULHENDRI, F. (2021). Unusual presentation of oral hemangioma in tongue and the potential use of propolis as an adjunctive treatment. *Clinical Case Reports*, 9(12), e05243.

TEIXEIRA EW, MESSAGE D, MEIRA RMSA, SALATINO A. Indicadores da origem botânica da própolis: Importância e perspectivas. **Boletim da Indústria Animal**, v. 60, p. 83-106, 2005.

TONON, R. V. et al. Water sorption and glass transition temperature of spray dried açai (Euterpe olerace Mart.) juice. **Journal of Food Engineering**, v. 94, n. 3–4, p. 215–221, 1 out. 2009.

THOMAS, N. V.; KIM, S. K. Potential pharmacological applications of polyphenolic derivatives from marine brown algae. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 32, p. 325-335, 2016.

TRUSHEVA B, POPOVA M, BANKOVA V, SIMOVA S, MARCUCCI MC, MIORIN PL, PASIN FR, TSVETKOVA I. **Bioactive Constituents of Brazilian red propolis**. v. 3, p. 249-254, 2006.

TSAO, R.; DENG, Z. Separation procedures for naturally occurring antioxidant phytochemicals. **Journal of Chromatography B**, v. 812, p. 85-99, 2004.

V. TZANKOVA, D. ALUANI, Y. YORDANOV, M. KONDEVA – BURDINA, P. PETROV, V. BANKOVA, R. SIMEONOVA, V. VITCHEVA, F. ODJAKOV, A. APOSTOLOV, B. TZANKOV, K. YONCHE. Nanoformulação de própolis micelar de alta atividade antioxidante e hepatoprotetora. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 29, p. 364 – 372, 2019.

VALENGA, F. (2007). **Estudos de interação entre galactomanana e alginato e possíveis aplicações**. 90 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná. (2007).

VYAS, S. P. E KHAR, R. K. **Targeted & Controlled Drug Delivery: Novel Carrier Systems (HB)**. Delhi, CBS Publishers & Distributors, p. 1-594, 2006.

WANG, W. (2013). Co-extrusion encapsulation of canola oil with alginate: Effect of quercetin addition to oil core and pectin addition to alginate shell on oil stability. **Food Research International**, v. 54, p. 837–851, 2013.

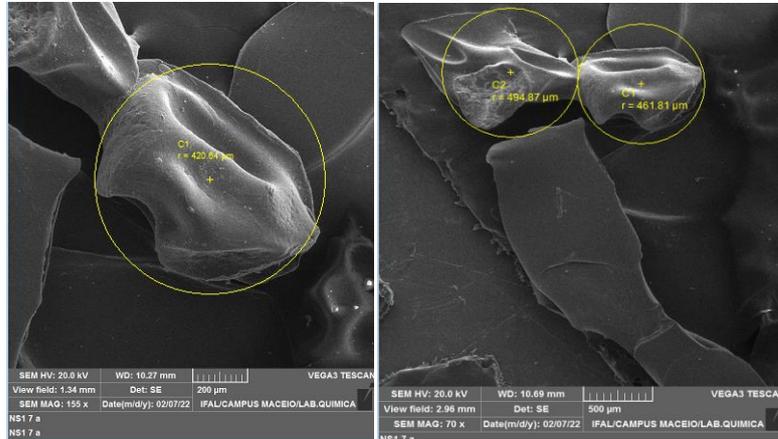
WILLIAMS, R.J.; SPENCER, J.P.; RICE -EVANS, C. Flavonoids: antioxidants or signalling molecules. **Free Radical Biology and Medicine**, v.36, n.7, p.838-849, 2004.

YAO, O. LI, Y., O. Iodine stability in iodized salt dual fortified with microencapsulated ferrous fumarate made by an extrusion-based encapsulation process. **Journal of Food Engineering**, v. 99, p. 232–238, 2010.

