



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS  
GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA

LUCAS RAFAEL DE OLIVEIRA SILVA

**DESENVOLVIMENTO DE SISTEMAS MICROPARTICULADOS CONTENDO  
EXTRATO DE PRÓPOLIS MARROM DA REGIÃO DE UNIÃO DOS PALMARES  
(ALAGOAS)**

MACEIÓ - AL  
2023

LUCAS RAFAEL DE OLIVEIRA SILVA

**DESENVOLVIMENTO DE SISTEMAS MICROPARTICULADOS CONTENDO  
EXTRATO DE PRÓPOLIS MARROM DA REGIÃO DE UNIÃO DOS PALMARES  
(ALAGOAS)**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao corpo docente do Instituto de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Alagoas como parte dos requisitos para obtenção do título de bacharel em Farmácia.

Orientador: Prof. Dr. Ticiano Gomes do Nascimento

MACEIÓ - AL

2023

**Catlogação na Fonte**  
**Universidade Federal de Alagoas**  
**Biblioteca Central**  
**Divisão de Tratamento Técnico**

Bibliotecário: Marcelino de Carvalho Freitas Neto – CRB-4 – 1767

S586d Silva, Lucas Rafael de Oliveira.  
Desenvolvimento de sistemas microparticulados contendo extrato de própolis marrom da região de União dos Palmares / Lucas Rafael de Oliveira Silva. – 2023.  
75 f. : il.

Orientador: Ticiano Gomes do Nascimento.  
Monografia (Trabalho de Conclusão de Curso em Farmácia) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Ciências Farmacêuticas. Maceió, 2023.

Bibliografia: f. 55-75.

1. Flavonoides - Micropartículas. 2. *Spray-Dryer*. 3. Físico-química. 4. Antioxidantes. I. Título.

CDU: 615.279

# FOLHA DE APROVAÇÃO

LUCAS RAFAEL DE OLIVEIRA SILVA

## DESENVOLVIMENTO DE SISTEMAS MICROPARTICULADOS CONTENDO EXTRATO DE PRÓPOLIS MARROM DA REGIÃO DE UNIÃO DOS PALMARES (ALAGOAS)

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao corpo docente do Instituto de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Alagoas como parte dos requisitos para obtenção do título de bacharel em Farmácia.

Orientador: Prof. Dr. Ticiano Gomes do Nascimento

Documento assinado digitalmente



TICIANO GOMES DO NASCIMENTO  
Data: 24/05/2023 17:51:36-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

---

Prof. Dr. Ticiano Gomes do Nascimento - ICF/UFAL  
(Orientador)

### **Banca Examinadora:**

Documento assinado digitalmente



SALVANA PRISCYLLA MANSO COSTA  
Data: 24/05/2023 20:22:26-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

---

Dr<sup>a</sup>. Salvana Priscylla Manso Costa – Membro externo PPGCF/UFAL

Documento assinado digitalmente



EURICA ADELIA NOGUEIRA RIBEIRO  
Data: 24/05/2023 17:57:27-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

---

Prof<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup> Êurica Adélia Nogueira Ribeiro – ICF/UFAL

## AGRADECIMENTOS

Antes de qualquer menção, agradeço principalmente a Jeová Deus, o Pai Todo-Poderoso – Criador, Reitor e Sustentador da vida e do Universo (Ap. 4:11) –, por esse e todos os outros êxitos que obtive e obterei; por me sustentar nos momentos mais árduos e, com Seu infinito amor, misericórdia e bondade imerecida, ser minha fortaleza, adestrar minhas mãos e guiar meus passos na desafiadora estrada da vida. Nenhuma palavra é capaz de agradecer-lhe à altura. *“Que as pessoas saibam que tu, cujo nome é Jeová, somente tu és o Altíssimo sobre toda a terra”* (Salmo 83:18).

Agradeço aos meus amados pais, Rosivânia e Luciano, por durante toda a minha vida se dedicarem com afinco à minha educação, pelos inestimáveis valores a mim ensinados e por nunca me abandonarem. Minha eterna gratidão!

À minha irmã, Lavínia, a quem amo muito, que sempre depositou sua confiança e me estimulou em momentos difíceis, por vibrar com as minhas conquistas e me ajudar a seguir em frente.

Ao professor Prof. Dr. Ticiano Gomes do Nascimento, por todos esses anos compartilhar pacientemente seu vastíssimo conhecimento, por me ensinar não só as metodologias laboratoriais, mas virtudes que levarei para o resto da vida. Obrigado por me orientar neste trabalho e nas pesquisas as quais contribuí, por ser tão dedicado e motivar seus alunos. Para nós é uma honra tê-lo como mestre!

Agradeço a cada um dos meus queridos familiares – tios, primos e avós – os quais, desde que eu era bem pequeno, acreditam no meu potencial e me encorajam a alçar voos mais altos. Meu muitíssimo obrigado!

Aos meus amigos, os quais se fazem presentes ao meu lado, ombro a ombro, não só neste, mas em tantos outros capítulos da minha vida. Menciono, sobretudo, Nathan Chaluppe e Wendeson Nascimento, pela irmandade constante, além de todos os outros que fazem parte deste seleto grupo.

Aos meus amigos de turma, em especial do Grupo “100% humilhação”, são eles: Bruno, Caio, Cledson, Gleice, Igor, Izaele, Joany, Joyce, Judson, Julliana, Lais, Láyla, Matheus, Michelle e Natalia. Sou muito grato por tê-los como companheiros

nessa trajetória de nossas vidas. Com muitas saudades, à Elidiane Torres (*in memoriam*), que tanto me motivou a permanecer no curso com seus conselhos e sua garra em lutar pela vida, alegrando todos ao seu redor.

Agradeço também à Dr.<sup>a</sup> Salvana Priscylla Manso Costa, por contribuir grandemente com a minha jornada acadêmica, por compartilhar de forma paciente sua grande bagagem de experiência, sempre sendo acessível e altruísta.

À professora Dr.<sup>a</sup> Êurica Adélia Nogueira Ribeiro, a qual sentirei muitas saudades não só das aulas extremamente instrutivas, que me despertaram o interesse pelo mundo da Farmacologia, mas da grande pessoa que és, com o peculiar bom humor que contagia a todos.

À professora Dr.<sup>a</sup> Silvana Ayres Martins, por aguçar o meu fascínio pela Imunologia, por ser tão afável e se preocupar não só com o desempenho de cada aluno, mas auxiliá-los com seus problemas pessoais.

À professora Dr.<sup>a</sup> Sâmia Andrícia Souza da Silva, por ser tão competente no que faz, por colaborar abundantemente com seu rico conhecimento, instigando em mim o apreço pela Fitoterapia e Farmacognosia, por sempre estar disposta a transmitir seu saber com os discentes.

Ao professor Dr. Edson de Souza Bento, por lecionar com dedicação, sempre se preocupando gentilmente com o aprendizado de cada aluno durante as aulas de Química Geral no Instituto de Química e Biotecnologia.

São muitos os professores os quais tive o privilégio de aprender ao decorrer da minha vida – desde o primeiro momento em que pisei em uma escola, quando criança, até a Universidade –, bem como outros que ainda conhecerei. A vocês, mestres, meu sentimento de gratidão!

Aos meus amigos do Laboratório de Análises Farmacêuticas e Alimentícias (LAFA-UFAL) pelo companheirismo de sempre: Arthur, Emanuel, Erisson, Jeniffer, João, Kathylen, Mailde, Monique, Nataly e todos os outros integrantes.

Por fim, agradeço a todas as pessoas que direta ou indiretamente contribuíram para a concretização deste objetivo.

*“Todo caminho da gente é resvaloso.  
Mas; também, cair não prejudica demais –  
a gente levanta,  
a gente sobe,  
a gente volta! (...)  
O correr da vida embrulha tudo, a vida é assim:  
esquenta e esfria, aperta e daí afrouxa,  
sossega e depois desinquieta.  
O que ela quer da gente é coragem.  
O que Deus quer é ver a gente aprendendo a  
ser capaz de ficar alegre a mais, no meio da alegria,  
e inda mais alegre ainda no meio da tristeza!”*

**– Guimarães Rosa**  
(em “Grande Sertão: Veredas”)

## RESUMO

A própolis é definida como uma substância resinosa produzida por abelhas da espécie *Apis mellifera*, de composição extremamente complexa e diversificada, haja vista que a mesma possui natureza multifatorial por estar relacionada com muitas variáveis ao mesmo tempo (como os fatores climáticos, geográficos e botânicos, por exemplo), tornando a caracterização detalhada um dos grandes desafios para os pesquisadores deste segmento. Cada vez mais esse produto apícola tem se tornado alvo de vários estudos devido suas inúmeras atividades farmacológicas, destacando-se a antioxidante, antimicrobiana, anti-inflamatória, antineoplásica, dentre outras. Entretanto, é necessário utilizar uma técnica que melhore a baixa solubilidade da própolis em água e aumente a biodisponibilidade de seus compostos de interesse farmacêutico, podendo levar a uma maior absorção e eficácia no organismo. Uma das técnicas que podem proporcionar tais vantagens é a secagem por atomização *spray-dryer*. O objetivo do presente trabalho foi realizar a obtenção e caracterização físico-química de sistemas microparticulados contendo extrato de própolis marrom de União dos Palmares (AL) pela técnica de *spray-dryer*. Desse modo, foram desenvolvidos sistemas microparticulados e realizados estudos para determinação da atividade antioxidante, do teor de fenóis e flavonoides totais, UV-vis, FTIR, Análise Térmica, MEV e estudo de dissolução *in vitro*. O extrato de própolis marrom de Alagoas e as micropartículas contendo o extrato apresentaram teor de flavonoides totais de 5,15% e 1,13%, fenóis totais de 14,16 e 4,81% em termos de ácido gálico, fenóis totais de 16,53% e 6,00% em termos de catequina, atividade antioxidante com valores de CI50 de 13,77 µg/mL e 60,80 µg/mL, respectivamente. Os dados de MEV e FTIR evidenciaram a encapsulação dos compostos fenólicos da própolis marrom de Alagoas e a análise térmica atestou a termoestabilidade dos extratos estudados. Sobre o perfil de dissolução, sistemas microparticulados obtidos possibilitaram a liberação média de 66% de concentrações de flavonoides sob diferentes meios em 240 minutos, bem como demonstraram ter baixa solubilidade em água, sendo possível melhorar seu perfil de dissolução e sua absorção pelos fluidos gastrointestinais mediante adição de adjuvantes farmacotécnicos.

**PALAVRAS-CHAVE:** Flavonoides; Micropartículas; Spray-Dryer; Caracterização físico-química; Atividade antioxidante.

## ABSTRACT

Propolis is defined as a resinous substance produced by bees of the *Apis mellifera* species, with an extremely complex and diverse composition, given that it has a multifactorial nature because it is related to many variables at the same time (such as climatic, geographic and botanical factors, for example), making the detailed characterization one of the great challenges for researchers in this segment. This bee product has increasingly become the target of several studies due to its numerous pharmacological activities, highlighting the antioxidant, antimicrobial, anti-inflammatory, antineoplastic, among others. However, it is necessary to use a technique that improves the low solubility of propolis in water and increases the bioavailability of its compounds of pharmaceutical interest, which may lead to greater absorption and effectiveness in the body. One of the techniques that can provide such advantages is spray-dryer atomization drying. The objective of this work was to obtain and physicochemical characterization of microparticulate systems containing brown propolis extract from União dos Palmares (AL) using the spray-dryer technique. Thus, microparticulate systems were developed and studies were carried out to determine the antioxidant activity, total phenols and flavonoids, UV-vis, FTIR, Thermal Analysis, SEM and *in vitro* dissolution studies. The brown propolis extract from Alagoas and the microparticles containing the extract showed total flavonoid content of 5.15% and 1.13%, total phenols of 14.16 and 4.81% in terms of gallic acid, total phenols of 16.53% and 6.00% in terms of catechin, antioxidant activity with IC<sub>50</sub> values of 13.77 µg/mL and 60.80 µg/mL, respectively. SEM and FTIR data showed the encapsulation of phenolic compounds in brown propolis from Alagoas and thermal analysis attested to the thermostability of the studied extracts. Regarding the dissolution profile, microparticulate systems obtained enabled the average release of 66% of flavonoid concentrations under different media in 240 minutes, as well as demonstrated low solubility in water, making it possible to improve their dissolution profile and their absorption by gastrointestinal fluids through addition of pharmacotechnical adjuvants.

**KEY WORDS:** Flavonoids; Microparticles; Spray-Dryer; Physical-chemical characterization; Antioxidant activity.

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> – Classificação das própolis brasileiras de acordo com a cor do extrato etanólico e a região de origem.....	9
<b>Tabela 2</b> – Relação de microrganismos de importância sanitária que se apresentaram susceptíveis aos efeitos de tratamentos realizados com extratos de própolis.....	16
<b>Tabela 3</b> – Características espectrais no UV-Vis para identificação de diferentes classes de flavonoides.....	42

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> – <i>Apis mellifera</i> .....	3
<b>Figura 2</b> – Fragmento do papiro de Ebers, primeiro texto médico conhecido.....	4
<b>Figura 3</b> – Colmeia de abelhas melíferas.....	6
<b>Figura 4</b> – Própolis verde produzida em Minas Gerais, confeccionada pelas abelhas a partir de resinas oriundas do alecrim-do-campo para revestir e proteger a colmeia..	6
<b>Figura 5</b> – Principais exemplos de fontes vegetais as quais as abelhas buscam a matéria-prima para a produção da própolis brasileira.....	7
<b>Figura 6</b> – Diferentes aspectos de algumas própolis brasileiras.....	8
<b>Figura 7</b> – Principais compostos químicos encontrados na própolis marrom.....	10
<b>Figura 8</b> – Estrutura química básica (flavona) dos flavonoides.....	11
<b>Figura 9</b> – Estruturas químicas das principais classes de flavonoides.....	12
<b>Figura 10</b> – Ácidos fenólicos (ácido cumárico, ácido cafeico e ácido ferúlico).....	12
<b>Figura 11</b> – Esquema da técnica de secagem por atomização spray-dryer.....	20
<b>Figura 12</b> – Etapas de funcionamento da técnica de spray-drying.....	21
<b>Figura 13</b> – Mecanismos de reação entre o radical DPPH• e um antioxidante através da transferência de um átomo de hidrogênio.....	23
<b>Figura 14</b> – Microparticulado spray-dryer contendo própolis marrom de União dos Palmares - AL.....	35
<b>Figura 15</b> – Atividade antioxidante do extrato comercial de própolis marrom de União dos Palmares/AL e microcápsulas de própolis verde comercial em comparação ao Trolox®.....	35
<b>Figura 16</b> – Teor de flavonoides totais no extrato de própolis marrom e microencapsulados de própolis marrom em função do padrão quercetina.....	39
<b>Figura 17</b> – Teor de fenóis totais no extrato de própolis marrom e microencapsulados de própolis marrom em função do padrão ácido gálico.....	39
<b>Figura 18</b> – Teor de fenóis totais no extrato de própolis marrom e microencapsulados de própolis marrom em função do padrão de catequina.....	40
<b>Figura 19</b> – Espectro UV-Vis do extrato de própolis marrom da região de União dos Palmares/Alagoas em diferentes concentrações. As linhas pontilhadas representam alguns subníveis de absorção de energia vibracional e rotacional dentro das bandas de absorção em 215, 225, 238, 265, 268, 272, 278, 290, 307, 310, 317, 325 nm.....	42
<b>Figura 20</b> – Identificação das porções estruturais Banda II (220-280 nm) e Banda I	

(300 – 400 nm) do esqueleto dos anéis A e B de flavonoides.....	43
<b>Figura 21</b> – Fotomicrografia Eletrônica de Varredura do sistema microparticulado de própolis Marrom da região de União dos Palmares-Alagoas. Fotomicrografias A e B foram obtidas usando campo de visão entre 407-454 µm e escala de 100 µm. Fotomicrografias C e D foram usados campo de visão entre 143- 115 µm e escala de 20 µm.....	44
<b>Figura 22</b> – Espectro FTIR no modo ATR do Extrato de própolis marrom submetido a evaporação do solvente e do sistema microparticulado de própolis marrom obtido por Spray-Dryer.....	45
<b>Figura 23</b> – Curva TG do extrato de própolis marrom comparado ao das microcápsulas.....	46
<b>Figura 24</b> – Perfil de dissolução das microcápsulas spray-dryer contendo extrato de própolis marrom de União dos Palmares - AL (BPM) em seis meios de dissolução. 48	
<b>Figura 25</b> – Representação do conjugado polímero-fármaco e seu mecanismo dependente do tempo e do meio de dissolução.....	49
<b>Figura 26</b> – Aspecto final das âncoras ao final do ensaio de dissolução no meio com HCl 0,05M (âncoras 1 a 4) e Tampão fosfato equimolar pH 6,8 (âncoras 5 a 8), respectivamente.....	51
<b>Figura 27</b> – Aspecto final das âncoras ao final do ensaio de dissolução no meio com água e Tween 60 1%.....	52
<b>Figura 28</b> – Aspecto final das âncoras ao final do ensaio de dissolução no meio com água osmose reversa + Lauril sulfato de sódio (SLS) 1%.....	52
<b>Figura 29</b> – Aspecto final das âncoras ao final do ensaio de dissolução no meio com HCl 0,05M + SLS 1%.....	52
<b>Figura 30</b> – Aspecto final das âncoras ao final do ensaio de dissolução no meio com HCl 0,05M + adição de tampão fosfato equimolar (pH 6,8), após 1 hora.....	53

## LISTA DE ABREVIATURAS E UNIDADES

- %AA:** Atividade Antioxidante
- ( $\lambda$ ):** Comprimento de Onda
- Al<sup>3+</sup>:** Íon Alumínio
- AL:** Alagoas
- AlCl<sub>3</sub>:** Cloreto de Alumínio
- ANVISA:** Agência Nacional de Vigilância Sanitária
- C<sub>15</sub>H<sub>10</sub>O<sub>7</sub>:** Quercetina
- CAPE:** Éster Fenólico do Ácido Cafeico
- CCDAE:** Cromatografia em Camada Delgada de Alta Eficiência
- CE50:** Concentração Eficiente
- CI50:** Concentração Inibitória
- CLAE:** Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
- COX:** Cicloxigenase
- CPFs:** Conjugados Polímero-Fármacos
- DPPH•:** 2,2-difenil-1-picrilhidrazil
- EDS:** Espectroscopia de Energia Dispersiva de Raios-X
- EEPM:** Extrato Etanólico de Própolis Marrom
- EROs:** Espécies Reativas de Oxigênio
- FTIR:** Infravermelho por Transformada de Fourier
- HCl:** Ácido Clorídrico
- HIV:** Vírus da Imunodeficiência Humana
- MAPA:** Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento
- MEV:** Microscopia Eletrônica de Varredura
- MRSA:** *Staphylococcus aureus* Resistente à Meticilina
- Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>:** Carbonato de Sódio
- OH<sup>•</sup>:** Radical Hidroxil
- RPM:** Rotações por Minuto
- SLS:** Lauril Sulfato de Sódio
- TG:** Análise Termogravimétrica
- URSS:** União das Repúblicas Socialistas Soviéticas
- UV-vis:** Ultravioleta Visível

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
<b>2 REFERENCIAL TEÓRICO.....</b>	<b>3</b>
2.1 Própolis.....	3
2.1.1 Contexto histórico.....	3
2.1.2 Origem botânica e variabilidade brasileira.....	5
2.1.3 Composição química.....	9
2.1.4 Principais atividades farmacológicas.....	13
2.2 Secagem por atomização spray-dryer.....	19
2.2.1 A técnica.....	19
2.2.2 Aplicações usando a própolis.....	22
2.3 Técnicas aplicadas à caracterização físico-química dos sistemas microparticulados.....	23
2.3.1 Atividade antioxidante pelo sequestro de radicais livres DPPH•.....	23
2.3.2 Determinação do teor de fenóis totais pelo método de Folin-Ciocalteu.....	24
2.3.3 Determinação do teor de flavonoides totais.....	24
2.3.4 Espectroscopia UV-Vis.....	24
2.3.5 Infravermelho por transformada de Fourier (FTIR).....	25
2.3.6 Análise termogravimétrica (TG).....	26
2.3.7 Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	26
2.3.8 Ensaio de dissolução in vitro.....	27
<b>3 OBJETIVOS.....</b>	<b>27</b>
3.1 Geral.....	27
3.2 Específicos.....	27
<b>4 METODOLOGIA.....</b>	<b>28</b>
4.1 Obtenção do extrato hidroalcoólico de própolis marrom.....	28
4.2 Preparação dos sistemas microparticulados.....	28
4.3 Análise do potencial antioxidante utilizando sequestro de radical DPPH•.....	29
4.3.1 Preparação da solução de DPPH• 4mM.....	29

4.3.2 Teor de sólidos solúveis no extrato etanólico.....	29
4.3.3 Leitura das medidas de absorvância das amostras.....	29
4.4 Determinação do Teor de Fenóis Totais.....	30
4.4.1 Construção da curva de calibração do ácido gálico.....	30
4.4.2 Teor de fenóis totais dos sistemas microparticulados e do extrato da própolis marrom.....	30
4.5 Determinação do Teor de Flavonoides Totais.....	31
4.5.1 Construção da curva de calibração quercetina.....	31
4.5.2 Teor de flavonoides totais dos sistemas microparticulados e do extrato de própolis marrom.....	31
4.6 Ultravioleta visível (UV-VIS).....	32
4.7 Infravermelho por transformada de Fourier (FTIR).....	32
4.8 Análise termogravimétrica (TG).....	33
4.9 Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	33
4.10 Ensaio de dissolução in vitro.....	33
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>34</b>
5.1 Obtenção e aspectos visuais dos sistemas microparticulados.....	34
5.2 Ensaio de atividade antioxidante.....	35
5.3 Determinação do teor de fenóis e flavonoides totais.....	38
5.4 Ultravioleta visível (UV-Vis).....	41
5.5 Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	44
5.6 Infravermelho por transformada de Fourier (FTIR).....	45
5.7 Análise termogravimétrica (TGA).....	46
5.8 Perfil de dissolução.....	47
<b>6 CONCLUSÃO.....</b>	<b>54</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>55</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O exercício das diversas formas de medicinas naturais e/ou alternativas tem despertado cada vez mais o interesse acerca dos produtos apícolas tais como mel, pólen, geleia real, própolis, dentre outros. Majoritariamente a própolis, sob a forma de extratos hidroetanólicos, vem obtendo maior destaque tanto pelas suas propriedades terapêuticas quanto pela aplicabilidade na indústria farmacêutica, cosmética e alimentícia, como por exemplo na forma de alimentos funcionais. Nesse âmbito, a própolis vem se revelando uma mola propulsora da apicultura e de seus desdobramentos comerciais. Existem diversos produtos contendo esse produto apícola comercializados em todo o mundo, sobretudo no Japão, tais como balas, chocolates, doces, xampus, cremes para pele, soluções anti-sépticas, pastas de dente, etc (ACKERMANN, 1991; PARK *et al.*, 1998).

A própolis é uma mistura complexa, formada por material resinoso e balsâmico coletado pelas abelhas, principalmente da espécie *Apis mellifera*, dos ramos, flores, pólen, brotos e exsudatos de árvores; além desses, na colmeia, as abelhas adicionam secreções salivares e enzimas (PEREIRA *et al.*, 2002; FRANCO *et al.*, 2000). As abelhas utilizam a própolis para vedar frestas e diminuir o tamanho da entrada da colmeia, reduzindo o ataque de intrusos e protegendo as abelhas e suas crias do frio. Ademais, serve como material antisséptico, sendo depositada no interior dos alvéolos onde a abelha rainha realiza a postura dos ovos e também é utilizada para envolver inimigos abatidos no interior da colmeia, evitando que apodreçam e contaminem o ninho (BREYER, 1982).

É possível encontrar diversos tipos de própolis com distintas composições químicas ao redor do planeta, cada tipo vai se diferenciar pela sua origem botânica, fauna, flora e sazonalidade. De modo geral, a própolis recolhida de uma colmeia de abelhas, também conhecida como própolis bruta, contém 50 - 60% de resinas e bálsamos, 30 - 40% de ceras, 5 - 10% de óleos essenciais, 5% de grão de pólen, além de microelementos como alumínio, cálcio, estrôncio, ferro, cobre, manganês e pequenas quantidades de vitaminas B1 (tiamina), B2 (riboflavina), B5 (ácido pantotênico), B6 (piridoxina), C (ácido ascórbico) e E (alfa tocoferol) (PARK *et al.*, 2002; BURDOCK, 1998; FUNARI & FERRO, 2006; MENEZES, 2005; WOISKY *et al.*, 1998).

A composição química da própolis é tida como complexa, pois as substâncias nela presentes variam de acordo com sua origem geográfica e com as diferenças genéticas das abelhas responsáveis por sua coleta. Estas variáveis acarretam mudanças em suas propriedades farmacológicas, que tendem a ser maiores em regiões tropicais, devido à riqueza da flora existente, e menores em regiões temperadas. Outro fator importante na determinação da composição química desse apiterápico é a época da coleta, pois em países como o Brasil esta ocorre o ano todo, ocasionando possíveis variações sazonais. Conseqüentemente, tais fatores acabam por interferir na eficácia terapêutica que é fornecida por esse produto apícola (PERUCHI *et al.*, 2001; PARK *et al.*, 1998; AZEVEDO *et al.*, 1986; FERNANDES *et al.*, 2006; SANTOS *et al.*, 2007). Nesse contexto, inicialmente houve a identificação de 12 variedades brasileiras de própolis — a amarela, castanho-escura, castanho-clara, marrom-esverdeada, amarelo-escura, verde e vermelha —, pertencentes às regiões Nordeste, Sul e Sudeste do país (LEMOS *et al.*, 2018).

No que tange à sua aplicação, um dos grandes obstáculos tecnológicos enfrentado pela indústria farmacêutica, alimentícia e cosmética ainda é a de obter bioprodutos da própolis com um rendimento razoável de compostos ativos, haja vista que estes apresentam pouca solubilidade em água – o principal veículo empregado em suas formulações –, sendo este um fator limitante na aplicação clínica do apiterápico, que perde, por isso, parte do seu potencial farmacológico (DIMOV *et al.*, 1992).

Outrossim, em decorrência da grande variação de composição e o grande número de compostos bioativos, a caracterização físico-química de qualidade da própolis brasileira torna-se um desafio para a comunidade científica. Desse modo, é necessário determinar quais são os parâmetros que devem ser controlados para que a própolis comercial possua uma determinada atividade farmacológica (PEREIRA *et al.*, 2002). Outro fator é que a maioria dos extratos disponíveis no mercado são produzidos à base de álcool, o qual pode provocar reações adversas e possuir contra indicações, o que tem atraído cada vez mais pesquisas com outros tipos de formas farmacêuticas (BANKOVA *et al.*, 1996; KONISHI, *et al.*, 2004). Nesse âmbito, o objetivo deste trabalho foi realizar a obtenção, pela técnica de secagem por atomização *spray-dryer*, e caracterização físico-química de sistemas microparticulados contendo extrato de própolis marrom de União dos Palmares (AL).

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Própolis

#### 2.1.1 Contexto histórico

Há milênios, desde quando o homem passou a utilizar artigos oriundos da natureza no seu arsenal terapêutico, praticamente todas as civilizações antigas, em suas medicinas naturais, já faziam uso de produtos das abelhas melíferas (Figura 1), destacando-se o mel e a própolis, administrada sob diversas maneiras. Os primeiros relatos de sua utilização datam da Mesopotâmia e do Egito Antigo, além de ser muito utilizada pelos assírios, incas, romanos e gregos, sendo estes últimos os responsáveis por unir, no idioma grego, as palavras “*pro*” e “*polis*”, significando, respectivamente, “defesa” e “cidade ou comunidade”, originando a palavra “*própolis*” (“em defesa da cidade”) em si, utilizada até hoje para se referir ao material resinoso apícola (CASTALDO & CAPASSO, 2002; PEREIRA *et al.*, 2002).

Figura 1 – *Apis mellifera*.

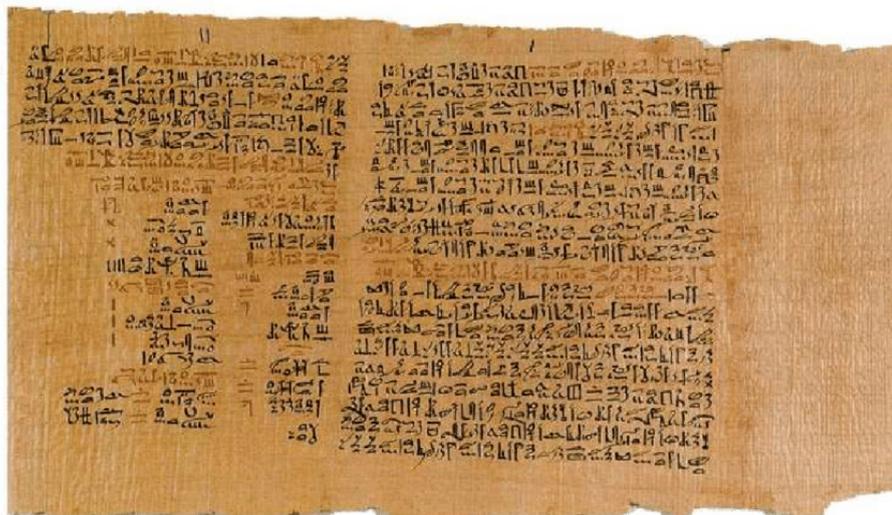


Fonte: ROJAS-SANDOVAL, 2022.

No primeiro texto médico, conhecido por "Livro de Produção de Medicamentos para Todas as Partes do Corpo Humano", narrado no papiro de Ebers (Figura 2) e escrito há cerca de 1.700 a.C., se faz menção à própolis como produto de uso medicinal. Relata-se que no Egito Antigo era chamada de “cera negra” e empregada como um dos materiais para embalsamar os cadáveres devido à sua propriedade anti putrefativa (CASTALDO & CAPASSO, 2002; PEREIRA *et al.*, 2002).

Ademais, são encontrados em escritos históricos da medicina natural que outros povos ancestrais, como os chineses e tibetanos, possuíam centenas de receitas as quais mel, própolis, larvas de abelhas e, alguns casos, as próprias abelhas eram utilizados em receitas para uso humano e/ou veterinário com o intuito de prevenir ou curar patologias (PARK *et al*, 2002).

**Figura 2** – Fragmento do papiro de Ebers, primeiro texto médico conhecido.



**Fonte:** KHALED, 2007.

Foi reconhecida por suas propriedades terapêuticas por ilustres nomes greco-romanos como Aristóteles, Dioscórides, Plínio e Galeno (CAPASSO & CASTALDO, 2002). Os gregos, entre os quais Hipócrates – considerado “pai da medicina” –, adotaram-na como cicatrizante de uso interno e externo. O historiador romano Plínio se refere ao produto apiterápico como “medicamento capaz de reduzir inchaços e aliviar dores” (IOIRISH, 1982). No século XVI, o termo própolis já era descrito na França (MARCUCCI, 1996), em 1908 foi publicado o primeiro trabalho científico acerca das suas propriedades farmacológicas e composição química (HELFENBERG, 1908) e em 1968 o resumo da primeira patente utilizando a própolis romena para a produção de loções para banho (IULIU, 1965), ambos indexados no *Chemical Abstracts*.

Na África do Sul, na guerra ao final do século XIX, foi largamente utilizada graças às suas propriedades cicatrizantes (MARCUCCI, 1996) e na Segunda Guerra Mundial foi empregada em inúmeras clínicas da antiga URSS (União das Repúblicas Socialistas Soviéticas), onde a própolis mereceu atenção especial em medicina humana e veterinária, com aplicações inclusive no tratamento da tuberculose, tendo

em vista que foram evidenciadas a recuperação do apetite e a regressão dos problemas pulmonares (IOIRISH, 1982; WOISKY *et al.*, 1994).

Desde a década de 80, ao redor do mundo, esse produto apícola vem sendo largamente empregado na medicina popular, em cosméticos e dermocosméticos, (CARVALHO, 2000; HERMANN & BRACAMONTE, 1991; RAMOS, 1995), bem como em suplementos alimentares e bebidas, como preventivo de doenças, sob variadas formas farmacêuticas (BANSKOTA *et al.*, 2001).

No Brasil, também a partir dessa década, o interesse pela própolis aumentou diante de um estudo pioneiro de Ernesto Ulrich Breyer, demonstrado em seu livro intitulado “Abelhas e saúde”, as propriedades terapêuticas do apiterápico e sua utilização como antibiótico natural (LUSTOSA, 2008). Sob essa perspectiva, por apresentar uma rica composição heterogênea de substâncias ativas, o produto vem sendo estudado cada vez mais pela comunidade científica e profissionais da saúde e tem demonstrado resultados promissores (SILVA *et al.*, 2007).

### **2.1.2 Origem botânica e variabilidade brasileira**

A análise da composição química da própolis comparada com a provável fonte vegetal é o melhor indicador da sua origem botânica. A determinação da origem geográfica e, principalmente, da procedência vegetal, se faz importante no controle de qualidade e até mesmo na padronização das amostras de própolis para uma aplicação terapêutica bem-sucedida (PARK *et al.*, 2002).

Sabe-se que a resina contida na própolis é coletada na vegetação das cercanias da colmeia (Figura 3). O espectro de voo de uma abelha *Apis mellifera* em torno da colmeia abrange um raio de cerca de 4-5 km, nessa área as abelhas campeiras coletam pólen e néctar para alimentação, como também resina para a própolis. Não são conhecidos de forma precisa quais são os fatores que direcionam a preferência das abelhas coletoras de resina por uma determinada fonte vegetal, mas o que se sabe é que elas são seletivas nesta coleta (SALATINO *et al.*, 2005; TEIXEIRA *et al.*, 2005). Acredita-se que essa escolha esteja relacionada com a atividade antimicrobiana da resina, uma vez que as abelhas utilizam a própolis como um antisséptico (SAHINLER & KAFTANOGLU, 2005), revestindo toda a superfície interna da colmeia (Figura 4), bem como envolvendo pequenos invasores que tenham morrido em seu interior, evitando que apodreçam e, como consequência, comprometam o enxame (MENEZES, 2005).

**Figura 3** – Colmeia de abelhas melíferas.



Fonte: BAMMER *et al.*, 2012.

**Figura 4** – Própolis verde produzida em Minas Gerais, confeccionada pelas abelhas a partir de resinas oriundas do alecrim-do-campo para revestir e proteger a colmeia.



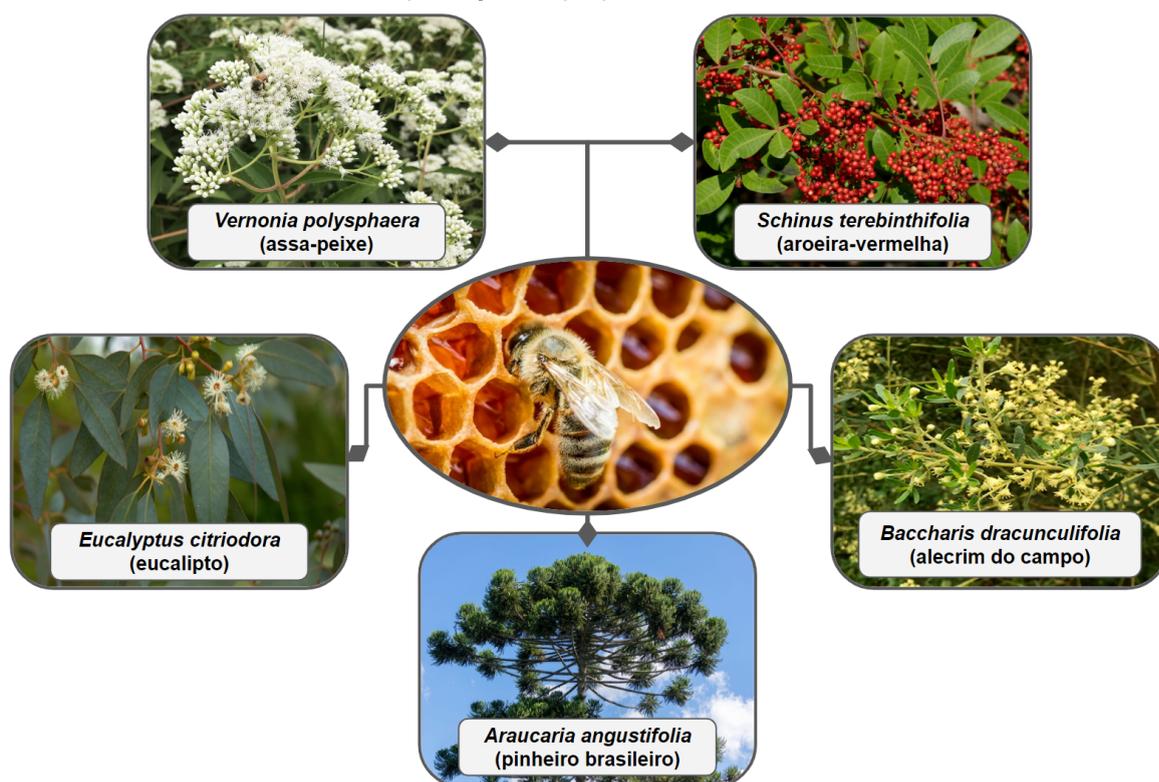
Fonte: JÚNIOR, 2019.

Em países de clima temperado da Europa e América do Norte, os vegetais produtores de própolis são poucos, sendo a principal fonte o choupo, *Populus L.*, da Família Salicaceae, podendo-se, ainda, encontrar esta espécie vegetal na Ásia e no norte da África. Entretanto, essa espécie botânica não é natural dos trópicos, como no caso do Brasil, desse modo a própolis brasileira apresenta composição química

diferente da própolis europeia e, portanto, atividades biológicas distintas (BANKOVA *et al.*, 1983; BANKOVA *et al.*, 1992; MARCUCCI, 1996).

No território brasileiro, o qual possui dimensões continentais e uma das maiores biodiversidades do planeta, existem diversas espécies vegetais para a retirada de resina. Por outro lado, nem todas matrizes foram identificadas até agora, mas a *Vernonia polysphaera* (assa-peixe), a *Schinus terebinthifolia* (aroeira-vermelha), o *Baccharis dracunculifolia* (alecrim do campo), *Araucaria angustifolia* (pinheiro brasileiro) e o *Eucalyptus citriodora* (eucalipto) são os principais exemplos de fontes vegetais onde as abelhas buscam a matéria-prima para a produção da própolis nacional (Figura 5). (BANKOVA *et al.*, 1983; BANKOVA *et al.*, 1992).

**Figura 5** – Principais exemplos de fontes vegetais as quais as abelhas buscam a matéria-prima para a produção da própolis brasileira.



Fonte: AUTOR, 2023.

Contudo, algumas substâncias presentes na própolis brasileira não foram encontradas em extratos destas plantas, sugerindo a influência de outras espécies vegetais na formação e composição da própolis (BANKOVA *et al.*, 1989). Ademais, fatores como a ecologia vegetal da região onde a própolis foi coletada (PARK *et al.*, 1995; PARK *et al.*, 1997) e até mesmo a variabilidade genética das rainhas (KOO &

PARK, 1997), também influenciam na composição química da própolis e seus diferentes aspectos (Figura 6).

**Figura 6** – Diferentes aspectos de algumas própolis brasileiras.



**A.** Própolis verde (BRP) de alecrim do campo (*Baccharis dracunculifolia*); **B.** Própolis silvestre de jurema preta; **C.** Própolis vermelha (BRV) de jacarandazinho de Maceió-AL. e **D.** Própolis marrom (BRG) de álamo do Paraná.

**Fonte:** MARCUCCI *et al.*, 2020.

Nesse âmbito, Park e colaboradores (2000) classificaram a própolis brasileira em 12 tipos, de acordo com o perfil químico obtido por meio das técnicas de espectrofotometria de absorção na região UV-visível, CCDAE (Cromatografia em Camada Delgada de Alta Eficiência) e CLAE (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência), além da avaliação das atividades antimicrobiana e antioxidante. Os autores verificaram diferenças qualitativas e quantitativas na composição química e atividades biológicas desses tipos de própolis (CASTRO *et al.*, 2007).

Após essa classificação, uma nova própolis foi descoberta em colmeias localizadas ao longo da costa litorânea e manguezais no nordeste brasileiro, catalogada como própolis do grupo 13, denominada própolis vermelha, compondo a tabela de classificação com 13 tipos brasileiros (Tabela 1). Quanto a este último, observou-se que abelhas coletavam o exsudato vermelho da superfície de *Dalbergia ecastophyllum* (L.) Taub. (Fabaceae), planta conhecida popularmente como “rabo-de-bugio” ou “marmelo-do-mangue”, sugerindo que essa seja a origem botânica da própolis vermelha, evidenciada por análises cromatográficas as quais

verificaram que os perfis das amostras de própolis e os exsudatos resinosos vermelhos apresentam grande semelhança no que diz respeito ao teor de flavonoides (DAUGSCH *et al.*, 2008).

**Tabela 1** - Classificação das própolis brasileiras de acordo com a cor do extrato etanólico e a região de origem.

<b>Grupos</b>	<b>Cor do extrato etanólico</b>	<b>Origem da própolis</b>
Grupo 1	Amarelo	Região Sul
Grupo 2	Castanho claro	
Grupo 3	Castanho escuro	
Grupo 4	Castanho claro	
Grupo 5	Marrom esverdeado	
Grupo 6	Marrom avermelhado	Região Nordeste
Grupo 7	Marrom esverdeado	
Grupo 8	Castanho escuro	
Grupo 9	Amarelo	
Grupo 10	Amarelo escuro	
Grupo 11	Amarelo	
Grupo 12	Verde ou Marrom esverdeado	Região Sudeste
Grupo 13	Vermelho	Região Nordeste

Fonte: Adaptado de PARK *et al.*, 2000.