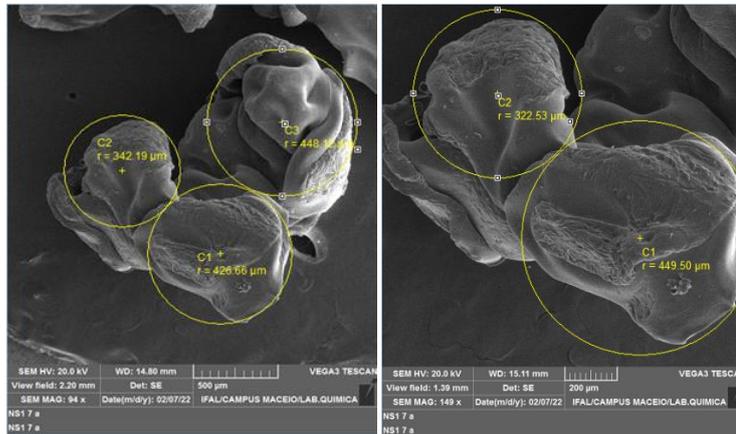
ANEXOS

Fotomicrografias das triplicatas de 1 até a 23

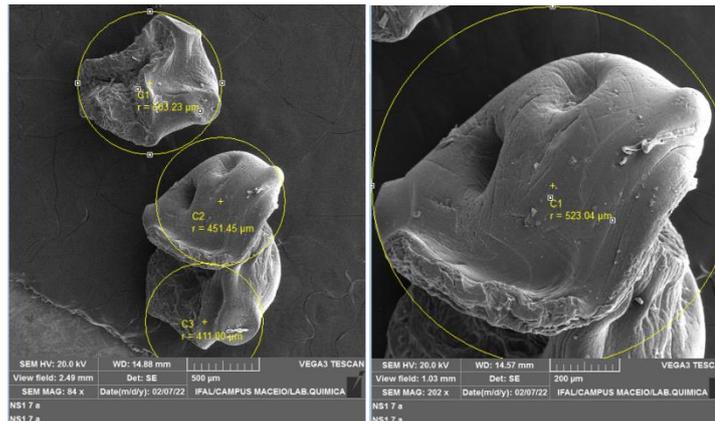
Triplicata nº 1



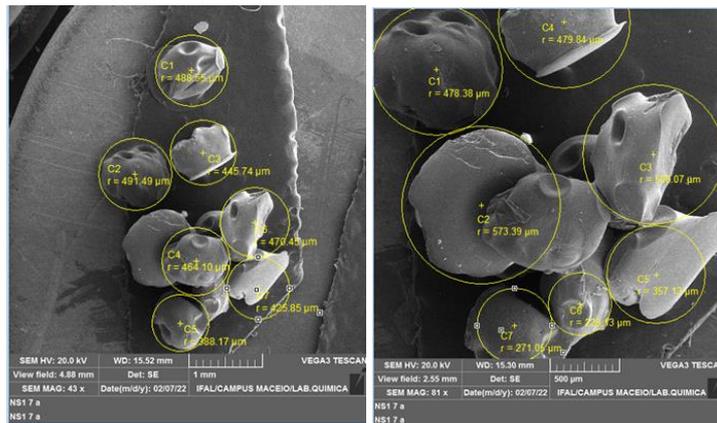
Triplicata nº 2