### 2.1.3 Composição química

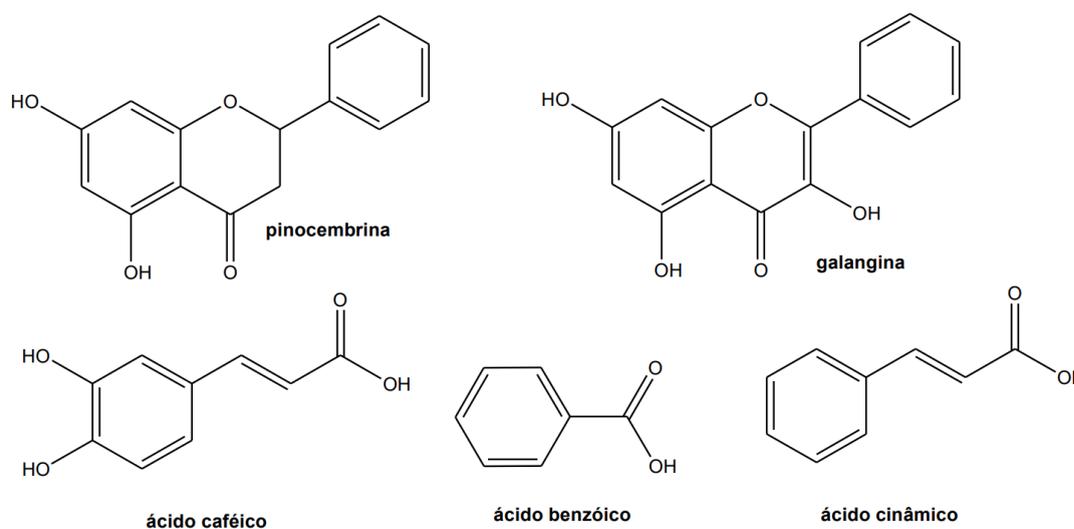
A composição química da própolis, como antes citada, é extremamente complexa e diversificada, haja vista que a mesma possui natureza multifatorial por estar relacionada com muitas variáveis ao mesmo tempo (como os fatores climáticos, geográficos e botânicos, por exemplo), tornando a caracterização detalhada um dos grandes desafios para os pesquisadores deste segmento (BANKOVA *et al.*, 1983; BANKOVA *et al.*, 1992; MARCUCCI, 1996).

No que concerne a essa pluralidade, já foi possível identificar mais de 300 substâncias presentes na própolis de diferentes localidades, dentre as quais podem

ser encontradas moléculas como: flavonoides, ácidos e ésteres aromáticos, ácidos e ésteres alifáticos, aldeídos e cetonas, terpenóides e fenilpropanóides (como os ácidos caféico e clorogênico), esteróides, aminoácidos, polissacarídeos, hidrocarbonetos e ácidos graxos, bem como vários outros componentes em menor quantidade, mas os flavonoides e os ácidos fenólicos são as classes com maior importância no que se refere às atividades biológicas presentes na própolis (HU *et al.*, 2005; HAYACIBARA *et al.*, 2005; OZKUL *et al.*, 2004; MATSUDA *et al.*, 2002; ROCHA *et al.*, 2003; PORTILHO *et al.*, 2013; FUNARI & FERRO, 2006). A presença destes diversos compostos fenólicos, sobretudo os flavonoides (o grupo fitoquímico que mais vem ganhando notoriedade dos pesquisadores), explicam, em parte, a grande variedade das propriedades farmacológicas da própolis (HAVSTEEN, 2002; BANSKOTA *et al.*, 2000).

Os principais componentes da própolis marrom e suas respectivas estruturas químicas estão ilustrados na Figura 7.

**Figura 7** – Principais compostos químicos encontrados na própolis marrom.

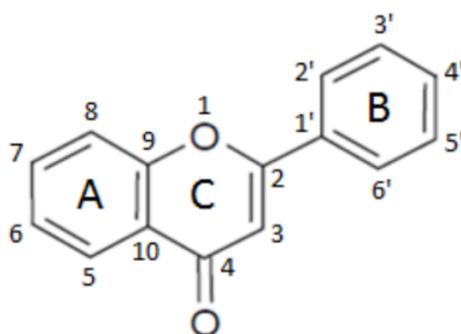


**Fonte:** OLIVEIRA & MOMESSO, 2018.

Os flavonoides são moléculas biologicamente ativas e constituem uma classe importante de polifenóis presentes com uma certa abundância entre os metabólitos secundários de plantas, sendo encontrados essencialmente nas pétalas e folhas. Representam um dos grupos fenólicos mais importantes e diversificados entre os produtos de origem vegetal. A maioria dos representantes dessa classe possui 15 átomos de carbono em seu núcleo fundamental que estão arranjados na configuração C6-C3-C6, ou seja, com dois anéis aromáticos (anéis A e B) ligados

por 3 átomos de carbono, que poderá ou não formar um terceiro anel heterocíclico do tipo pirano, designado por anel C, formando, assim, essa estrutura básica denominada flavona (Figura 8) (MATSUDA, 2006; MARKHAM, 1982; ZUANAZZI & MONTANHA, 2003; BRETT & GHICA, 2003; SEABRA *et al.*, 2006).

**Figura 8** – Estrutura química básica (flavona) dos flavonoides.

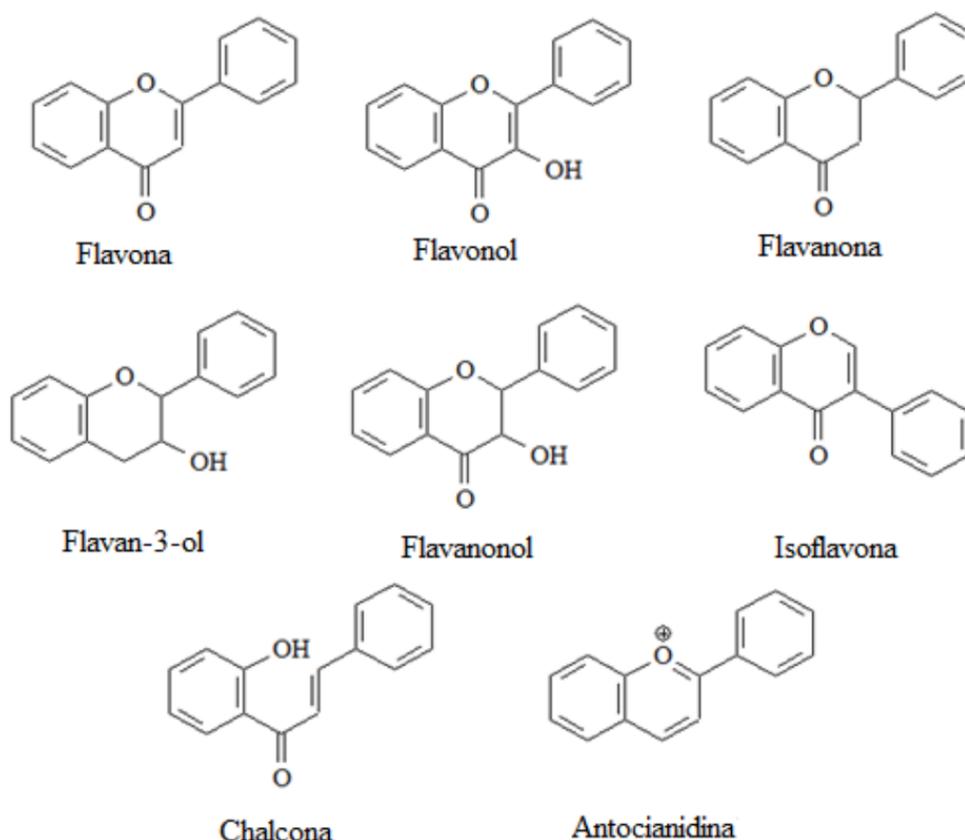


### Flavona

**Fonte:** Adaptado de PINELA, 2012.

Não obstante, os flavonoides (Figura 9) também são definidos como compostos fenólicos que compreendem um amplo grupo de substâncias naturais não sintetizadas pelos animais (BEECHER, 2003; MANACH *et al.*, 2004). Cerca de 4.000 substâncias diferentes já foram listadas como flavonoides, destacando-se apigenina, quercetina, hesperetina, rutina, luteolina, genisteina, daidzeina, antocianidina, kaempferol, dentre outros. A presença e a concentração destes compostos é utilizada como índice de qualificação de amostras de própolis, sendo as classes de flavonoides do tipo flavonas, flavonóis, diidroflavonóis, flavanonas, chalconas e diidrochalconas as mais predominantes nesse produto natural (MARCUCCI, 1996; NAGAY & GRANCAI, 1996; MENEZES, 2005; LU *et al.*, 2004).

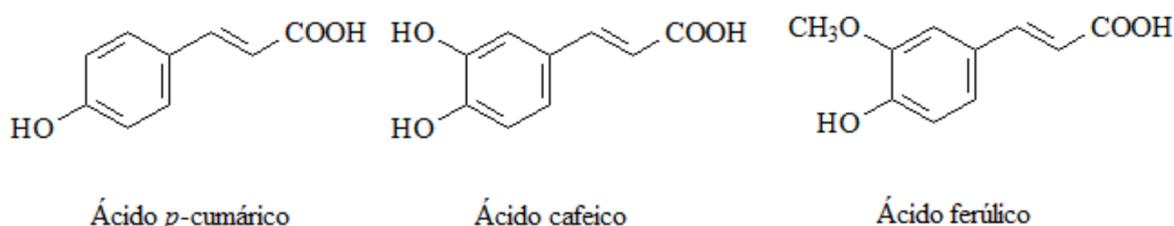
**Figura 9** – Estruturas químicas das principais classes de flavonoides.



**Fonte:** BALASUNDRAM *et al.*, 2006; COUTINHO *et al.*, 2009; MACHADO *et al.*, 2008.

Outrossim, alguns compostos fenólicos também são utilizados para estabelecer a qualidade da própolis, os quais são: ácido cumárico, ácido cafeico, ácido ferúlico (Figura 10), galangina, quercetina e, mais recentemente, artepellin-C (MATSUDA, 2006).

**Figura 10** – Ácidos fenólicos (ácido cumárico, ácido cafeico e ácido ferúlico).



**Fonte:** Adaptado de BALASUNDRAM *et al.*, 2006.

Múltiplas funções são atribuídas aos flavonoides nas plantas. Dentre elas vale ressaltar: funções de defesa, como proteção dos vegetais contra a incidência de raios UV visível e proteção contra insetos e microorganismos (fungos, vírus e bactérias); além de atrair polinizadores, conferir atividade antioxidante, auxiliar no controle dos hormônios vegetais e inibição de enzimas (ZUANAZZI, 1999).

Vale salientar que ainda que os flavonoides ocupem o cargo dos componentes de maior relevância da própolis e o grupo mais extensivamente estudado, eles não são os únicos responsáveis pelas suas atividades farmacológicas. Uma variedade de outros compostos têm sido relacionada com as propriedades medicinais do apiterápico (AWALE *et al.*, 2005).

## **2.1.4 Principais atividades farmacológicas**

### **2.1.4.1 Atividade antioxidante**

Alguns nutrientes e componentes alimentares se destacam por sua atividade antioxidante, ou seja, sua capacidade de modificar e/ou reduzir a ação oxidativa dos radicais livres – também conhecidos como espécies reativas de oxigênio (EROs) –, evitando seus efeitos nocivos ao organismo (PANZIERA *et al.*, 2011; TURECK *et al.*, 2017). O estresse oxidativo é determinado pelo desequilíbrio na produção de radicais livres (por exemplo, o  $\text{OH}^{\bullet}$ , radical hidroxil) e na eliminação deles pelos mecanismos de proteção antioxidante, podendo danificar as células ao agredir as membranas celulares, ácidos nucleicos, proteínas e polissacarídeos, o que leva à modificação funcional e ao desenvolvimento de várias patologias (VALKO *et al.*, 2007; TURECK *et al.*, 2017), tais como doenças reumáticas, neurológicas, cardiovasculares, psiquiátricas, envelhecimento precoce, osteoporose, neoplasias, diabetes e inflamação (DEVASAGAYAM *et al.*, 2004).

Apesar do corpo humano possuir mecanismos endógenos eficazes de defesa antioxidante contra o excesso de radicais livres, como por exemplo as enzimas superóxido-dismutases, catalases, peroxidases e glutatona-peroxidases (MOON & SHIBAMOTO, 2009), sabe-se que eles não são infalíveis, sendo assim, como consequência, mais radicais livres são continuamente formados (CERQUEIRA; MEDEIROS; AUGUSTO, 2007). Portanto, os antioxidantes advindos da dieta desempenham um papel essencial para uma adequada proteção antioxidante e, assim, desempenham uma importante contribuição na promoção da saúde (CERQUEIRA; MEDEIROS; AUGUSTO, 2007). Dentre os nutrientes dietéticos com efeito antioxidante, ressaltam-se as vitaminas A, C e E e os minerais zinco, manganês, cobre e selênio (ZIMMERMANN e KIRSTEN, 2008; MOON e SHIBAMOTO, 2009).

Além dos polifenóis, a própolis possui uma série de outras substâncias com a capacidade de inibir esses radicais livres em excesso do corpo humano (MARQUELE *et al.*, 2005). Vários grupos de pesquisadores relataram essa propriedade da própolis e muitos deles conseguiram isolar vários compostos que seriam capazes de agir ofertando essa ação antioxidante: (BANSKOTA *et al.*, 2000; BASNET *et al.*, 1997; CLAUS *et al.*, 2000; MORENO *et al.*, 2000; OYAIZU *et al.*, 1999; SUN *et al.*, 2000). Todos esses pesquisadores concordam em atribuir esse atributo farmacológico aos flavonoides, sobretudo ao CAPE (éster fenólico do ácido cafeico). No entanto, Russo e colaboradores (2002) descobriram que os extratos de própolis onde o CAPE foi removido continuaram a demonstrar atividade antioxidante (PEREIRA *et al.*, 2015).

Em 2009, um outro estudo, realizado por Cabral e colaboradores, concluiu que a própolis vermelha possui atividade antioxidante e antibacteriana elevadas e as subfrações obtidas são biologicamente mais ativas do que o extrato bruto. Ademais, a eliminação de EROs geradas por neutrófilos pode ser um mecanismo antioxidante da própolis levando à subsequente atividade anti-inflamatória (MORENO *et al.*, 2000; PEREIRA *et al.*, 2015).

#### **2.1.4.2 Atividade anti-inflamatória**

Uma das principais propriedades medicinais da própolis descritas na literatura científica é a anti-inflamatória. De acordo com os estudos realizados, essa capacidade se dá majoritariamente pela presença de flavonoides, sendo a galangina o mais citado deles, tendo em vista que apresenta atividade inibitória frente a lipoxigenase e a cicloxigenase (COX), as quais são fundamentais na síntese de mediadores importantes em cascatas biológicas que caracterizam a inflamação. (PINTO *et al.*, 2011).

Além da galangina, outros autores descreveram mais moléculas com a capacidade de coibir processos inflamatórios, tais como a apigenina, o ácido salicílico e o ácido ferúlico, os quais foram identificadas na própolis por Krol e colaboradores (1996) (PEREIRA *et al.*, 2015). Nesse seguimento, Mirzoeva e Calder (1996) demonstraram essa ação pelo ácido cafeico, quercetina e narigenina, como os agentes principais pelo efeito anti-inflamatório. Em estudos *in vivo* com ratos, os pesquisadores observaram supressão de prostaglandinas e leucotrienos de macrófagos peritoniais, após peritonite aguda induzida (PEREIRA *et al.*, 2015).

Outrossim, foi relatado que o CAPE tem ação anti-inflamatória ao inibir a liberação de ácido araquidônico das membranas celulares pela inibição da atividade de dois tipos de enzimas ciclooxigenase, COX-1 e COX-2. O CAPE isolado demonstrou atividade mais pronunciada que o extrato de própolis, mesmo que seja de baixa concentração. A diferença de atividade entre o extrato de própolis e o CAPE isolado se deve ao fato de o CAPE, mesmo em baixas concentrações, inibir as prostaglandinas endoperóxido sintases, enzimas responsáveis pela produção de prostaglandinas que participam de processos inflamatórios no organismo. (PINTO *et al.*, 2011; BORRELLI *et al.*, 2002).

Vale destacar também que foi demonstrado que a própolis possui ação anti-inflamatória por meio da inibição da síntese das prostaglandinas e ativação da glândula timo, contribuindo com o sistema imune graças ao estímulo da imunidade celular e da atividade fagocítica (PINTO *et al.*, 2011; KOSALEC *et al.*, 2005).

#### **2.1.4.3 Atividade antimicrobiana**

Outra atividade da própolis vastamente descrita em literatura é a antimicrobiana, a qual é subdividida em ações frente a muitos microrganismos distintos, como bactérias, fungos e vírus. O mecanismo é dado como complexo, mas uma ampla gama dos estudos indica que este efeito é explicado pelo sinergismo entre flavonóides, ácidos aromáticos e ésteres presentes na resina *in natura*. Nesse sentido, os flavonóides tidos como os mais efetivos em ação bactericida e/ou bacteriostática são a galangina, pinocembrina e pinostrombina. Além deles, ácidos cafeico e ferúlicos também contribuem para tal efeito (ADELMANN, 2005; BOSIO, 2000; MATSUDA, 2006; PEPEJNJAK, JALSENJAK, MAYSINGER, 1985).

Dessarte, vale ressaltar que todos os estudos executados com componentes isolados da própolis demonstraram que nenhuma substância sozinha tem uma atividade maior comparada ao extrato inicial total, comprovando, assim, o aspecto sinérgico entre eles (MARCUCCI, 1996; KUJUMGIEV *et al.*, 1999). Outro ponto é que foi verificado que o armazenamento da própolis, a uma temperatura de 0°C a 4°C – ou até mesmo a temperatura ambiente –, feito de 3 a 4 anos, não ocasionou redução da atividade antimicrobiana (MATSUDA, 2006; BONHEVI *et al.*, 1994).

Silva e colaboradores (2012) apontaram a atividade antimicrobiana da própolis marrom aplicada a várias bactérias gram-positivas, como *Bacillus brevis*, *B. cereus* e *B. cereus var. mycoides*, *B. megatherium*, *B. polymyxa*, *B. premilus*, *B.*

*sphaericus*, *B. subtilis*, *Cellulomonas fimi*, *Nocardia globerula*, *Leuconostoc mesenteroide*, *Micrococcus lysodeikticus*, *Sarcina lutea*, *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus faecalis*, assim como a bactérias gram-negativas como *Aerobacter aerogenes*, *Alcaligenes spp.*, *Bordetella bronchiseptica*, *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Serratia marscescens*. (OLIVEIRA & MOMESSO, 2018; SILVA et al., 2012). Além disso, a própolis tem mostrado eficácia contra bactérias resistentes a antibióticos, como no caso da MRSA (*Staphylococcus aureus* resistente à metilina) (OLIVEIRA et al., 2020).

Na tabela 2 são listadas algumas espécies de microrganismos de importância sanitária, citados em literatura científica, como suscetíveis à ação antimicrobiana proveniente de diferentes extratos de própolis (PEREIRA et al., 2015).

**Tabela 2** - Relação de microrganismos de importância sanitária que se apresentaram susceptíveis aos efeitos de tratamentos realizados com extratos de própolis.

BACTÉRIA	IMPORTÂNCIA	FONTE BIBLIOGRÁFICA
<i>Aerobacter aerogenes</i>	Infecções nosocomiais; infecções oportunistas	Adelmann, (2005)
<i>Alcaligenes sp.</i>	Septicemia hospitalar em pacientes imunocomprometidos	Adelmann, (2005)
<i>Bacillus brevis</i>	Oxida monóxido de carbono aerobicamente; raramente associado a doenças infecciosas	Adelmann, (2005)
<i>Bacillus cereus</i>	Compete com outros microrganismos, tais como a <i>Salmonella</i> e a <i>Campylobacter</i> no intestino; Causa intoxicação alimentar	Adelmann, (2005)
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	Pertússis ou coqueluche	Adelmann, (2005)
<i>Branhamella catarrhalis</i>	Meningite, pericardite e pneumonia	Langoni et al., (1994); Fernandes JR. et al., (1995, 1997); Nieva Moreno et al., (1999);
<i>Escherichia coli</i>	Gastroenterites; Apendicite; Meningite; Septicemia	Castaldo; Capasso (2002); Langoni et al. (1996), Pinto et al. (2001, 2003); Franesi (2007)
<i>Enterococcus faecalis</i>	Infecção urinária, meningite e bacteriemia	Lu et al., (2005); Marcucci et al., (2001); Oliveira et al., (2006); Packer; Luz, (2007)
<i>Helicobacter pylori</i>	Gastrite, doença ulcerosa péptica, adenocarcinoma gástrico e linfoma gástrico de baixo grau	Banskota et al. (2001); Boyanova et al. (2005)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Bactéria hospitalar, potencializada em hospedeiros com baixa imunidade	Castaldo; Capasso (2002)

<i>Micrococcus luteus</i>	Bactéria hospitalar, potencializada em hospedeiros com baixa imunidade	Franesi (2007)
<i>Pasteurella multocida</i>	Infecções enzoóticas em humanos e animais	Garcia et.al., (2004)
<i>Proteus mirabilis</i>	Infecção do trato urinário	Vargas et al. (2004)
<i>Proteus vulgaris</i>	Infecções do trato urinário	Adelmann, 2005; Castaldo e Capasso (2002)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Bactéria hospitalar, potencializada em hospedeiros com baixa imunidade	Lu et al., (2005); Marcucci et al., (2001); Oliveira et al., (2006); Packer; Luz, (2007)
<i>Rhodococcus equi</i>	Pneumonia necrotizante	Vargas et al. (2004)
<i>Salmonella sp.</i>	Infecções sistêmicas; febre tifóide; gastroenterite	Orsi et al., (2005); Vargas et al. (2004)
<i>Sarcina lutea</i>	Microbiota da pele de mamíferos; responsáveis pelo odor corporal	Adelmann, (2005)
<i>Serratia marcescens</i>	Infecções hospitalares e urinárias	Rojas, (1989); Grange; Davey, (1990); Nieva Moreno et al., (1999)
<i>Staphylococcus aureus</i>	Endocardite; Osteomielite; Pneumonia	Marcucci et al., (2001);
<i>Streptococcus pyogenes</i>	Faringite; celulite; Fasciite necrosante	Lu et al., (2005); Marcucci et al., (2001); Oliveira et al., (2006); Packer; Luz, (2007)
<i>Streptococcus mutans</i>	Desenvolvimento de cáries	Adelmann, (2005)
<b>FUNGO</b>	<b>IMPORTÂNCIA</b>	<b>FONTE BIBLIOGRÁFICA</b>
<i>Aspergillus flavus</i>	Infecções oportunistas como a aspergilose (colonização das vias e do trato respiratório) e alergias respiratórias.	Ghaly et. al. (1998)
<i>Candida tropicalis</i>	Candidíase	Sforcin et al., (2001)
<i>Candida albicans</i>	Candidíase	Sforcin et al., (2001)
<i>Geothrichum candidum</i>	Infecções pulmonares ou brônco pulmonares	Grange; Davey, (1990); Fernandes JR. et al., (1995, 1997); Tosi et al., (1996); Nieva Moreno et al., (1999);
<i>Micrococcus lysodeikticus</i>	Microbiota da pele de mamíferos	Adelmann, (2005)
<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	Dermatofitoses no couro cabeludo	Siqueira (2008)
<i>Trichophyton rubrum</i>	Causador de dermatomicoses superficiais	Franesi (2007)
<i>Trichophyton tonsurans</i>	Fungo dermatófito	Siqueira (2008)

**Fonte:** Adaptado de PEREIRA et al., 2015.

Cabe mencionar também que o apiterápico tem demonstrado atividade antimicrobiana contra fungos. Segundo a revisão realizada por Sawicka *et al.* (2020), a própolis tem mostrado atividade contra diversas espécies de fungos, incluindo *Candida albicans*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus fumigatus*, *Fusarium solani* e *Trichophyton rubrum*. A própolis tem sido empregada no tratamento de infecções fúngicas, como a candidíase oral e vaginal (SAWICKA *et al.*, 2020; AL-WAILI, 2012; SOUZA *et al.*, 2020).