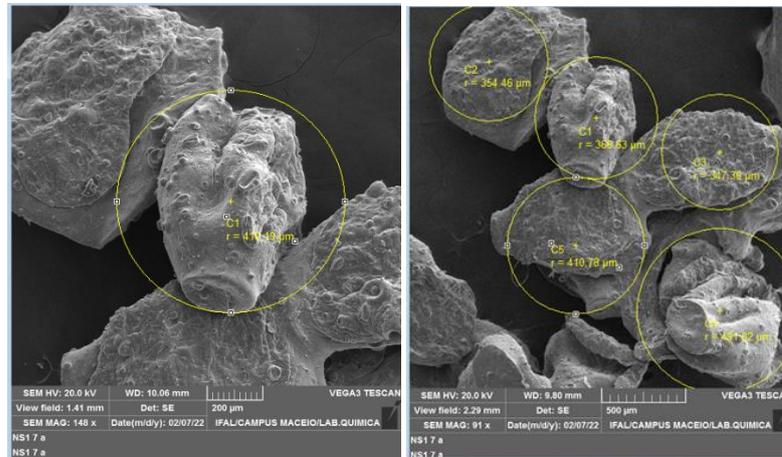
Triplicata nº 3



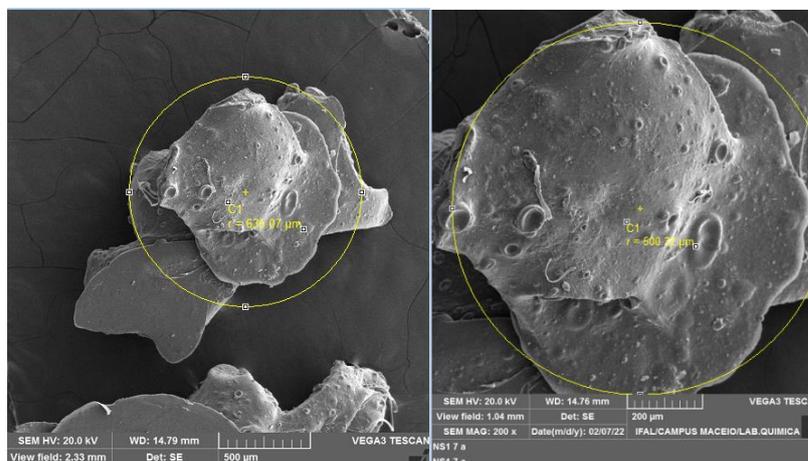
Triplicata n° 4



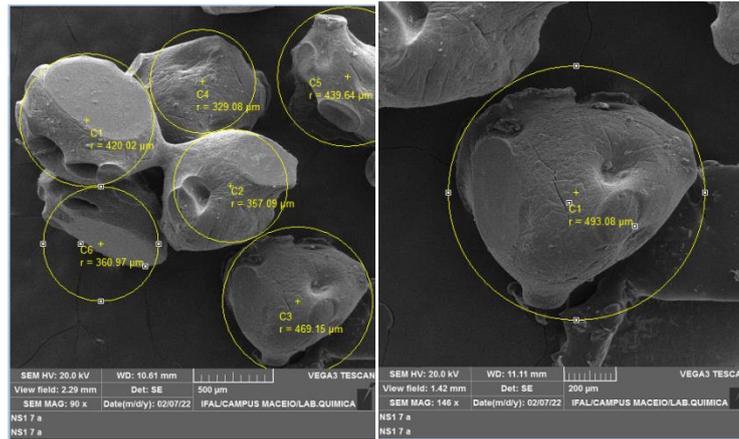
Triplicata n° 5



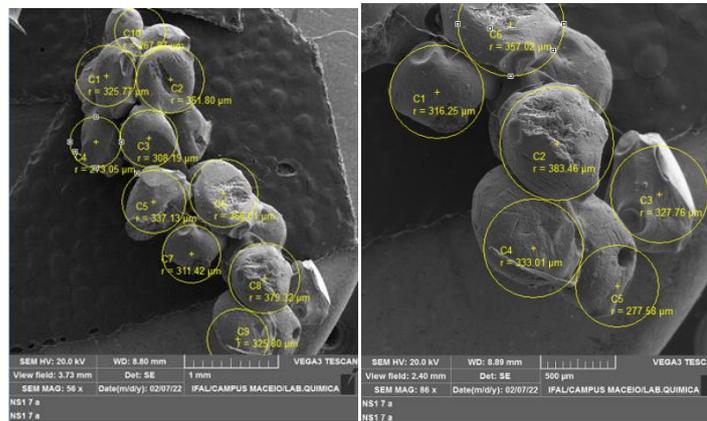
Triplicata n° 6



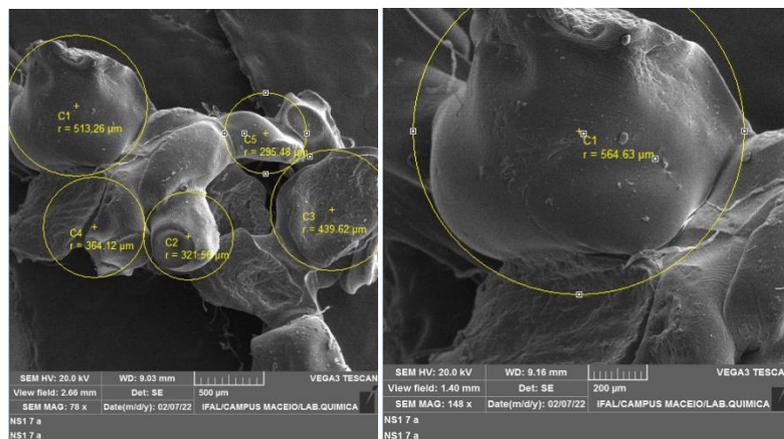
Triplicata n° 7



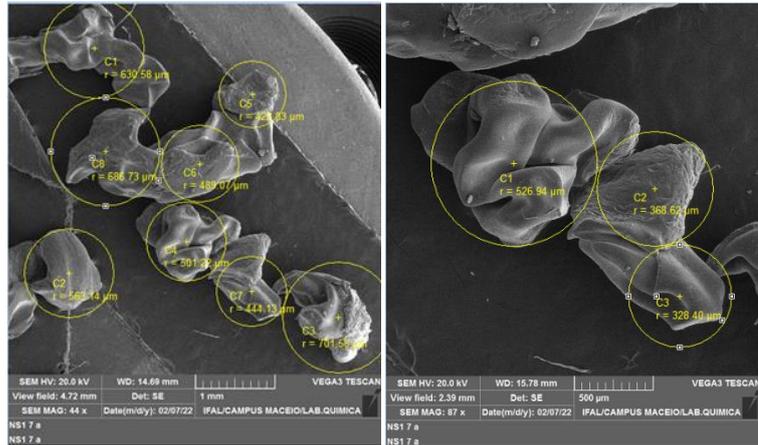
Triplicata n° 8



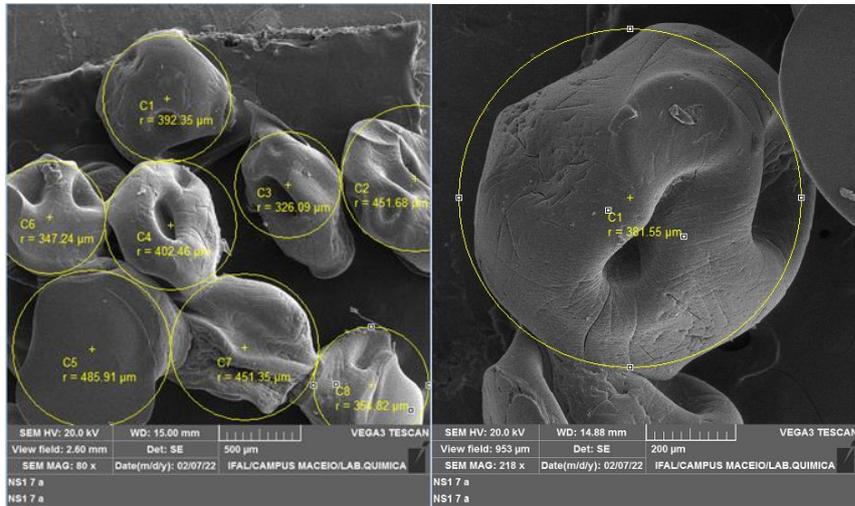
Triplicata n° 9