Ela tem mostrado atividade contra diferentes espécies de *Candida*, que podem causar infecções fúngicas em humanos, como *Candida albicans* e *Candida glabrata*, principalmente em indivíduos com sistema imunológico comprometido (SILVA *et al.*, 2018; MOREIRA *et al.*, 2016).

No que se refere à atividade antiviral, a própolis tem sido estudada como um possível agente terapêutico contra diferentes tipos de vírus, incluindo o vírus da herpes, o vírus da gripe e o vírus da imunodeficiência humana (HIV) (PAULINO *et al.*, 2018). Estudos *in vitro* demonstraram que a própolis é capaz de inibir a replicação do vírus da herpes simplex tipo 1 e tipo 2, bem como o vírus da gripe A e B (ORSI *et al.*, 2011; SHIMIZU *et al.*, 2016). Ainda, o apiterápico também apresentou atividade contra o HIV, inibindo a entrada do vírus nas células e a produção de novas partículas virais (NAGAI *et al.*, 2002).

Acatando tais premissas, infere-se que a própolis tem demonstrado atividade antimicrobiana contra bactérias, fungos e vírus, sendo potencialmente útil no tratamento de infecções causadas por esses microrganismos. No entanto, mais estudos são necessários para elucidar os mecanismos de ação da própolis e otimizar seu uso como agente antimicrobiano.

#### **2.1.4.4 Atividade antineoplásica**

Nos últimos anos, uma das propriedades terapêuticas de maior destaque relacionadas aos diferentes tipos de própolis, é a antineoplásica (anticarcinogênica, antitumoral). Estudos têm demonstrado que compostos presentes na própolis são capazes de inibir o crescimento de células tumorais, além de possuir propriedades antiangiogênicas e pró-apoptóticas (MATSUDA, 2006; KIMOTO *et al.*, 1998).

O artepillin-C (ácido 3, 5-diprenil-4-hidroxicinâmico), um composto isolado da própolis, demonstrou efeitos citotóxicos em células cancerígenas tanto *in vivo* quanto *in vitro* (MATSUNO, 1997). Foi constatado que o artepillin-C induz

citotoxicidade em tumores e células de leucemia. A mitose abortiva, apoptose, também foi confirmada por estudos histopatológicos (MATSUDA, 2006; KIMOTO et al., 1998).

Um estudo *in vitro* avaliou o potencial antitumoral da própolis brasileira em células de câncer de mama humano e verificou uma redução significativa no crescimento das células cancerosas tratadas com própolis em comparação com o grupo controle. Além disso, a própolis foi capaz de induzir a apoptose das células cancerosas, demonstrando um potencial terapêutico promissor para o câncer de mama (DE MORAES *et al.*, 2019).

Outro estudo avaliou a atividade antineoplásica da própolis vermelha em células de câncer de próstata humano. Os resultados indicaram que a própolis foi capaz de inibir o crescimento celular em diferentes linhagens de câncer de próstata, além de induzir a apoptose das células cancerosas, demonstrando seu potencial terapêutico para o câncer de próstata (AMARAL-MACHADO *et al.*, 2018).

A atividade antitumoral da própolis também foi investigada em estudos *in vivo*. Em um estudo em camundongos com câncer de pulmão, a própolis verde brasileira foi administrada por via oral e resultou em uma redução significativa no crescimento tumoral, além de um aumento na sobrevivência dos animais (JUNQUEIRA *et al.*, 2018).

Outro ponto relevante, é que esse produto apícola tem sido estudado como um adjuvante no tratamento do câncer. Um estudo clínico randomizado avaliou o efeito da suplementação de própolis em pacientes com câncer de mama submetidas à quimioterapia. Os resultados indicaram que a suplementação de própolis reduziu a toxicidade da quimioterapia, melhorou a qualidade de vida e aumentou a sobrevivência das pacientes (MOURA *et al.*, 2018). No entanto, são necessários mais estudos para avaliar a eficácia e segurança da própolis como terapia adjuvante no tratamento do câncer em humanos.

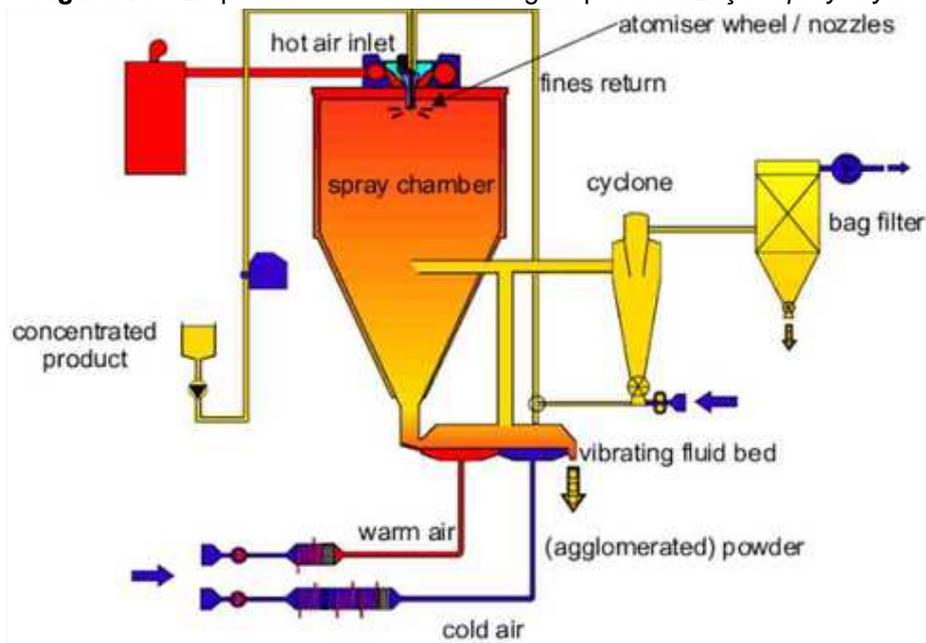
## **2.2 Secagem por atomização *spray-dryer***

### **2.2.1 A técnica**

A técnica de secagem por atomização *spray-dryer* (Figura 11), termo em inglês para se referir à secagem por aspersão (ou, ainda, pulverização), é amplamente utilizada na indústria farmacêutica e alimentícia para proteger compostos bioativos, como vitaminas, ácidos graxos e enzimas, contra condições

adversas, como luz, oxigênio e umidade, além de melhorar sua estabilidade, solubilidade e biodisponibilidade. A técnica foi desenvolvida na década de 1930 para a produção de leite em pó e, desde então, tem sido aprimorada e aplicada em uma variedade de materiais (BOURGES *et al.*, 2021).

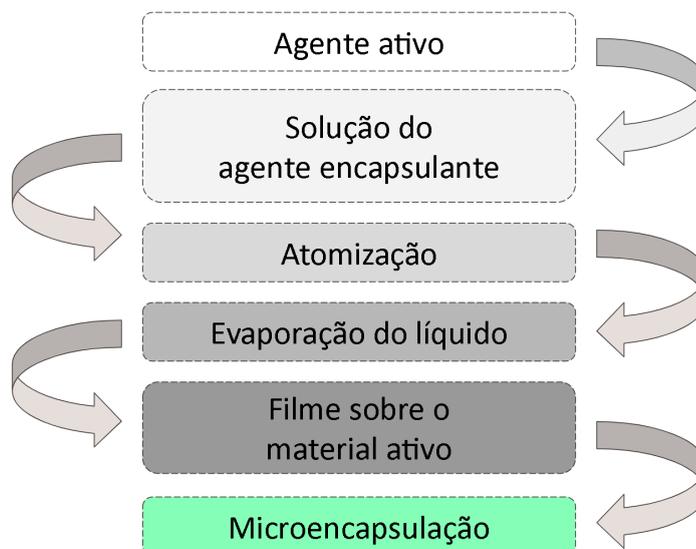
**Figura 11** – Esquema da técnica de secagem por atomização *spray-dryer*.



Fonte: VERSCHUEREN *et al.*, 2007.

O processo de secagem por *spray-dryer* envolve a dispersão de uma solução, suspensão ou emulsão, no qual o agente ativo é colocado em contato com uma solução do agente encapsulante e por processo de atomização, em uma corrente de ar quente em alta velocidade dentro do secador, faz com que o líquido seja evaporado instantaneamente, transformando gotículas em partículas sólidas de tamanho micronano, ficando um filme sobre o material ativo (ADHIKARI *et al.*, 2021; BRASILEIRO, 2011) (Figura 12). O tamanho, a forma, a densidade e as propriedades de superfície das partículas podem ser controlados pela variação dos parâmetros do processo, como temperatura, umidade, taxa de alimentação, vazão de ar e composição da solução de encapsulação (BOURGES *et al.*, 2021).

**Figura 12** – Etapas de funcionamento da técnica de *spray-drying*.



**Fonte:** AUTOR, 2023.

Na indústria farmacêutica, a técnica de secagem por atomização *spray-dryer* tem sido usada para melhorar a estabilidade de medicamentos, como antibióticos, hormônios e vacinas, e prolongar sua liberação no organismo. Por exemplo, a encapsulação de insulina em partículas por *spray-dryer*, realizada por Kuang e colaboradores (2018), aumentou sua estabilidade em solução aquosa e permitiu uma liberação mais lenta e controlada do hormônio no sangue (KUANG *et al.*, 2018). Na indústria alimentícia, a técnica é usada para proteger nutrientes sensíveis, como vitaminas e ácidos graxos, em produtos alimentícios, como leite em pó, bebidas energéticas e barras de cereais, melhorando assim a qualidade nutricional desses alimentos (ADHIKARI *et al.*, 2021).

Uma das principais vantagens da técnica de secagem por atomização *spray-dryer* é sua capacidade de proteger compostos bioativos contra condições adversas, como luz, oxigênio e umidade, que podem causar sua degradação e perda de atividade biológica. Além disso, a técnica permite uma melhor solubilidade e biodisponibilidade dos compostos, o que pode levar a uma maior absorção e eficácia no organismo (BOURGES *et al.*, 2021). A técnica de secagem por atomização *spray-dryer* também é escalável e pode ser adaptada para diferentes materiais e aplicações industriais (ADHIKARI *et al.*, 2021).

Em suma, a técnica de secagem por atomização *spray-dryer* é uma técnica promissora para a proteção e liberação controlada de compostos bioativos na indústria farmacêutica e alimentícia. Seus fundamentos e aplicações têm sido

amplamente estudados e aprimorados, resultando em uma variedade de produtos comerciais que utilizam essa técnica de encapsulação.

### **2.2.2 Aplicações usando a própolis**

Existem diversos trabalhos que demonstram o uso da técnica de *spray-drying* para encapsular extrato de própolis. Um exemplo é o estudo de Almeida *et al.* (2018), o qual utilizou a técnica para encapsular extrato de própolis vermelha. Os autores investigaram a influência de diferentes tipos de agentes encapsulantes na estabilidade e na liberação do extrato de própolis. Os resultados indicaram que a encapsulação por *spray-drying* melhorou significativamente a estabilidade do extrato de própolis e a liberação dos compostos bioativos, aumentando assim sua aplicabilidade em formulações farmacêuticas e alimentícias (ALMEIDA *et al.*, 2018).

Outro estudo relevante foi realizado por Valderrama *et al.* (2019), que investigaram a influência da concentração do agente encapsulante e do tipo de aditivo alimentar na encapsulação por *spray-drying* de extrato de própolis verde. Os autores verificaram que a aplicação dessa técnica resultou em um aumento da solubilidade e da estabilidade do extrato de própolis, além de manter sua atividade antioxidante (VALDERRAMA *et al.*, 2019).

Em outro estudo, Santos *et al.* (2020) avaliaram a influência da temperatura de entrada do ar quente e da concentração de maltodextrina na encapsulação por *spray-dryer* de extrato de própolis marrom. Os resultados indicaram que a encapsulação por *spray-dryer* foi eficiente na proteção do extrato de própolis contra a degradação e na liberação controlada dos compostos bioativos (SANTOS *et al.*, 2020).

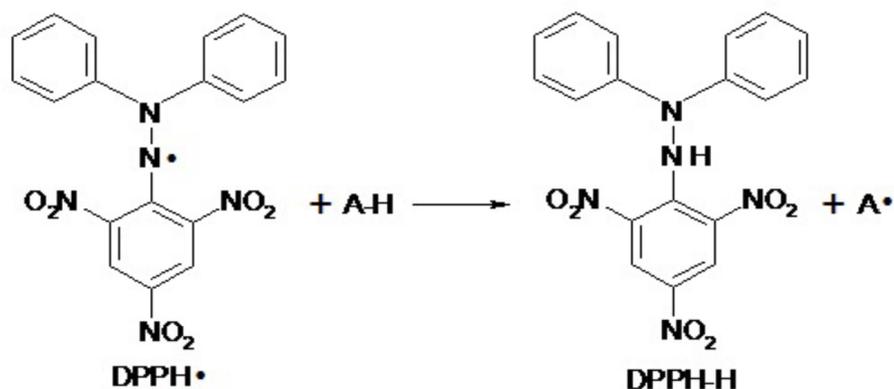
Depreende-se, portanto, que a técnica de *spray-drying* tem sido amplamente utilizada na encapsulação de extrato de própolis, resultando em melhorias significativas na estabilidade, solubilidade e liberação controlada dos compostos bioativos. Diversos estudos têm sido realizados para otimizar as condições de encapsulação, avaliar a influência de diferentes agentes encapsulantes e aditivos alimentares, e explorar novas aplicações na indústria farmacêutica e alimentícia.

## 2.3 Técnicas aplicadas à caracterização físico-química dos sistemas microparticulados

### 2.3.1 Atividade antioxidante pelo sequestro de radicais livres DPPH•

A técnica de atividade antioxidante pelo método DPPH• (1,1-difenil-2-picril-hidrazil) é amplamente utilizada para avaliar a capacidade de compostos em neutralizar radicais livres. Quando o DPPH•, um radical livre estável de cor púrpura, entra em contato com um agente antioxidante, ocorre a transferência de elétrons (Figura 13), resultando na redução do radical e na mudança de cor para amarelo. Essa reação é baseada no princípio da captura de radicais livres, em que o agente antioxidante doa elétrons para o radical DPPH•, inibindo a sua atividade oxidativa. A intensidade da mudança de cor está relacionada à capacidade antioxidante do composto em teste (BRAND-WILLIAMS *et al.*, 1995; MOLYNEUX, 2004).

**Figura 13** – Mecanismos de reação entre o radical DPPH• e um antioxidante através da transferência de um átomo de hidrogênio.



Fonte: OLIVEIRA, 2015.

Segundo estudos realizados por Brand-Williams *et al.* (1995) e Molyneux (2004), a técnica de DPPH• é amplamente utilizada devido à sua simplicidade, baixo custo e alta sensibilidade. A reação ocorre rapidamente e a leitura da absorbância da solução é realizada em um comprimento de onda específico, geralmente entre 515 e 517 nm. A capacidade antioxidante é expressa em termos de porcentagem de inibição do radical DPPH• pelo composto em teste, calculada pela seguinte equação:

% Inibição = [(Absorbância controle ( ou branco) - Absorbância amostra) / Absorbância controle] × 100

Essa técnica tem sido amplamente utilizada na avaliação da atividade antioxidante de diversos compostos, incluindo extratos vegetais, alimentos, produtos farmacêuticos e cosméticos. Através da determinação da atividade antioxidante, é possível avaliar o potencial de proteção contra danos oxidativos e identificar compostos com propriedades antioxidantes relevantes.

### **2.3.2 Determinação do teor de fenóis totais pelo método de *Folin-Ciocalteu***

O ensaio *Folin-Ciocalteu* (SINGLETON *et al.*, 1999), também conhecido como ensaio de fenóis totais, é um dos mais antigos métodos de quantificação de fenóis em uma amostra. A técnica é baseada na capacidade dos compostos fenólicos em reduzir o reagente *Folin-Ciocalteu*, formando um complexo de cor azul, que pode ser quantificado por espectrofotometria. O método é rápido, sensível e possui baixo custo em relação a outras técnicas. Além disso, a metodologia apresenta boa reprodutibilidade e precisão, o que garante resultados confiáveis, podendo ser aplicado em diversas matrizes (CAZAROLLI *et al.*, 2008).

### **2.3.3 Determinação do teor de flavonoides totais**

Para a determinação do teor de flavonoides totais, foi adotada a metodologia baseada na reação com cloreto de alumínio ( $AlCl_3$ ), a qual é amplamente utilizada no âmbito científico. Nesse método, ocorre a formação de complexos coloridos entre os flavonoides presentes na amostra e o íon alumínio ( $Al^{3+}$ ). Os complexos formados entre os flavonoides e o cloreto de alumínio são estáveis e apresentam uma intensidade de cor proporcional à quantidade de flavonoides presentes na amostra. Esses complexos são detectados por meio de espectrofotometria, que permite a medição da absorbância em um comprimento de onda específico. A leitura da absorbância é relacionada com uma curva de calibração previamente estabelecida com padrões de flavonoides conhecidos (GHASEMI *et al.*, 2018; GHAZANFARI *et al.*, 2017).

### 2.3.4 Espectroscopia UV-Vis

A técnica de espectroscopia UV-Vis (Ultravioleta-Visível) é amplamente utilizada na análise de compostos orgânicos e inorgânicos. A absorção de radiação eletromagnética na faixa UV-Vis está relacionada à transição eletrônica dos elétrons de valência dos compostos. Essa técnica fornece informações sobre a estrutura eletrônica dos materiais, permitindo a identificação de substâncias e a determinação de sua concentração em soluções (SANTOS *et al.*, 2017).

A interpretação dos espectros UV-Vis permite obter informações sobre a estrutura química dos compostos. Por exemplo, a presença de grupos cromóforos, como grupos conjugados ou de transferência de carga, pode resultar em bandas de absorção específicas em determinadas regiões do espectro. Essas informações podem ser usadas na análise e caracterização de amostras. Além disso, a espectroscopia UV-Vis também é utilizada na determinação quantitativa de substâncias, permitindo a construção de curvas de calibração e o cálculo de concentrações de amostras desconhecidas. Com sua simplicidade, versatilidade e sensibilidade, a espectroscopia UV-Vis é uma ferramenta valiosa na pesquisa científica e no controle de qualidade de produtos (SANTOS *et al.*, 2017).

### 2.3.5 Infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)

A técnica de espectroscopia por transformada de Fourier (FTIR, do inglês *Fourier Transform Infrared Spectroscopy*) é uma poderosa ferramenta analítica utilizada para a identificação e caracterização de compostos químicos. Baseada na interação entre a radiação infravermelha e as moléculas da amostra, a espectroscopia FTIR permite a análise das vibrações moleculares, fornecendo informações sobre a estrutura química dos compostos. A técnica é amplamente empregada em diversas áreas, como química, farmácia, biologia e ciências dos materiais, devido à sua alta sensibilidade e especificidade (SILVERSTEIN; BASSLER; MORRILL, 1994; SILVA *et al.*, 2019).

A espectroscopia FTIR opera no espectro infravermelho, abrangendo regiões de baixa frequência (longo comprimento de onda) associadas a vibrações moleculares fundamentais. Durante a análise, a amostra é exposta a um feixe de radiação infravermelha, que interage com as ligações químicas presentes nos compostos. As vibrações moleculares ocorrem em diferentes modos, como

estiramento e flexão de ligações, e cada tipo de ligação possui frequências características. Ao medir as mudanças na intensidade da radiação infravermelha transmitida, é possível obter um espectro de absorção único para cada composto. A interpretação desses espectros permite identificar as ligações químicas presentes na amostra e auxiliar na análise qualitativa e quantitativa (SILVERSTEIN; BASSLER; MORRILL, 1994; SILVA *et al.*, 2019).