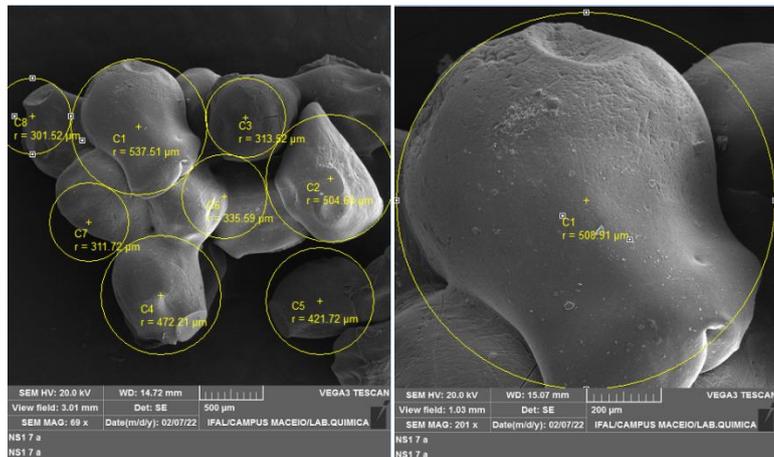
Triplicata n° 10



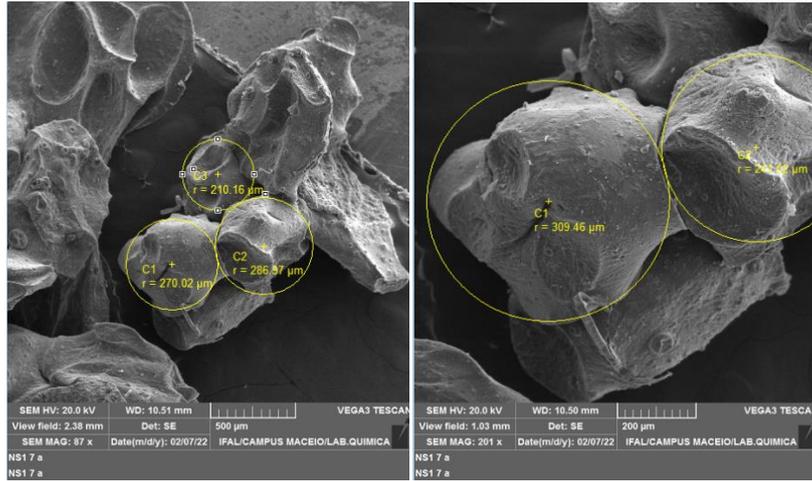
Triplicata n° 11



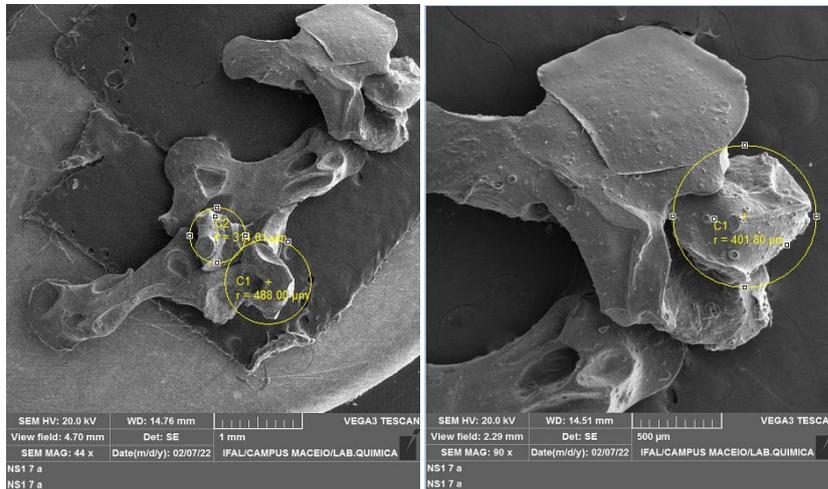
Triplicata n° 12



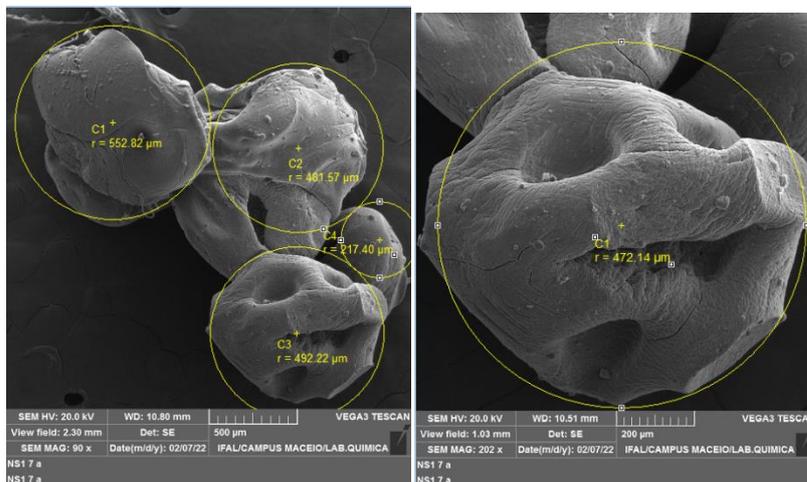