### **2.3.6 Análise termogravimétrica (TG)**

A aplicação da termogravimetria na indústria farmacêutica é descrita em termos de caracterização, determinação de pureza e umidade, identificação de pseudopolimorfismo, avaliação da estabilidade de medicamentos e fármacos e estudo da dinâmica de degradação de fármacos (PEREIRA, 2013; OLIVEIRA *et al.*, 2011).

Nas curvas termogravimétricas, os degraus relacionados ao eixo das ordenadas representam as variações de massa que a amostra sofreu durante a análise e possibilitam a coleta de dados que podem ser utilizados para fins quantitativos (ALVES, 2007). A TG é um método analítico rápido e reprodutível que produz dados quantitativos e qualitativos. Pode ser aplicada tanto na melhoria do produto acabado quanto no controle de qualidade de produtos farmacêuticos (PEREIRA, 2013; ARAGÃO *et al.*, 2006).

### **2.3.7 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)**

A técnica de microscopia eletrônica de varredura (MEV) é uma poderosa ferramenta de análise microestrutural que permite a visualização e caracterização de amostras com alta resolução. A MEV utiliza um feixe de elétrons focalizado para varrer a superfície da amostra, gerando imagens de alta resolução em escala micrométrica. A técnica de MEV possui várias aplicações, tais como análise de superfícies de materiais, estudos de fraturas, análise de microestrutura de metais, observação de células biológicas e análise de partículas em ciências ambientais (SILVA *et al.*, 2018; COSTA, 2016).

Durante a análise por MEV, a amostra é preparada e colocada em uma câmara de vácuo para evitar a dispersão dos elétrons pelo ar. Em seguida, um feixe de elétrons é direcionado para a superfície da amostra, causando interações com os elétrons presentes nela. Essas interações geram sinais detectados e convertidos em

imagens, permitindo a visualização da topografia e textura da amostra. Além disso, a MEV também pode ser combinada com análises complementares, como análise de composição química por espectroscopia de energia dispersiva de raios-X (EDS), para fornecer informações adicionais sobre a amostra (SILVA *et al.*, 2018; COSTA, 2016).

### **2.3.8 Ensaio de dissolução *in vitro***

O processo pelo qual uma substância sólida é dissolvida na presença de um solvente é conhecido como dissolução. Semelhante a isso, para que um medicamento seja absorvido pelo corpo, inicialmente é necessário que ocorra a dissolução, ou seja, o fármaco liberado de sua forma farmacêutica em um fluido biológico (OLIVEIRA, 2019; ALLEN *et al.*, 2013).

O teste de dissolução é um teste físico *in vitro* que utiliza aparelhagem específica e condições experimentais controladas – como pH do meio, temperatura e rotação –, para avaliar a quantidade de fármaco liberada no meio de dissolução. Originalmente destinado para formas farmacêuticas sólidas de uso oral e liberação instantânea, mas na atualidade pode ser usado com uma variedade de formas de farmacêuticas sólidas e semi-sólidas, bem como sistemas de liberação controlada (OLIVEIRA, 2019; BROWN *et al.*, 2011; BRASIL, 2010).

O ensaio de dissolução *in vitro* é essencial na avaliação da biodisponibilidade de medicamentos, pois a dissolução é um passo crítico para que o fármaco seja absorvido pelo organismo. Além disso, esse ensaio também é utilizado para comparar diferentes formulações de medicamentos, realizar estudos de estabilidade e bioequivalência, e auxiliar no desenvolvimento de formas farmacêuticas mais eficazes. A padronização desse ensaio é regulamentada por agências regulatórias, como a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), garantindo a qualidade e a segurança dos medicamentos (SOUZA *et al.*, 2019).

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Geral

Desenvolver e caracterizar sistemas microparticulados contendo extrato etanólico de própolis marrom (EPPM) do município de União dos Palmares/AL, visando produção em nível semi industrial.

#### 3.2 Específicos

- Obter sistemas microparticulados contendo extrato de própolis marrom da região do município de União dos Palmares-AL pela técnica de *spray-dryer* em diferentes concentrações de extrato;
- Avaliar composições microparticuladas obtidas usando diferentes técnicas como microscopia eletrônica de varredura (MEV), ultravioleta visível (UV-vis), infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) e análise termogravimétrica (TG);
- Determinar o teor de fenóis e flavonóides totais dos sistemas microparticulados contendo extrato da própolis marrom;
- Mensurar a atividade antioxidante pela capacidade de sequestro de radicais livres DPPH●;
- Avaliar o perfil de dissolução *in vitro* das micropartículas obtidas em diferentes meios.

### 4 METODOLOGIA

#### 4.1 Obtenção do extrato hidroalcoólico de própolis marrom

A fim de se ter um aproveitamento ideal das atividades farmacológicas provenientes dos componentes da própolis, ela passa por extrações aquosas e alcoólicas. O padrão oficial para obtenção do extrato etanólico de própolis marrom (EPPM) foi seguido para orientar o processo.

No mês de julho de 2019, a empresa apícola Zumbi dos Palmares doou o extrato hidroalcoólico a 17% (p/v) de própolis marrom, o qual foi armazenado em frasco de vidro âmbar para posteriores análises. A seguir estão descritas as diversas etapas do processo de extração da própolis utilizadas neste trabalho. Vale salientar

que este é o processo costumeiramente adotado pelas empresas apícolas para se obter extratos etanólicos de própolis.

## **4.2 Preparação dos sistemas microparticulados**

Inicialmente, foi preparada uma formulação composta por 60% de extrato de própolis marrom, 29% de gelatina e 6,33% de amido, tendo estes a função de diluente e, sobretudo, a de revestimento (ALMEIDA *et al.*, 2018; VALDERRAMA *et al.*, 2019). A preparação envolveu a solubilização de 29 g de gelatina em água destilada aquecida (40°C), a qual foi adicionado 6,33 g de amido até finalizar o processo de solubilização. Em seguida, 60 g de extrato de própolis marrom foi gradualmente misturado à solução de gelatina + amido. Mediante homogeneização, adicionou-se, ainda, 4,67 g de dióxido de silício coloidal (Aerosil®) a fim de melhorar a fluidez do pó no *spray-dryer* resultante da secagem desta formulação. Todo o procedimento foi conduzido sob agitação magnética contínua de 1700 rpm (rotações por minuto).

Para se obter os sistemas microparticulados, foi empregado um jato de ar comprimido por meio do *Mini Spray Dryer* modelo B-290. Utilizando uma bomba peristáltica, foi realizada a alimentação da solução de secagem. As condições de secagem incluíram pressão do soprador de 2,4 bar, temperatura de entrada de 180°C, temperatura de saída de 105°C, além de vazão volumétrica de 10,7 mL/h para a bomba peristáltica.

## **4.3 Análise do potencial antioxidante utilizando sequestro de radical DPPH•**

### **4.3.1 Preparação da solução de DPPH• 4mM**

A análise do potencial antioxidante por meio do teste químico de DPPH• consistiu em uma adaptação do método apresentado por Brand-Williams; Cuvelier; Berset (1995), sendo realizado com o fito de se medir a capacidade de sequestro de radicais DPPH•. Para tanto, foi utilizada balança analítica para pesar 0,004 mMol do radical, que posteriormente foi diluído em 100 mL de etanol absoluto para formar uma solução estoque com concentração de 0,04 mg/mL do radical, a qual foi acondicionada em refrigeração, sub abrigo da luz. O radical DPPH• possui tonalidade violeta quando dissolvido em solução etanólica.

### 4.3.2 Teor de sólidos solúveis no extrato etanólico

Foi medido 1 mL de extrato comercial de própolis marrom e colocado em uma balança de infravermelho a fim de se determinar a quantidade de sólidos solúveis durante 15 minutos a uma temperatura de 115°C. As estimativas baseadas no rendimento de 87,92% indicaram uma concentração de 12,8 mg/mL de sólidos solúveis. Uma alíquota de 103,5 µL do EEPM foi então retirada e diluída em etanol absoluto para produzir uma solução estoque com concentração de 2,5 mg/mL.

### 4.3.3 Leitura das medidas de absorvância das amostras

Em seguida, foram pipetados diferentes volumes da solução estoque do extrato de própolis marrom (10, 20, 40, 60, 100, 150 µL), adicionando-se 2 mL de solução de DPPH● para balão de 5 mL, completando seu volume com etanol, adquirindo as respectivas concentrações (5,10, 20, 30, 50 e 75 µg/mL). Depois de 30 minutos em repouso, protegido da luz, foi realizada a medição das absorvâncias em espectrofotômetro UV-Vis (Modelo *Shimadzu UVmini-1240*) em modo fotometria com comprimento de onda ( $\lambda$ ) de 518 nm. A partir desses resultados, a capacidade antioxidante foi expressa em termos de porcentagem de inibição do radical DPPH● pelo composto em teste, calculada pela seguinte equação (BRAND-WILLIAMS *et al.*, 1995; MOLYNEUX, 2004).:

$$\% \text{ Inibição} = \frac{[(\text{Absorvância controle ( ou branco)} - \text{Absorvância amostra}) / \text{Absorvância controle}] \times 100}$$

## 4.4 Determinação do Teor de Fenóis Totais

### 4.4.1 Construção da curva de calibração do ácido gálico

Foi preparada uma solução de carbonato de sódio ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) a 15% (p/v) em água, com volume final de 100 mL. Posteriormente, foi preparada uma solução de ácido gálico em concentração de 1 mg/mL em água, completando-se o balão com água para um volume final de 10 mL. Depois dessa etapa, adicionou-se 250 µL de solução de *Folin-Ciocalteu* em 3 mL de água destilada e os diferentes volumes de ácido gálico para se obter concentrações finais de 2, 4, 5, 6, 8, 10 µg/mL, sob agitação por 1 minuto em um balão volumétrico de 5 mL. Passado o tempo, transferiu-se 1 mL de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , agitando-se por mais 30 segundos e depois

completou-se o balão com água destilada até a marca de 5 mL, agitando novamente por 30 segundos. Para que ocorresse a oxidação completa de fenóis, a reação ocorreu em completa escuridão por duas horas. O ensaio foi realizado três vezes. É notada a alteração de coloração, de marrom esverdeado para azul. A leitura foi realizada em espectrofotômetro UV-Vis, no comprimento de onda de 750 nm. O método dos mínimos quadrados foi adotado para determinar a equação da reta (SINGLETON *et al.*, 1999; CAZAROLLI *et al.*, 2008).

#### **4.4.2 Teor de fenóis totais dos sistemas microparticulados e do extrato da própolis marrom**

As alíquotas foram retiradas da mesma solução estoque usada anteriormente. Uma a uma, em concentrações distintas (50; 37,5; 25 µg/mL), foram então transferidas para um balão de 5 mL com 250 µL de *Folin-Ciocalteu* e 3 mL de água destilada, agitando-se por 1 minuto. Seguiu-se a adição de 1 mL de solução de carbonato de cálcio, agitando por 30 segundos, aferindo o balão com água destilada e agitando novamente por 30 segundos. A reação de oxidação dos fenóis presentes na amostra ocorreu após 2 horas no escuro. O espectrofotômetro foi usado para fazer a leitura em um comprimento de onda de 750 nm. Todo o experimento foi executado em triplicada. O método dos mínimos quadrados foi adotado para determinar a equação da reta (SINGLETON *et al.*, 1999; CAZAROLLI *et al.*, 2008).

#### **4.5 Determinação do Teor de Flavonoides Totais**

##### **4.5.1 Construção da curva de calibração quercetina**

Devido sua presença na vasta composição da própolis, foi escolhido o flavonoide quercetina (C<sub>15</sub>H<sub>10</sub>O<sub>7</sub>), em várias concentrações, para criar uma curva padrão de calibração. De início, foi preparada uma solução de cloreto de alumínio a 5%. 9,05 g de cloreto de alumínio hexahidratado foram pesados e solubilizados em metanol. Em seguida, 0,0159 mg de quercetina foi dissolvido em metanol para criar uma segunda solução de quercetina. Foram preparadas diferentes concentrações para quercetina (2, 4, 5, 6, 8, 10 µg /mL). Em cada um dos seis frascos, 100 µL de cloreto de alumínio a 5% foram adicionados em cada um dos balões, juntamente com as alíquotas de quercetina. Metanol foi adicionado ao balão até um nível final de 5 mL. A solução foi então mantida em repouso e no escuro por 30 minutos após ser

agitada suavemente por 30 segundos. A leitura foi então feita usando um espectrofotômetro UV-Vis com um comprimento de onda de 425 nm. O método dos mínimos quadrados foi usado para determinar a equação da reta (GHASEMI *et al.*, 2018; GHAZANFARI *et al.*, 2017).

#### **4.5.2 Teor de flavonoides totais dos sistemas microparticulados e do extrato de própolis marrom**

A mesma solução estoque utilizada para fenóis (composta por 40% de excipiente e 60% de extrato) foi utilizada neste ensaio. Para obter as seis diferentes concentrações de própolis marrom (70, 80, 90, 100 e 110 µg/mL), 100 µL de cloreto de alumínio a 5% e as várias alíquotas de solução de própolis marrom em metanol foram adicionados a cada um dos seis balões. O balão volumétrico foi então enchido até 5 mL e agitado suavemente por um curto período de tempo. Um espectrofotômetro UV-Vis foi usado para fazer a leitura após 30 minutos de reação em um comprimento de onda de 425 nm. Calculou-se a equação da reta pelo método dos mínimos quadrados (GHASEMI *et al.*, 2018; GHAZANFARI *et al.*, 2017).

Os resultados das absorbâncias obtidos com as leituras das amostras foram substituídos na variável  $y$ , da equação ( $y = a+bx$ ) para encontrar os valores de concentração na variável  $x$ . Dividindo-se o valor da concentração de flavonoides encontrado na equação da reta pelo valor de  $x$  dividido pelo valor da concentração utilizada, sendo elas (70, 80, 90, 100, 110 µg/mL), e multiplicando por 100, determinou-se a porcentagem de flavonóides totais presentes nas amostras analisadas (GHASEMI *et al.*, 2018; GHAZANFARI *et al.*, 2017).

#### **4.6 Ultravioleta visível (UV-VIS)**

A princípio, pesou-se 10 mg da amostra e transferiu-se para um balão volumétrico de 10 mL a fim de preparar soluções de trabalho, completando o volume com etanol absoluto. Após isso, foram pipetados os volumes 500 µL, 250 µL e 100 µL dessa solução para tubos eppendorfs, adicionando etanol para completar o volume de 1 mL. Desse modo, três soluções de concentrações de 500, 250 e 100 µg/mL foram obtidas (SANTOS *et al.*, 2017).

A espectroscopia no UV-Vis foi executada em espectrofotômetro UV-Vis da *Shimadzu, modelo UV-1280*, em comprimento de onda na faixa espectral de 200 nm e 600 nm, com o intuito de identificar a região e a intensidade de absorção do

extrato de própolis marrom. As leituras foram feitas utilizando cubetas de quartzo. Para colher os dados, foram considerados valores de 2 em 2 nanômetros para plotar gráfico usando o software *Graphpad Prism*®. As análises espectrofotométricas na região do UV-visível foram efetuadas com o propósito de definir o tempo ideal para liberação máxima da própolis (SANTOS *et al.*, 2017).

#### **4.7 Infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)**

Nesta análise, foi utilizado o espectrofotômetro *Shimadzu* e FTIR – *IRAffinity-1 - Shimadzu*, com faixa de comprimento de onda entre 4000 a 600  $\text{cm}^{-1}$ , 64 scans. Cerca de 3  $\mu\text{L}$  do extrato de própolis marrom e 1 mg do sistema microparticulado contendo extrato de própolis marrom foram adicionados sobre o ATR com o auxílio de uma pipeta semiautomática e posteriormente a leitura foi efetuada no equipamento em modo de transmitância (SILVERSTEIN; BASSLER; MORRILL, 1994; SILVA *et al.*, 2019).

#### **4.8 Análise termogravimétrica (TG)**

Para a análise térmica tanto do extrato de própolis marrom quanto do sistema microparticulado contendo extrato de própolis marrom de União dos Palmares foi utilizado um analisador termogravimétrico *TGA-SHIMADZU*, usando 18,4 mg de amostra. Com uma curva de aquecimento de  $10^{\circ}\text{C min}^{-1}$  a  $900^{\circ}\text{C}$ , o peso inicial foi estabilizado em  $25^{\circ}\text{C}$ . Além dos 30 minutos extras para resfriar o aparelho, o processo levou em média 90 minutos para ser realizado. Foi usado um microcomputador acoplado ao instrumento usando o programa *TA-60 WS SHIMADZU* para adquirir as curvas de termodecomposição, a uma razão de um ponto a cada 0,5 segundos (PEREIRA, 2013; OLIVEIRA *et al.*, 2011; ARAGÃO *et al.*, 2006).

#### **4.9 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)**

Em relação ao estudo da morfologia das amostras, foi realizado em microscópio eletrônico de varredura (MEV) da marca *TESCAN*. Num porta amostra circular de aço foram inseridas tiras finas de carbono com o intuito de se depositar as amostras a serem analisadas. Retirou-se a umidade do pó em balança de umidade utilizando temperatura de  $105^{\circ}\text{C}$  para preparo da amostra. A metalização da amostra foi feita em um metalizador com alvo de platina por 3 minutos, seguido

de aplicação de alvo de ouro por 5 minutos (Corrente de 10 mA em ambas) (SILVA *et al.*, 2018; COSTA, 2016).

O MEV foi operado a 5 kV com ampliação de foco na faixa de 457 a 1800 vezes. Para visualizar as fotomicrografias, foi utilizado campo de visão entre 454  $\mu\text{m}$  e 115  $\mu\text{m}$  e escalas de 100  $\mu\text{m}$  e 20  $\mu\text{m}$ . A varredura do pó se deu em diferentes pontos que variaram entre 300 e 4000 vezes (SILVA *et al.*, 2018; COSTA, 2016).

#### **4.10 Ensaio de dissolução *in vitro***

Para o estudo de dissolução, foi utilizado um dissolutor automático modelo *708-DS Dissolution Apparatus - Agilent*, com oito cubas de vidro, programado para rotacionar a 100 rpm sob temperatura de 37°C, com aparato pá sob agitação constante. Foram utilizados seis meios para a dissolução: tampão fosfato equimolar (pH 6,8); água osmose reversa + Polisorbato Tween 60 1%; água osmose reversa + Lauril sulfato de sódio (SLS) 1%; ácido clorídrico (HCl) 0,05M (pH 1,5); HCl 0,05M + SLS 1% (pH 1,5); HCl 0,05M + adição de tampão fosfato equimolar (pH 6,8), após 1 hora (250 mL de cada). Os estudos utilizaram, para todos os meios testados, 500 mL de solução. As cápsulas utilizadas foram pesadas em balança analítica *Shimadzu AX 200*, as quais comportavam os sistemas microparticulados com peso de 83,33 mg (correspondente a 50 mg de extrato de própolis marrom), além dos excipientes Explocel® (croscarmelose sódica) e celulose microcristalina, ambos em peso correspondente a 7,5% (6,47 mg), em cada cápsula (OLIVEIRA, 2019; BROWN *et al.*, 2011; BRASIL, 2010; ALLEN *et al.*, 2013; SOUZA *et al.*, 2019).

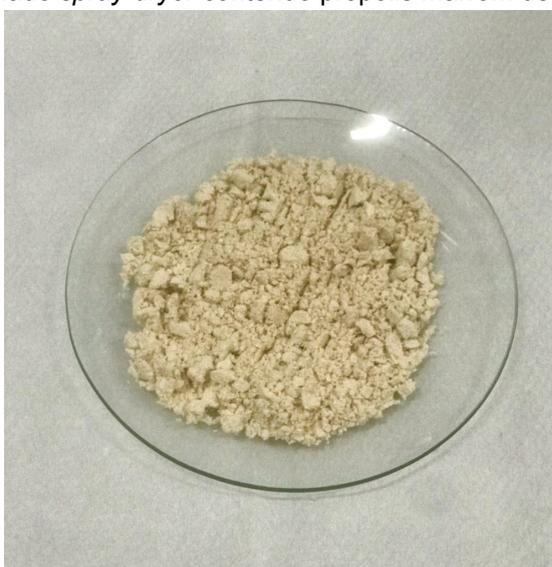
Foram realizadas coletas de 5,0 mL do meio de dissolução em diferentes tempos (30 min., 60 min., 120 min., 180 min. e 240 min.), a solução coletada foi filtrada em papel de filtro analítico e submetidas à espectroscopia UV-Vis com comprimento de onda de 290 nm. Para construir a curva de calibração do padrão analítico do flavonoide Naringenina, pesou-se 112mg dos sistemas microparticulados, solubilizando com auxílio de agitador magnético por 24 horas em solução de HCl 0,05M + Lauril 1%, realizando leitura no UV-Vis nas mesmas condições, em concentrações de 10; 12,5; 25; 50; 75; 80; 90 e 100  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente. Os ensaios foram realizados em quadruplicata para cada meio (OLIVEIRA, 2019; BROWN *et al.*, 2011; BRASIL, 2010; ALLEN *et al.*, 2013; SOUZA *et al.*, 2019).

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Obtenção e aspectos visuais dos sistemas microparticulados

Ao final do processo, o sistema microparticulado obteve aspecto leve e homogêneo a olho nu e coloração marrom clara, bem como aroma característico de própolis, ao que tudo indica um pó higroscópico (Figura 14). O rendimento de pó foi em torno de 27,28% do percentual previsto, com peso final de 9,824g, levando em conta a perda natural do equipamento.

**Figura 14** – Microparticulado *spray-dryer* contendo própolis marrom de União dos Palmares - AL.

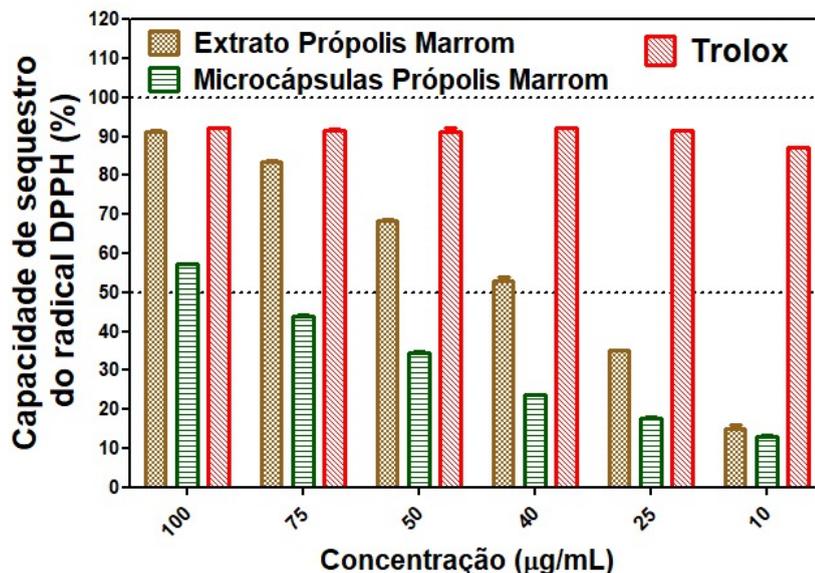


Fonte: AUTOR, 2021.

### 5.2 Ensaio de atividade antioxidante

Mediante os ensaios, foi atestado que extrato comercial de própolis marrom da região de União dos Palmares (AL) demonstrou atividade antioxidante significativa frente ao radical livre DPPH●. Constatou-se uma capacidade de inibição em 50% (CI50) do radical DPPH● a partir de 40 µg/mL, demonstrando o mesmo perfil de inibição da própolis verde comercial, o tipo mais comercializado no Brasil e com grande capacidade antioxidante descrita (MARCUCCI *et al.*, 2020, FREITAS, 2021).

**Figura 15** – Atividade antioxidante do extrato comercial de própolis marrom de União dos Palmares/AL e microcápsulas de própolis verde comercial em comparação ao Trolox®.



Fonte: Autor, 2021.

Tendo como base a metodologia validada por Nascimento e colaboradores (2016) para mensurar a capacidade antioxidante, foi possível estabelecer em dados percentuais a relação da atividade dos compostos fenólicos com o sequestro de radicais livres DPPH•, sendo os resultados representados graficamente, de acordo com a figura 15. Como padrão, foi utilizado o Trolox®, um antioxidante sintético solúvel análogo à vitamina E, o qual possui alta atividade antioxidante.

A metodologia de avaliação da atividade antioxidante por DPPH• é fundamentada na estabilização dos radicais de DPPH• pela doação, para estes, de um átomo de hidrogênio presente na estrutura química dos antioxidantes (ROUSSIS *et al.*, 2008). A porcentagem de atividade antioxidante (%AA) é diretamente relacionada à quantidade de DPPH• consumida pelo agente antioxidante, uma vez que a quantidade de antioxidante suficiente para decrescer a concentração inicial de DPPH• em 50% é denominada Concentração Eficiente (CE50), ou Concentração Inibitória (CI50). Logo, quanto maior o consumo de DPPH• por uma amostra, menor será a sua CE50 e, conseqüentemente, maior sua atividade antioxidante. Portanto, quanto maior a concentração da amostra e menor a absorbância, maior é o consumo de radical DPPH• (SOUZA *et al.*, 2007).

Após execução dos testes com o radical DPPH•, foi notado que todas as formulações demonstraram atividade antioxidante, inclusive os microparticulados, entretanto em níveis inferiores comparados ao extrato bruto. Mesmo após a

atividade antioxidante ter sido preservada pela técnica de secagem por *spray-dryer*, o que indica ainda mais sua importância em alimentos, acredita-se que essa diminuição da atividade esteja ligada à degradação de grupos fenólicos e sua interação com a matriz encapsulante.

Um estudo realizado por Ribeiro *et al.* (2017) investigou a influência da matriz de encapsulamento na atividade antioxidante da própolis. Os resultados mostraram que a encapsulação da própolis em matriz de alginato de sódio resultou em uma redução da atividade antioxidante em comparação com a própolis não encapsulada. Isso pode ser atribuído à possível interação dos compostos fenólicos presentes na própolis com a matriz de alginato.

Outro estudo conduzido por Freitas *et al.* (2019) avaliou a atividade antioxidante de extratos de própolis encapsulados em nanopartículas de quitosana. Os resultados indicaram que a encapsulação em quitosana levou a uma diminuição da atividade antioxidante em comparação com a própolis não encapsulada. Essa redução foi atribuída à interação dos compostos fenólicos com a matriz de quitosana, que pode afetar sua biodisponibilidade e capacidade de sequestrar radicais livres.

Esses estudos sugerem que a interação dos grupos fenólicos com a matriz encapsulante pode resultar em uma diminuição da atividade antioxidante da própolis. No entanto, é importante ressaltar que a escolha da matriz de encapsulamento e as condições de encapsulação podem influenciar o grau de interação e, conseqüentemente, o impacto na atividade antioxidante. Entretanto, esse impacto pode ser mínimo a depender do material encapsulante e da técnica escolhida.

É possível constatar que mesmo possuindo uma menor concentração de extrato ativo e, conseqüentemente, menor capacidade de sequestro do radical DPPH●, os sistemas microparticulados obtidos obtiveram atividade antioxidante satisfatória, variando entre as concentrações avaliadas. Esta menor atividade está diretamente ligada à capacidade da formulação liberar o ativo em meio aquoso, demonstrando que ela possui propriedades desejadas que a tornam a escolha ideal para uma fórmula farmacêutica de liberação controlada ou um nutracêutico. Outra explicação para essa maior atividade pode ser o fato de o ativo não ser incorporado à matriz encapsulante e permanecer na superfície da matriz; no entanto, essa

explicação é descartada pelos dados das análises subsequentes, que apóiam essa afirmação (FREITAS, 2021).

Estudos realizados por Bankova *et al.* (2014) demonstraram que a concentração de flavonoides na própolis está positivamente correlacionada com sua capacidade de sequestro de radicais livres. Os flavonoides são conhecidos por sua forte atividade antioxidante devido à presença de grupos hidroxila em sua estrutura molecular, que são responsáveis pela captura de radicais livres. Ademais, outros estudos relataram que os ácidos fenólicos, como o ácido cafeico e o ácido p-cumárico, também contribuem para a atividade antioxidante da própolis. A concentração desses ácidos fenólicos na própolis pode variar dependendo da flora local e do processamento da amostra, o que afeta diretamente sua atividade antioxidante (BANKOVA *et al.*, 2014).

É importante ressaltar que a atividade antioxidante da própolis não depende apenas da concentração dos compostos químicos individuais, mas também da interação entre eles. A presença de sinergismo entre os compostos fenólicos e aromáticos na própolis pode potencializar sua atividade antioxidante (BANKOVA *et al.*, 2014).

Antioxidantes naturais, como a própolis, estão sendo cada vez mais utilizados na indústria farmacêutica e alimentícia devido a uma série de benefícios em relação aos antioxidantes artificiais. Estudos têm mostrado que os antioxidantes naturais possuem uma ampla gama de compostos bioativos, como flavonoides, grupos fenólicos e terpenóides, que apresentam atividade antioxidante e outros efeitos benéficos à saúde. Além disso, os antioxidantes naturais são geralmente considerados mais seguros em comparação com os sintéticos, pois são derivados de fontes naturais e possuem menor probabilidade de efeitos adversos. Um estudo realizado por Shahidi e Ambigaipalan (2015) discute a importância dos antioxidantes naturais na prevenção de doenças crônicas e como eles estão se tornando uma alternativa preferida na indústria de alimentos e farmacêutica devido às suas propriedades antioxidantes e potencial terapêutico (SHAHIDI & AMBIGAIPALAN, 2015).

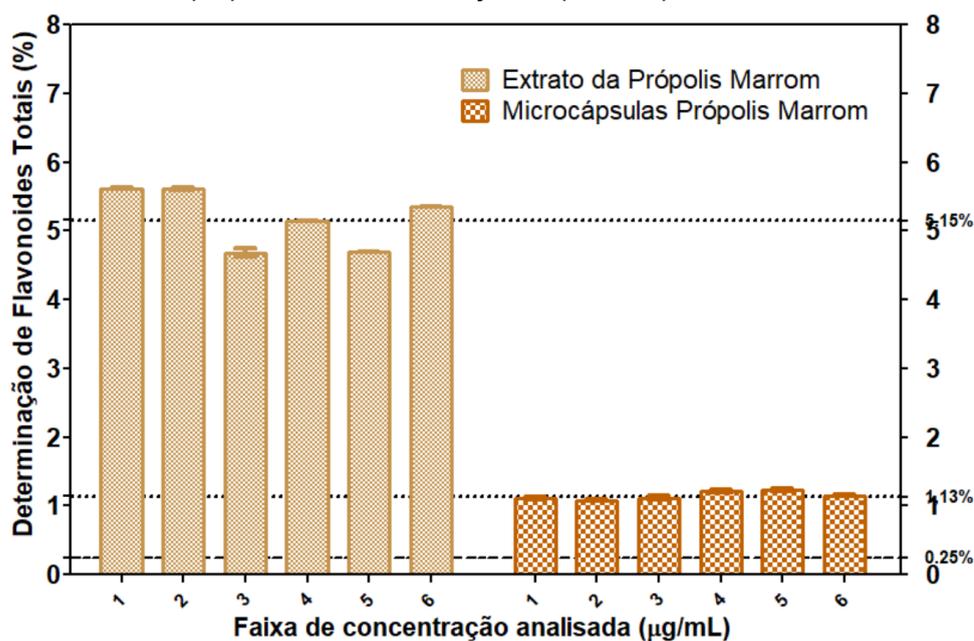
### **5.3 Determinação do teor de fenóis e flavonoides totais**

Os fenóis e flavonoides totais podem ser quantificados usando uma curva de calibração com ácido gálico e quercetina, respectivamente. A curva de calibração

relaciona a quantidade de fenóis com a absorvância da solução a 750 nm para fenóis totais e 425 nm para flavonoides totais, portanto, o resultado final dependerá do teor de ácido gálico presente na amostra (CRUZ, 2008).

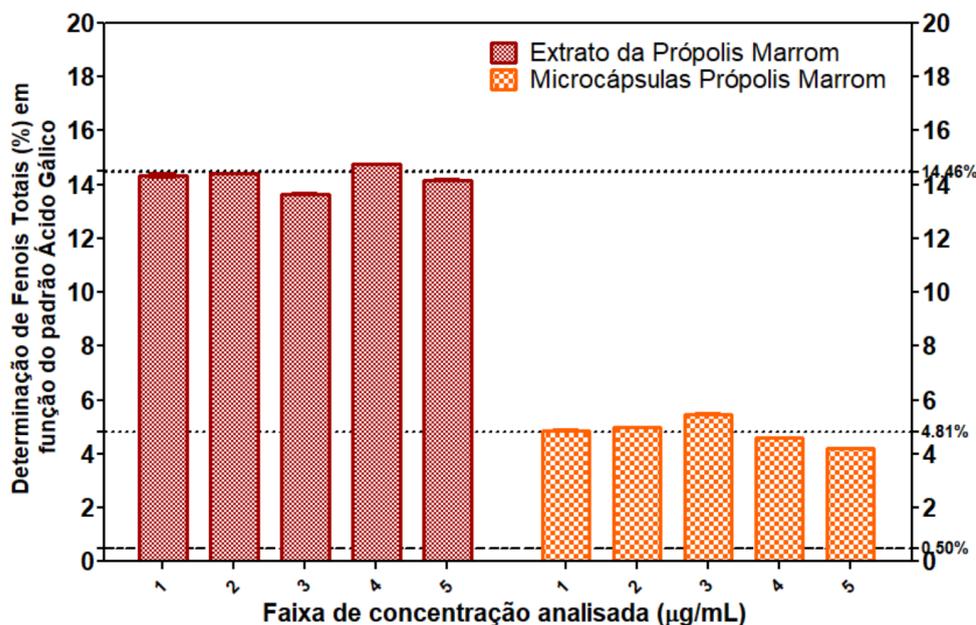
Nesse âmbito, os ensaios de teores de flavonoides e fenóis totais demonstraram concentrações de 5,15% no extrato bruto e 1,13% nos sistemas microparticulados para flavonoides totais e 14,46% no extrato bruto e 4,81% no microparticulado para fenóis totais. As amostras avaliadas estão dentro dos padrões estabelecidos pela legislação brasileira, haja vista que, de acordo com o Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), os extratos etanólicos de própolis devem conter, no mínimo, 0,50% (m/m) de fenólicos e 0,25% (m/m) de flavonoides (BRASIL, 2001). Os resultados dos teores supracitados estão nas figuras 16, 17 e 18.

**Figura 16** – Teor de flavonoides totais no extrato de própolis marrom e microencapsulados de própolis marrom em função do padrão quercetina.



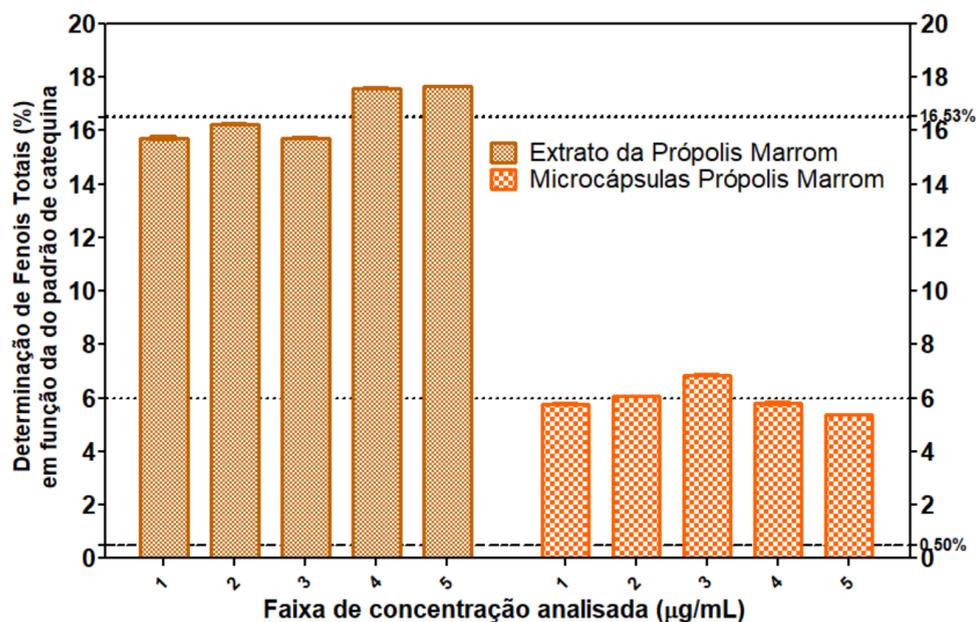
Fonte: Autor, 2021.

**Figura 17** – Teor de fenóis totais no extrato de própolis marrom e microencapsulados de própolis marrom em função do padrão ácido gálico.



Fonte: Autor, 2021.

**Figura 18** – Teor de fenóis totais no extrato de própolis marrom e microencapsulados de própolis marrom em função do padrão de catequina.



Fonte: Autor, 2021.

Outrossim, os valores encontrados neste estudo também estão em conformidade com os perfis encontrados por outros autores (KALOGROPULOS *et al.*, 2009; MOREIRA *et al.*, 2008; ALVES & KUBOTA, 2013), com as concentrações de flavonoides totais sendo inferiores à de fenóis totais. Como a composição química da própolis é dependente de vários fatores, dentre eles a localização geográfica, a relação entre os grupos fenólicos totais e flavonoides totais está

intimamente relacionada à flora e à região da coleta (BANKOVA, 2005; PARK *et al.*, 2002).

Um estudo realizado por Popova e colaboradores (2017) avaliou a composição fenólica e atividade antioxidante de diferentes tipos de própolis. Os resultados revelaram que própolis com maiores teores de fenóis e flavonoides totais exibiram maior atividade antioxidante, atribuída à capacidade desses compostos em neutralizar radicais livres e proteger as células contra danos oxidativos. Além disso, um estudo conduzido por Bankova *et al.* (2000) demonstrou que a concentração de fenóis e flavonoides totais pode ser um indicativo da qualidade e autenticidade da própolis, sendo considerada uma importante medida de sua eficácia terapêutica.

É importante destacar, também, que em outro estudo realizado por Bankova e colaboradores (2014) demonstrou que a concentração de flavonoides totais estava relacionada à atividade antimicrobiana da própolis, destacando seu potencial na inibição do crescimento de microrganismos patogênicos.

Já em relação à quantificação dos teores, Silva *et al.* (2017) avaliaram amostras de própolis de diferentes regiões e observaram teores de fenóis totais variando de 21,8 a 41,4 mg/g e teores de flavonoides totais variando de 5,8 a 24,6 mg/g. Da mesma forma, Salatino *et al.* (2005) analisaram própolis brasileira e relataram teores de fenóis totais que variaram de 6,4 a 37,5 mg/g e teores de flavonoides totais que variaram de 1,5 a 13,1 mg/g.

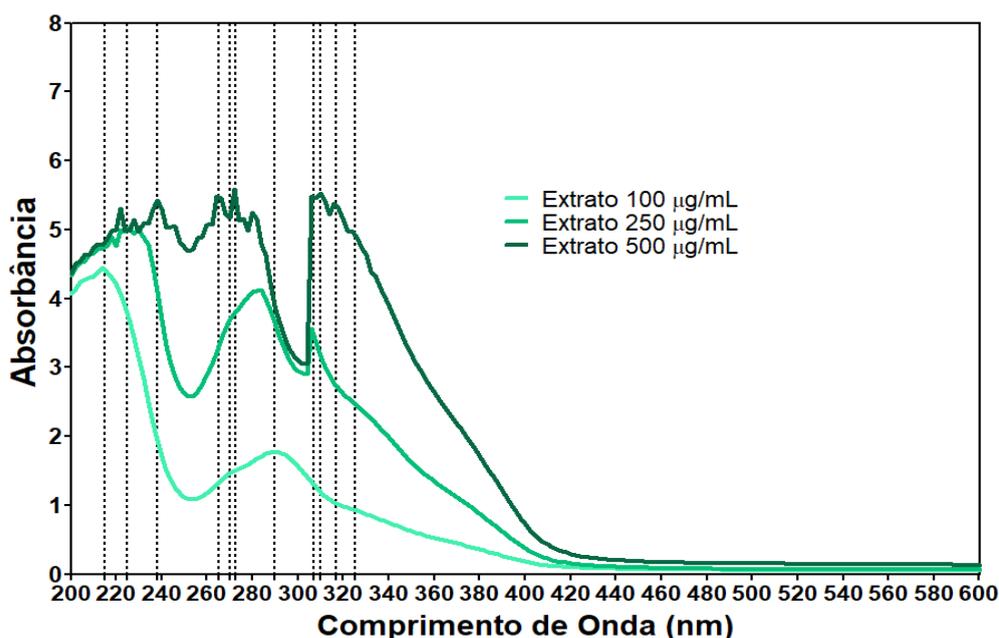
Esses estudos corroboram com a importância dos fenóis e flavonoides totais na própolis para sua qualidade e atividade biológica, fornecendo evidências adicionais sobre a relação entre a concentração desses compostos e suas propriedades benéficas à saúde.

#### **5.4 Ultravioleta visível (UV-Vis)**

Segundo o espectro UV-Vis (Figura 19), é observado que o extrato de própolis marrom apresenta um perfil de absorção com absorbâncias máximas nos comprimentos de onda de 215 nm, 268 nm (ombro), 290 nm e 325 nm (ombro) na concentração de 100 µg/mL, faixas de absorção para compostos fenólicos. Tal perfil possui grande semelhança com aquele encontrado recentemente por Marcucci e colaboradores, onde destaca-se a diferenciação dos espectros de acordo com o tipo de própolis, tendo em vista que o perfil está diretamente ligado à absorção dos vários compostos presentes no extrato (MARCUCCI *et al.*, 2020). Em conformidade

com Feng *et al.* (2017), os dados obtidos pelo espectro UV-Vis do extrato de própolis marrom de União dos Palmares/Alagoas podem indicar a ocorrência das classes de flavonoides como as flavonas, flavonononas e flavononois (FREITAS, 2021; FENG *et al.* 2017).

**Figura 19** – Espectro UV-Vis do extrato de própolis marrom da região de União dos Palmares/Alagoas em diferentes concentrações. As linhas pontilhadas representam alguns subníveis de absorção de energia vibracional e rotacional dentro das bandas de absorção em 215, 225, 238, 265, 268, 272, 278, 290, 307, 310, 317, 325 nm.