Triplicata n° 13



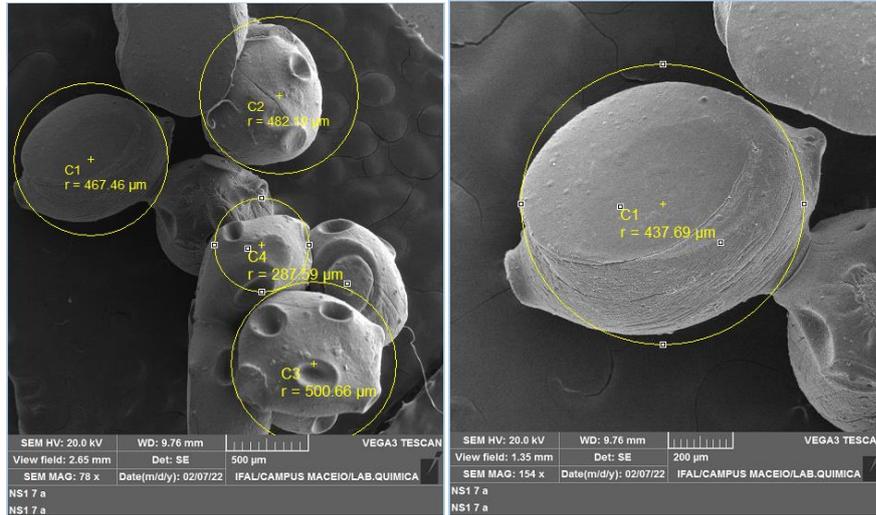
Triplicata n° 14



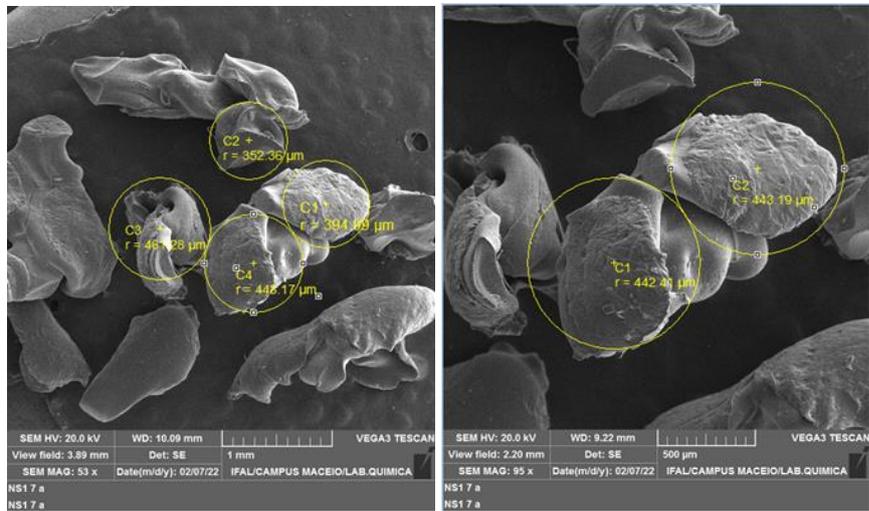
Triplicata n° 15



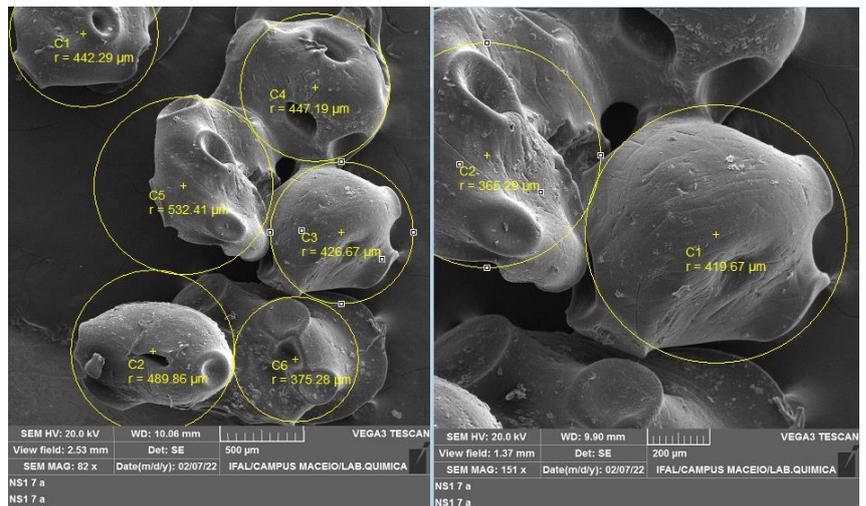
Triplicata n° 16