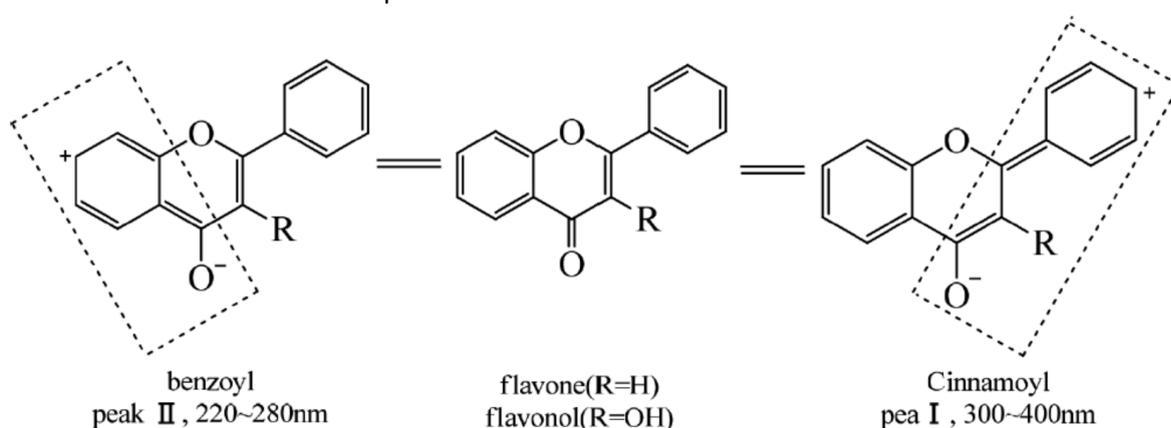
Fonte: AUTOR, 2021.

De acordo com Feng *et al.* (2017), as localizações e formas das Bandas I e II serão afetadas pelos substituintes ligados aos anéis A e B. Geralmente, o desvio para o vermelho (maiores comprimentos de onda) da Banda I aumenta proporcionalmente quando o número de grupos hidroxila localizados no anel B aumenta. Desse modo, o desvio para o vermelho da Banda II aumenta em conformidade quando o número de grupos hidroxila localizados no anel A aumenta, porém não tem um impacto significativo para a Banda I, com exceção de 5-OH. As bandas correspondentes serão do aspecto violeta deslocadas de 5–15 nm se o grupo hidroxila particular for glicosilado. Cabe ressaltar que a influência dos grupos hidroxila será quase nula se eles forem acetilados (FREITAS, 2021; FENG *et al.* 2017).

As posições, tipos e número de substituintes nos sistemas conjugados de compostos fenólicos tipo flavonóides e ácidos fenólicos podem ser identificados por

meio do espectro de UV. Os flavonóides no solvente metanol possuem, em sua maioria, duas bandas principais de absorção. A banda I está em 300-400 nm, que é causada pela transição de elétrons do grupo cinamoil. A banda II está em 240-280 nm, que é causada pela transição de elétrons do grupo benzoíla, conforme mostrado na Figura 19. Os tipos de estrutura e tipos de substituintes portadores de oxigênio de flavonóides podem ser determinados pelos locais de pico, formas e intensidades da banda I e II, conforme apresentado na Tabela 3 (FREITAS, 2021; FENG *et al.* 2017).

**Figura 20** – Identificação das porções estruturais Banda II (220-280 nm) e Banda I (300 – 400 nm) do esqueleto dos anéis A e B de flavonoides.



Fonte: FENG *et al.*, 2017.

**Tabela 3** – Características espectrais no UV-Vis para identificação de diferentes classes de flavonoides.

Tipo de estrutura	Banda II (nm)	Banda I (nm)
Flavona	250–280	304–350
Flavonol (3'-OH é substituído)	250–280	328–357
Flavonol (3'-OH é livre)	250–280	358–385
Isoflavona	245–270	310–330 (ombro)
Flavanona e flavanonol	270–295	300–330 (ombro)
Chalcona	220–270 (estiramento fraco)	340–390
Aurona	230–270 (estiramento fraco)	370–430
Antocianidina	270--280	465–560

Fonte: Adaptado de FENG *et al.*, 2017.

É válido salientar, ainda, que o espectro UV-Vis da própolis marrom de União dos Palmares demonstrou semelhanças com o extrato glicólico da planta *Baccharis*

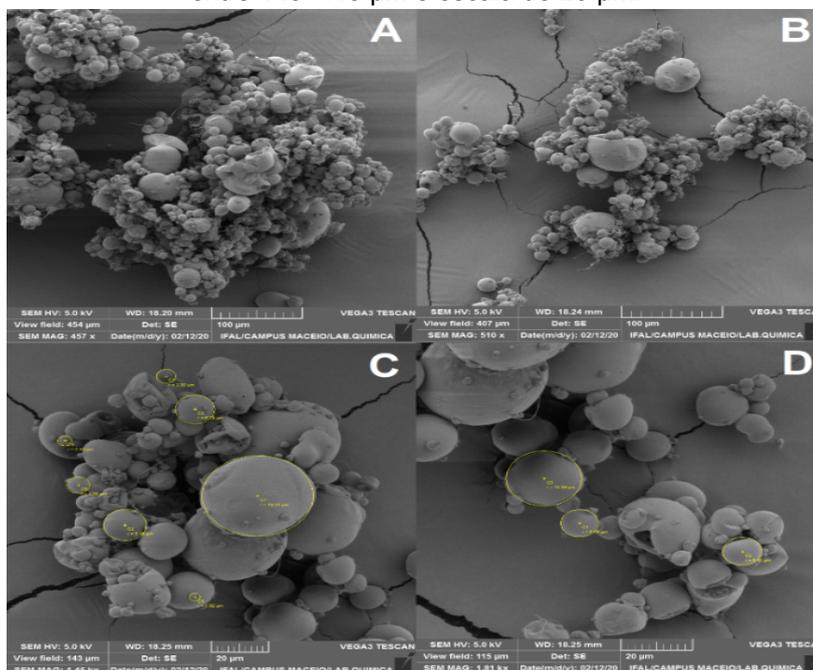
*dracunculifolia*, com comprimento de onda máximo em 290 nm, planta esta considerada a origem botânica dos constituintes presentes no extrato de própolis verde de Minas Gerais (GUIMARÃES *et al.* 2012).

A espectroscopia UV-Visível tem sido amplamente utilizada na análise físico-química da própolis devido à sua capacidade de fornecer informações sobre a composição química e propriedades físicas desse produto natural. Diversos estudos têm aplicado essa técnica para determinar a presença e quantificar compostos como fenóis, flavonoides, ácido caféico, ácido cinâmico e derivados, os quais absorvem nesta região do ultravioleta (MOURA *et al.*, 2018; ALENCAR *et al.*, 2007; SILVA *et al.*, 2014; KUMAZAWA *et al.*, 2004).

### **5.5 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)**

As análises de microscopia eletrônica de varredura foram utilizadas para comprovar a obtenção de sistemas microparticulados por *spray-drying* contendo extrato de própolis marrom. Os resultados demonstram que foram formadas micropartículas entre 5 e 20  $\mu\text{m}$ , esféricas e lisas, ausentes de fissuras ou porosidades (Figura 21). Ademais, foi possível notar algumas micropartículas quebradiças (Figuras 21A e 21D), bem como pequenas micropartículas de tamanho de 1 a 2  $\mu\text{m}$  aprisionadas no interior e no exterior das micropartículas maiores, as quais podem se tratar do extrato de própolis marrom aprisionado no interior dos sistemas microparticulados formados pelo material glicídico (amido). Esse resultado atesta que as condições de secagem utilizadas no *spray-dryer* são eficazes para a formação de sistemas microparticulados contendo extrato de própolis marrom.

**Figura 21** – Fotomicrografia Eletrônica de Varredura do sistema microparticulado de própolis Marrom da região de União dos Palmares-Alagoas. Fotomicrografias A e B foram obtidas usando campo de visão entre 407-454  $\mu\text{m}$  e escala de 100  $\mu\text{m}$ . Fotomicrografias C e D foram usados campo de visão entre 143- 115  $\mu\text{m}$  e escala de 20  $\mu\text{m}$ .

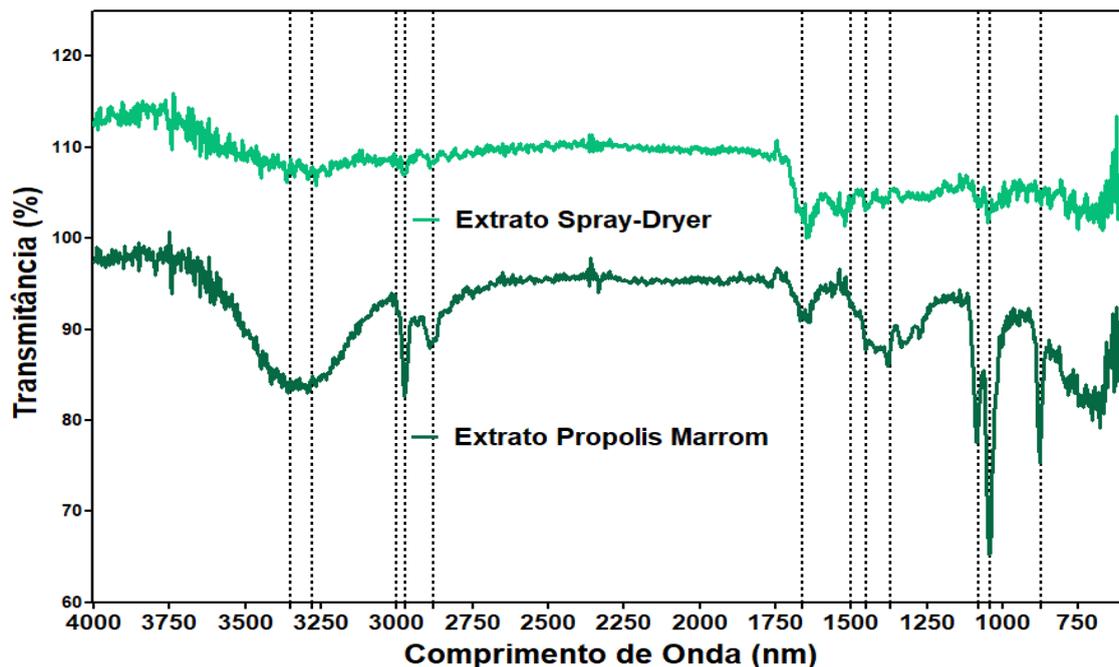


Fonte: AUTOR, 2021.

## 5.6 Infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)

No espectro ATR-FTIR do EEPM é possível observar deformações axiais na região entre  $3350\text{-}3280\text{ cm}^{-1}$  a qual podemos relacionar hidroxilas (O-H) fenólicas de flavonóides e hidroxilas fenólicas de ácidos cinâmicos, com possível formação de ligações intermoleculares (pontes de hidrogênio, previsto entre  $3550\text{-}3200\text{ cm}^{-1}$  e em estruturas poliméricas, com as bandas das O-H fenólicas podendo chegar a  $3100\text{ cm}^{-1}$ ), estiramentos na região de  $2970\text{ a }2880\text{ cm}^{-1}$  referente à deformação axial de ligação carbono-hidrogênio (C-H) de  $\text{CH}_3$  e  $\text{CH}_2$ . Evidenciou-se também deformação axial de C-H para alcenos trissubstituídos em isoprenilas  $1660\text{ cm}^{-1}$  e deformação axial de C-H  $1635\text{ cm}^{-1}$  para alcenos tipo cis (artepelin C), estiramentos axiais em  $1500$  e  $1450\text{ cm}^{-1}$  para C-H de aromáticos, bem como deformações angulares (C-H) em  $1370\text{ cm}^{-1}$  para C-H de metilas em alcanos e estiramentos fortes de ligação carbono-oxigênio (C-O) de fenóis e éteres em  $1080\text{ cm}^{-1}$  e  $1040\text{ cm}^{-1}$  para éteres alifáticos ligação éter aromático  $\text{H}_3\text{C-O-Phenil}$  (presente em flavonoides metoxilados) e nos ácidos cinâmicos metoxilados (como ácido ferúlico, pinostrombina, narigenina, isosacuranetina).

**Figura 22** – Espectro FTIR no modo ATR do Extrato de própolis marrom submetido a evaporação do solvente e do sistema microparticulado de própolis marrom obtido por *Spray-Dryer*.



Fonte: AUTOR, 2021.

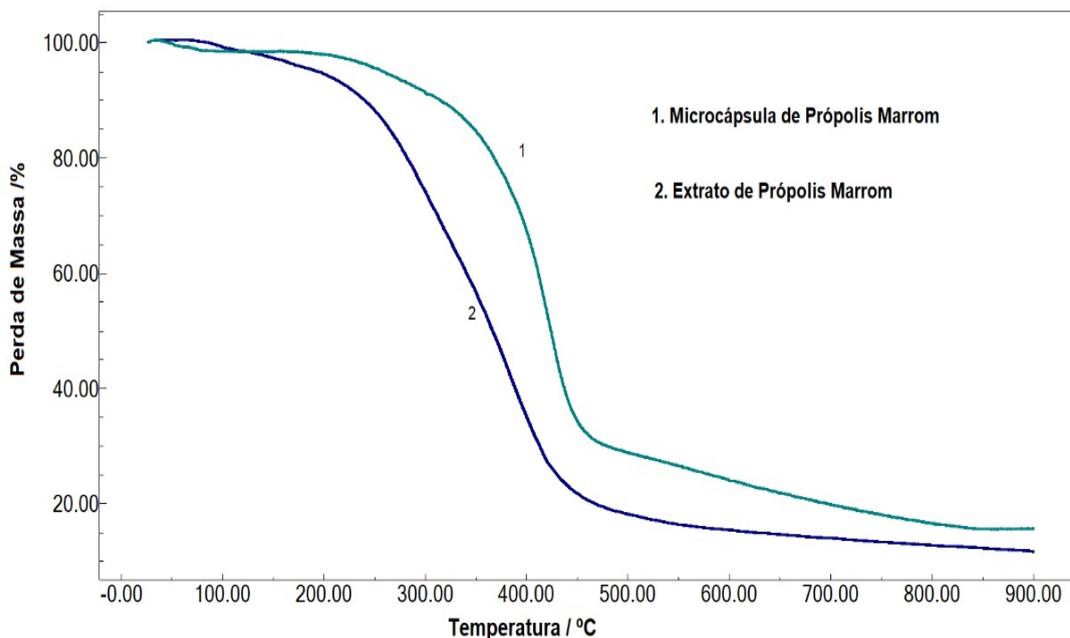
Foram demonstrados, também, estiramentos em  $875\text{ cm}^{-1}$  referente à confirmação de C-H alcenos trissubstituídos e C-H aromáticos trissubstituídos. Deformação angular fora do plano para O-H de hidroxilas de forma larga acontecendo em  $700$  e  $680\text{ cm}^{-1}$  confirmando presença de fenóis, além de estiramento forte em  $875\text{ cm}^{-1}$  e estiramentos em  $700\text{-}680\text{ cm}^{-1}$  referente a aromáticos trissubstituídos em sistemas flavonoídicos tipo 5,7-dihidroflavona, como pode ser encontrado nos flavonóides narigenina, isosacuranetina e pinostrombina (FREITAS, 2021).

Depreende-se, também, que os microparticulados de própolis marrom apresentaram estiramentos fracos, bem como presença estiramentos e deformações em  $1660\text{ cm}^{-1}$  referente a alcenos trans para ácidos cinâmicos e  $1040\text{ cm}^{-1}$  para éter alifático que podem ser também de éter do carboidrato amido.

### 5.7 Análise termogravimétrica (TGA)

A Figura 23 exibe a curva TG do extrato de própolis marrom e do sistema microparticulado contendo extrato de própolis marrom. Os eventos de perda de massa de ambas amostras foram semelhantes e ocorreram em um intervalo de temperatura entre  $27$  e  $900^\circ\text{C}$ .

**Figura 23** – Curva TG do extrato de própolis marrom comparado ao das microcápsulas.



Fonte: AUTOR, 2021.

Referente à curva TG do sistema microparticulado contendo extrato de própolis marrom (linha 1) observamos dois eventos de perda de massa: o primeiro iniciando em 27,86°C referente à água presente na amostra, seguido de um segundo evento expressivo entre 150°C e 520°C, o qual podemos associar à degradação dos compostos voláteis e material da matriz encapsulante.

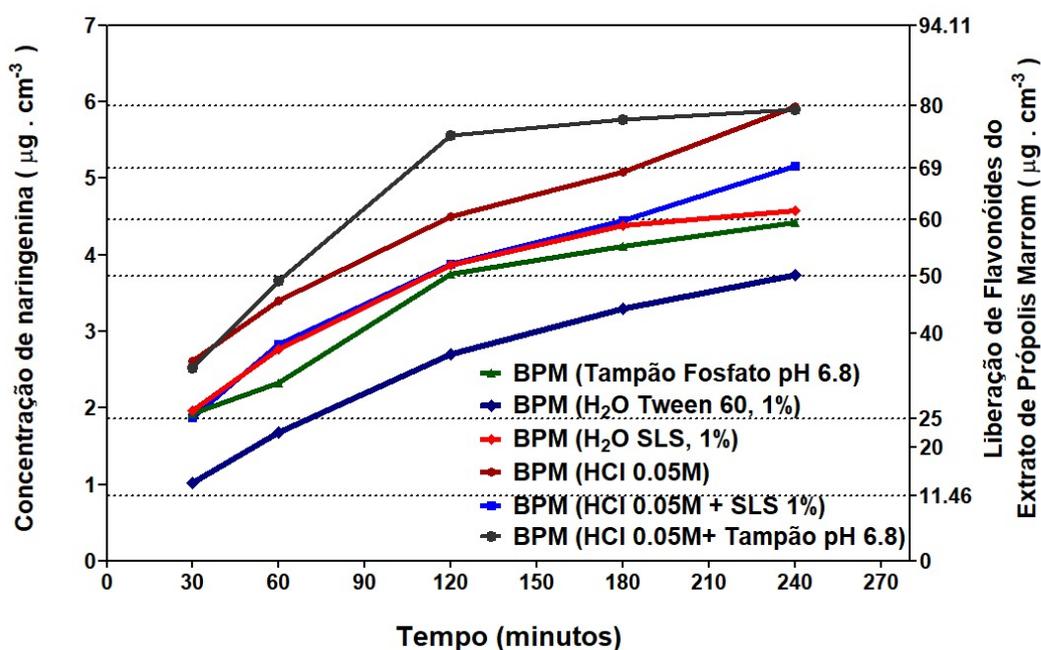
Na curva TG do extrato (linha 2) é possível observar dois eventos de perda de massa, o primeiro iniciando em 27° e finalizando em 125° relacionado à desidratação. O segundo evento ocorre em 205°C e é um dos eventos de perda de massa mais significativos, totalizando 75,5% de perda de massa do extrato de própolis marrom, com final em aproximadamente 490°C, evento este que pode ser relacionado aos compostos orgânicos voláteis presentes na amostra. A partir 490°C inicia-se a degradação da amostra, até 899°C.

É possível notar que ambas as curvas TG possuem perfis semelhantes, com eventos de perda de massa em intervalos de temperaturas próximos, entretanto é possível inferir que o segundo evento no sistema microparticulado contendo o extrato (linha 1) necessitou de uma temperatura discretamente maior para poder iniciar-se, sendo também um intervalo mais longo, indicando, portanto, a proteção térmica da matriz encapsulante ao conteúdo interno.

## 5.8 Perfil de dissolução

Observa-se na figura 24 o perfil de dissolução dos sistemas microparticulados *spray-dryer* contendo extrato de própolis marrom (BPM) em seis meios de dissolução distintos – tampão fosfato equimolar (pH 6,8); água osmose reversa + Polisorbato Tween 60 1%; água osmose reversa + Lauril sulfato de sódio (SLS) 1%; ácido clorídrico (HCl) 0,05M (pH 1,5); HCl 0,05M + SLS 1% (pH 1,5); HCl 0,05M + adição de tampão fosfato equimolar (pH 6,8), após 1 hora – a fim de avaliar a liberação de flavonoides presentes nos sistemas microparticulados em função da concentração da naringenina, a qual apresenta comprimento de onda máximo próximo a 290 nm.

**Figura 24** – Perfil de dissolução das microcápsulas *spray-dryer* contendo extrato de própolis marrom de União dos Palmares - AL (BPM) em seis meios de dissolução.

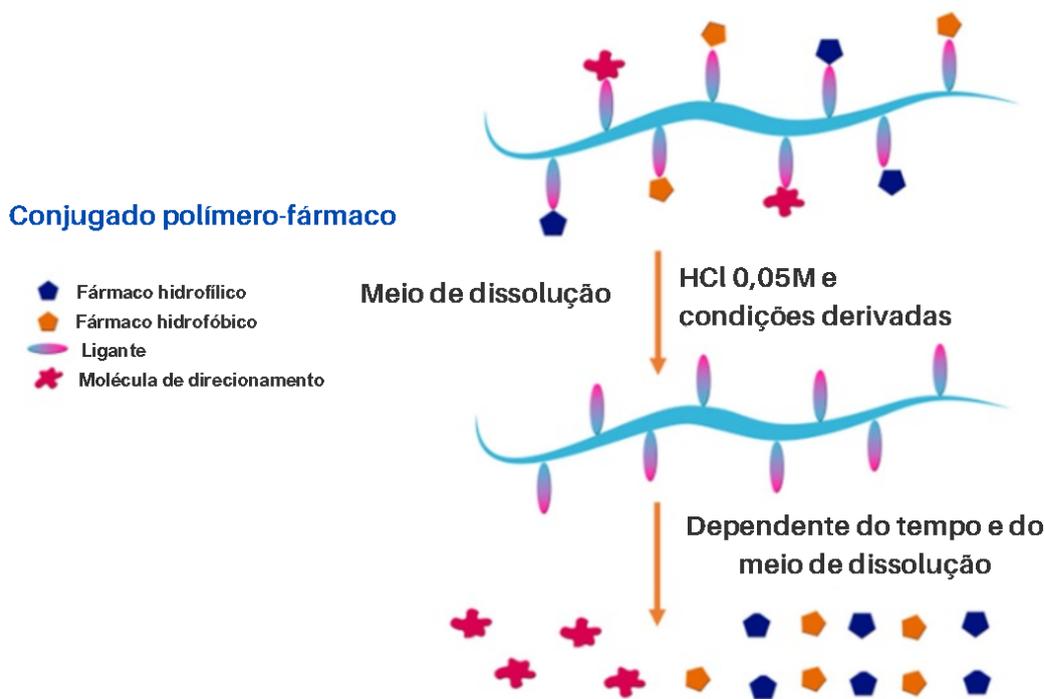


Fonte: AUTOR, 2022.