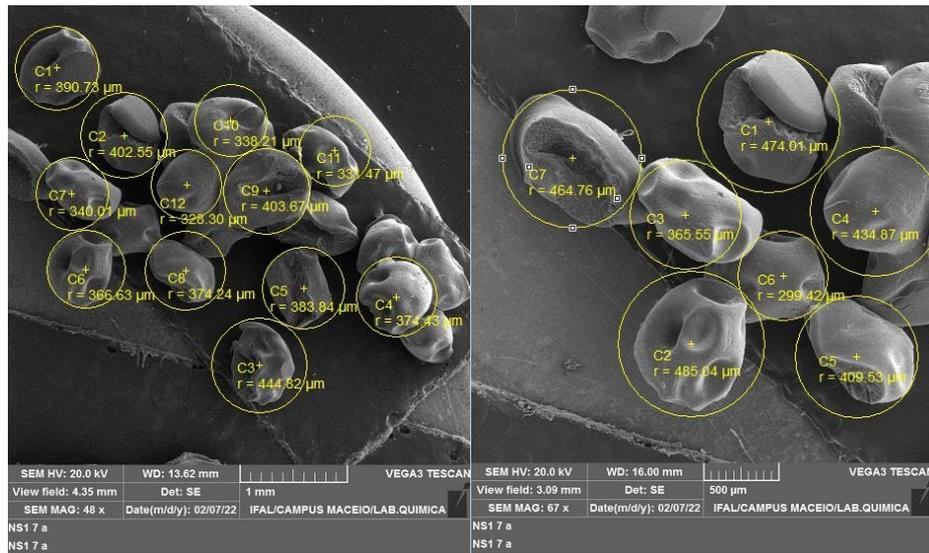
Triplicata n° 17



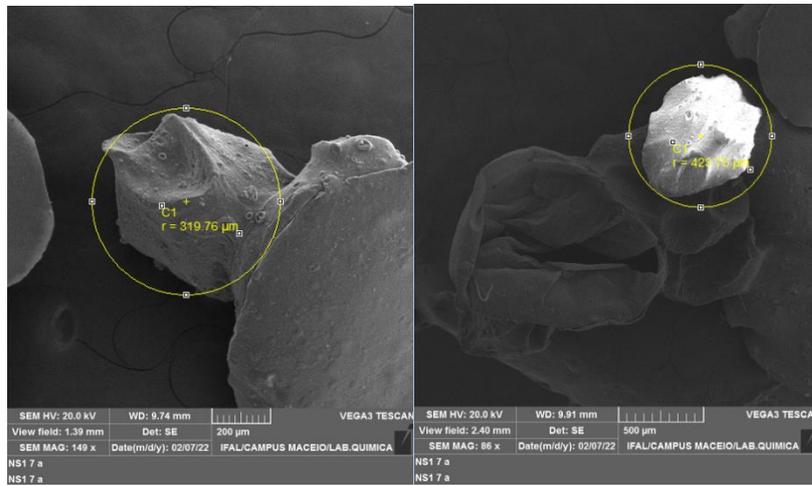
Triplicata n° 19



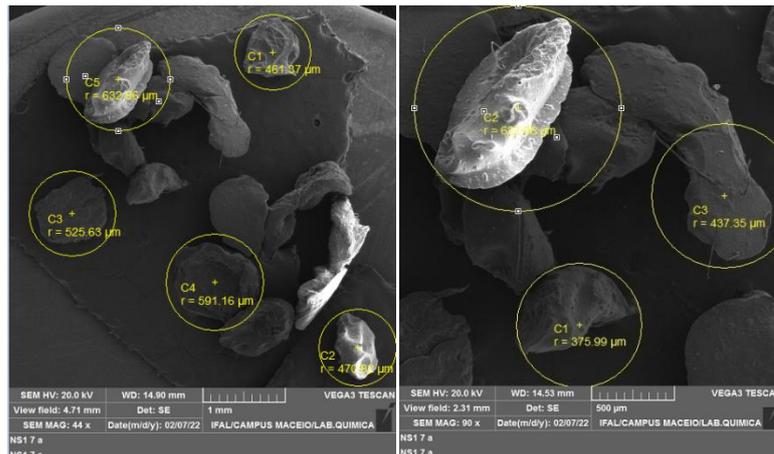
Formula n° 20



Triplicata n° 21



Triplicata n° 22



Triplicata n° 23