Os conjugados polímero-fármacos (CPFes) são constituídos por um esqueleto polimérico ligado covalentemente a um fármaco (hidrofílico ou hidrofóbico) com o auxílio de um ligante e, em alguns casos, juntamente com uma molécula de direcionamento, a qual guia os CPFes para o destino fisiológico desejado ou se liga a um alvo biológico específico (MANANDHAR *et al.*, 2021). O tempo e o meio de dissolução, como o ácido clorídrico (HCl) 0,05M, podem desempenhar um papel importante no mecanismo de liberação do fármaco conjugado ao polímero, afetando

a taxa e a extensão da liberação (SILVA *et al.*, 2019). Esse mecanismo é ilustrado na figura 25.

**Figura 25** – Representação do conjugado polímero-fármaco e seu mecanismo dependente do tempo e do meio de dissolução.



Fonte: AUTOR, 2023.

Mediante análise do perfil de dissolução, foi notado que o melhor meio o qual os sistemas microparticulados obtiveram maior liberação de flavonoides do extrato de própolis marrom, de acordo com a concentração de naringenina, é aquele contendo ácido clorídrico 0,05M, o qual foi adicionado tampão fosfato equimolar (pH 6,8) após 1 hora (linha cinza escuro), liberando 79% ao fim do teste, após 240 minutos, tendo característica mais próxima ao meio alcalino do fluido intestinal humano.

Esse resultado está de acordo com um estudo de Silva *et al.* (2017), o qual foi investigada a dissolução de flavonoides em diferentes meios simulados de fluido gástrico e fluido intestinal. Os resultados mostraram que a solubilidade e a taxa de liberação dos flavonoides foram afetadas pelas variações no pH e na concentração de sais nos diferentes meios. Observou-se que em meios de pH ácido, como o fluido gástrico, a solubilidade dos flavonoides foi reduzida, resultando em uma liberação mais lenta. Já em meios de pH alcalino, como o fluido intestinal, houve uma maior solubilidade e, conseqüentemente, uma liberação mais rápida dos flavonoides.

Entretanto, tal perfil de liberação não é similar ao meio contendo apenas tampão fosfato equimolar pH 6,8, o qual obteve o segundo pior perfil de liberação. Esse resultado pode ser explicado devido à influência inicial que o pH ácido ofertado pelo HCl 0,05M, contido no meio de melhor desempenho (linha cinza escura). Essa interferência é fundamental para que os flavonoides consigam ser desagregados da formulação e, assim, absorvidos pelo organismo. Em um estudo realizado por Souza *et al.* (2019), foi investigada a influência do meio de dissolução contendo ácido clorídrico (HCl) 0,05M seguido por tampão fosfato equimolar (pH 6,8) na liberação de flavonoides de uma formulação de liberação controlada. Os resultados mostraram que o meio ácido inicial contribuiu para a dissolução inicial dos flavonoides, promovendo uma liberação mais rápida durante a primeira hora. Após a adição do tampão fosfato, que ajustou o pH para 6,8, houve uma estabilização do meio de dissolução, resultando em uma liberação mais lenta e controlada dos flavonoides ao longo do tempo.

No entanto, é importante ressaltar que a resposta dos flavonoides à sequência de dissolução com meio ácido seguido por tampão fosfato pode variar de acordo com as características específicas dos flavonoides, como solubilidade, estabilidade e interação com a formulação. Portanto, é necessário realizar estudos específicos para cada caso, considerando as propriedades dos flavonoides e a formulação em questão (SOUZA *et al.*, 2019).

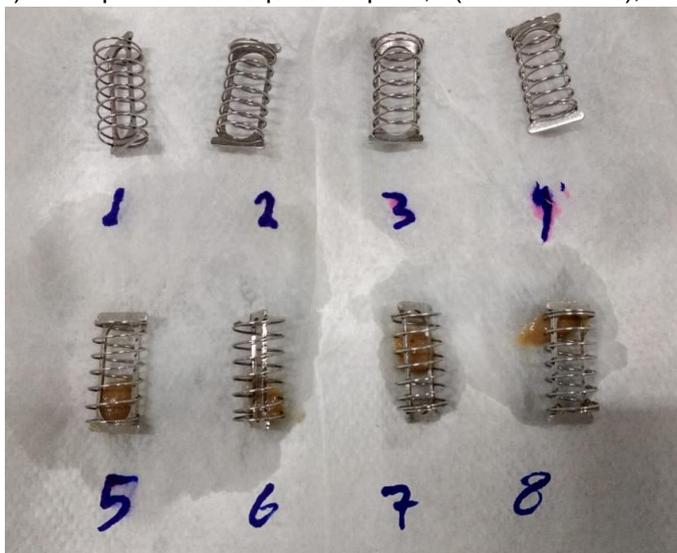
Por outro lado, percebe-se que o desempenho dos sistemas microparticulados no meio contendo água de osmose reversa e Tween 60 1% (linha azul escuro) foi inferior, ao fim do processo, comparado aos demais meios utilizados, liberando um teor máximo de 50% de flavonoides. Mesmo assim, essa liberação é importante, tendo em vista que presença de Tween 60 no meio de dissolução promove uma maior liberação dos flavonoides ao longo do tempo, em comparação com meio contendo apenas água. Isso pode ser atribuído à capacidade do Tween 60 em solubilizar os flavonoides e facilitar sua liberação a partir da matriz do sistema microparticulado (OLIVEIRA *et al.*, 2020).

Além disso, se avaliarmos o perfil de dissolução no meio contendo água e lauril sulfato de sódio 1% (linha vermelho claro) e no meio contendo ácido clorídrico 0,05M + SLS 1% (pH 1,5) (linha azul claro), percebemos um desempenho muito semelhante entre ambos até o tempo de 180 minutos de ensaio com liberação de aproximadamente 60% de flavonoides. Vale ressaltar que a partir desse tempo até o

fim do experimento, em 240 minutos, ocorre uma liberação maior de naringenina no meio contendo ácido clorídrico 0,05M + SLS 1%, totalizando 69%. De acordo com Almeida *et al.* (2019), a presença do meio contendo ácido clorídrico 0,05M e lauril sulfato de sódio 1% pode afetar a liberação de flavonoides, promovendo uma dissolução mais rápida dos compostos. Isso ocorre devido à ação do ácido clorídrico, que pode auxiliar na dissolução dos flavonoides, e do lauril sulfato de sódio, que melhora a solubilidade e a dispersão dos compostos na solução de dissolução (ALMEIDA *et al.*, 2019).

É observado que em todos os meios os sistemas microparticulados foram capazes de liberar de forma rápida os flavonoides, já após 30 minutos de dissolução. Essa liberação pode ser explicada, também, pelo efeito proporcionado pelos aditivos da formulação, celulose microcristalina e croscarmelose sódica (Explocel®) que estão desempenhando papel de agentes desintegrantes (ROWE; SHESKEY; QUINN, 2009). A liberação nos meios também podem ser justificadas pelo aspecto final das âncoras utilizadas no dissolutor para acondicionar as cápsulas durante os testes de dissolução podem ser observadas nas figuras 26, 27, 28, 29 e 30, respectivamente.

**Figura 26** – Aspecto final das âncoras ao final do ensaio de dissolução no meio com HCl 0,05M (âncoras 1 a 4) e Tampão fosfato equimolar pH 6,8 (âncoras 5 a 8), respectivamente.



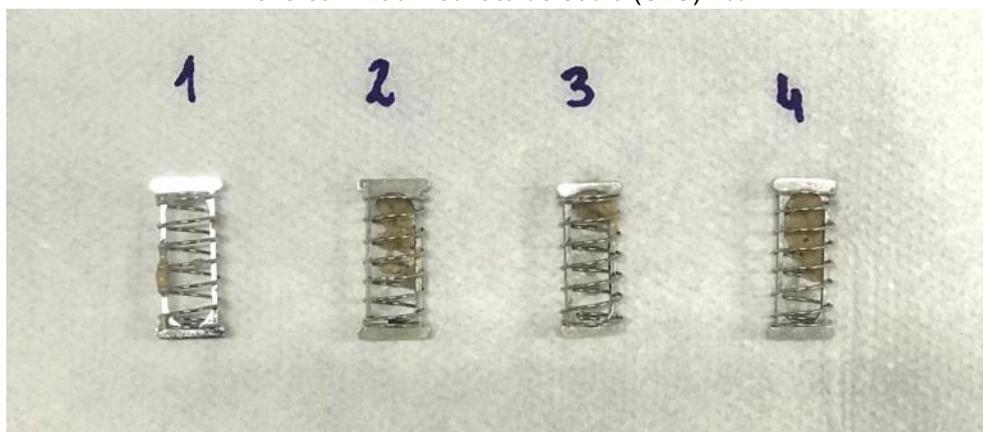
Fonte: AUTOR, 2022.

**Figura 27** – Aspecto final das âncoras ao final do ensaio de dissolução no meio com água e Tween 60 1%.



Fonte: AUTOR, 2022.

**Figura 28** – Aspecto final das âncoras ao final do ensaio de dissolução no meio com água osmose reversa + Lauril sulfato de sódio (SLS) 1%.



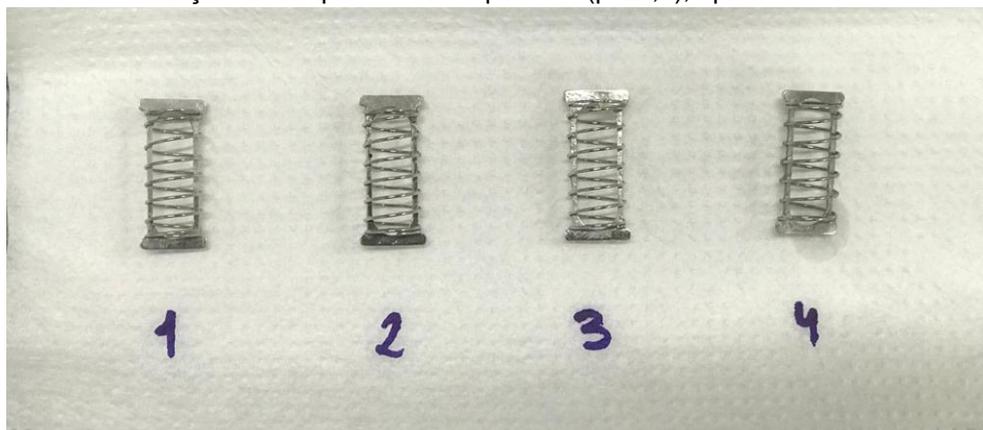
Fonte: AUTOR, 2022.

**Figura 29** – Aspecto final das âncoras ao final do ensaio de dissolução no meio com HCl 0,05M + SLS 1%.



Fonte: AUTOR, 2022.

**Figura 30** – Aspecto final das âncoras ao final do ensaio de dissolução no meio com HCl 0,05M + adição de tampão fosfato equimolar (pH 6,8), após 1 hora.



Fonte: AUTOR, 2022.

A utilização de diferentes materiais, como amido e gelatina, para o desenvolvimento de sistemas microparticulados pode afetar a taxa e a extensão da liberação dos flavonoides presentes no extrato de própolis. O dióxido de silício coloidal confere benefícios na proteção dos flavonoides contra fatores externos, como a umidade e a oxidação, além de também contribuir para tal liberação. Assim, a utilização de amido e da gelatina como matrizes poliméricas mostrou-se eficaz na proteção dos flavonoides contra a degradação e proporcionou uma liberação controlada dos compostos nos sistemas microparticulados ao longo do tempo. (CAMPOS *et al.*, 2020).

## 6 CONCLUSÃO

✓ Neste trabalho foi demonstrado que a atomização por *spray-dryer* foi eficaz para a incorporação da própolis marrom de União dos Palmares-AL.

✓ O extrato comercial de própolis marrom apresentou características antioxidantes semelhantes ao extrato de própolis verde comercial.

✓ Os sistemas obtidos apresentaram características de micropartículas evidenciadas na microscopia eletrônica de varredura.

✓ O teor de compostos fenólicos no extrato bruto foi maior em comparação com sistemas microparticulados contendo própolis marrom, provavelmente devido a interações entre compostos fenólicos e excipientes presentes nos sistemas microparticulados, em especial o excipiente proteico.

✓ O extrato comercial de própolis marrom foi revestido pelo material de parede (gelatina e amido), quando avaliado por FTIR.

✓ A gelatina e o amido foram capazes de fornecer proteção térmica do extrato contido nos sistemas microparticulados, quando estudou-se a análise térmica.

✓ Os sistemas microparticulados *spray-dryer* contendo própolis marrom possibilitaram a liberação controlada de flavonoides em diferentes meios, sendo o meio alcalino similar ao intestinal humano o de melhor desempenho.

✓ As micropartículas demonstraram ter baixa solubilidade em água, sendo possível melhorar seu perfil de dissolução e posteriormente sua absorção pelos fluidos gastrointestinais mediante adição de adjuvantes farmacotécnicos a fim de aumentar sua eficácia de liberação *in vitro*.

## REFERÊNCIAS

ACKERMANN, T. Reação de polimerização em cadeia. Disponível em: Acesso em: 03 nov. 2004. Fast Chromatographic study of propolis crudes. **Food Chemistry**, v. 42, p. 135-138, 1991.

ADELMANN, J. **Própolis: variabilidade composicional, correlação com a flora e bioatividade antimicrobiana/antioxidante**. Dissertação de mestrado em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Paraná. Curitiba. p.187. 2005.

ADHIKARI, B., HOWES, T., BHANDARI, B. R., TRUONG, V. Spray-drying for microencapsulation of bioactives. In **Microencapsulation in the Food Industry: A Practical Implementation Guide** (pp. 25-52). 2021.

AL-WAILI, N. S. Topical application of natural honey, beeswax and olive oil mixture for atopic dermatitis or psoriasis: partially controlled, single-blinded study. **Complementary therapies in medicine**, v. 20, n. 1-2, p. 1-6, 2012.

ALENCAR, S. M. *et al.* Chemical composition and biological activity of a new type of Brazilian propolis: Red propolis. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 113, n. 2, p. 278–283, 2007.

ALLEN JR., L.V.; POPOVICH, N. G.; ANSEL, H. C. **Formas Farmacêuticas e Sistemas de Liberação de Fármacos**; [tradução: Elenara Lemos-Senna *et al.*]; revisão técnica: Elenara Lemos-Senna. - 9. ed. - Porto Alegre: Artmed, 2013.

ALMEIDA, F. N. *et al.* Spray-drying microencapsulation of red propolis hydroalcoholic extract using different wall materials. **Journal of Microencapsulation**, v. 35, n. 6, p. 548-556, 2018.

ALMEIDA, V. *et al.* Development of oral solid dosage forms containing propolis: evaluation of the dissolution profiles of bioactive flavonoids. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 55, n. 1, p. e17977, 2019.

ALVES, A.; KUBOTA, E. H. Conteúdo de fenólicos, flavonoides totais e atividade

antioxidante de amostras de própolis comerciais. **Rev Ciênc Farm Básica Apl.**, 34(1):37. 2013.

ALVES, H. F. *et al.* Propolis anti-tumor action: a review and prospects. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 8, n. 2, p. 123-134, 2018.

ALVES, R. **Estudo termoanalítico e compatibilidade fármaco-excipiente de rifampicina e alguns medicamentos utilizados na terapêutica da tuberculose.** 2007. 90p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo. 2007.

AMARAL-MACHADO, L. *et al.* Brazilian red propolis: phytochemical screening, antioxidant activity and effect against cancer cells. **BMC complementary and alternative medicine**, v. 18, n. 1, p. 1-12, 2018.

AMARAL-MACHADO, L. *et al.* Red propolis: Chemical composition and antiproliferative activity on prostate cancer cells. **Journal of Medicinal Food**, v. 21, p. 429-436, 2018.

ARAGÃO, C. F. S.; MACEDO, R. O.; MEDEIROS, M. A. P.; VIANA, F. L. M.; SILVA, I. D. D.; MIRANDA, N. A. Estudo do comportamento termogravimétrico da *Aloe barbadensis* Mill (Liliaceae) e da *Conyza bonariensis* L (Compositae). **Bio Farma – Rev. Téc. Cient. Farm. Bioquím. Anál. Clín. Toxicol.**, v. 1, n. 3, p. 172-180, 2006.

AWALE, S. *et al.* Neoflavonoids and related constituents from nepalese propolis and their nitric oxide production inhibitory activity. **Journal of Natural Products**, v.68, n.6, p.858-864, 2005.

AZEVEDO, I. B. S.; SAMPAIO, R. F.; MONTES, J. C.; CONTRERAS, R. L. L. Tratamento de escaras de decúbito com própolis. **Rev Bras Enferm.**; 39(2/3):33-7. 1986.

BALASUNDRAM, N.; SUNDRAM, K.; SAMMAN, S. Phenolic compounds in plants and agriindustrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. **Food Chemistry**, v. 99, p. 191-203, 2006.

BAMMER, M. *et al.* Best Management Practices for Live Bee Removals in Florida: A

Beekeeper's Guide: ENY-2052/IN1297, **EDIS**, vol. 2020, no. 6, p. 14. 2012.

BANKOVA V. S.; CASTRO S. L., MARCUCCI M. C. Propolis recent advances in chemistry and plant origin. **Apidologie**, v.31, p.3 -15, 2000.

BANKOVA, V. Chemical diversity of propolis and the problem of standardization. **Journal of ethnopharmacology**, v. 100, n. 1-2, p. 114-117, 2005.

BANKOVA, V. *et al.* Chemical composition and antibacterial activity of Brazilian propolis. Z. **Naturforsch**, v. 55, n. 11-12, p. 785-789, 2000.

BANKOVA, V. *et al.* Chemical diversity of propolis and the problem of standardization. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 162, p. 376-387, 2014.

BANKOVA, V.; CHRISTOV, R.; STOEV, G.; POPOV, J. Determination of fenolic from propolis by capillary gas chromatography. **J. Chromatogr.**, v.607, p.150-153, 1992.

BANKOVA, V.; POPOV, S. MAREKOV, N. L. A study on flavonoids of propolis. **J. Nat. Prod.**, v.46, p.471-474, 1983.

BANKOVA, V.; POPOV, S. MAREKOV, N. L. Isopentenyl cinnamates from poplar buds and propolis. **Phytochemistry**, v.28, p.871-873, 1989.

BANSKOTA, A. H.; TEZUKA, Y.; ADNYANA, I. K.; *et al.* Cytotoxic, hepatoprotective and free radical scavenging effects of propolis from Brazil, Peru, the Netherlands and China. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 72, p. 239-246, 2000.

BANSKOTA, A. H.; TEZUKA, Y.; KADOTA, S. Recent progress in pharmacological and research of propolis. **Phytotherapy Research**, v. 15, p. 561-571, 2001.

BASNET, P.; MATSUNO, M.; NEIDLEIN, R. Potent free radical scavenging activity of propol isolated from Brazilian propolis. **Zeitschrift für Naturforschung**, v.52c, p.828-833, 1997.

BEECHER, G. R. Overview of dietary flavonoids: nomenclature, occurrence and intake. **Journal of Nutrition**, v.133, n.10, p.3248S-3254S, 2003.

BONHEVI, S. J. *et al.* The composition, active components and bacteriostatic activity of propolis in dietetics. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, Champaign, v.71, n.5, p.529-532. 1994.

BORRELLI, F. *et al.* Phytochemical compounds involved in the an ammatory effect of propolis extract. **Fitoterapia**. 73(7):S53-S63. 2002.

BOSIO, K.; AVANZINI, C.; D'AVOLIO, A.; OZINO, O.; SAVOIA, D. In vitro activity of propolis against *Streptococcus pyogenes*. **Letters in applied Microbiology**, v. 31, p. 174-177, 2000.

BOURGES, X., WEISS, J., SCHROËN, K. Microencapsulation by spray drying. In **Microencapsulation in the Food Industry: A Practical Implementation Guide** (pp. 53-80). 2021.

BOYANOVA, L.; GERGOVA, G.; N IKOLOV, R.; D EREJIAN, S.; LAZAROVA, E.; KATSAROV , N.; MITOV , I.; KRASTEVA, Z. Activity of Bulgarian propolis against 94 *Helicobacter pylori* strains in vitro by agar-well diffusion, agar dilution and disc diffusion methods. **Journal of Medical Microbiology**, v.54, n.5, p.481-483, 2005.

BRAND-WILLIAMS, W. *et al.* Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT-Food Science and Technology**, v. 28, n. 1, p. 25-30, 1995.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. L. W. T. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT-Food science and Technology**, v. 28, n. 1, p. 25-30, 1995.

BRETT, A. M. O., GHICA, M. E. Electrochemical oxidation of quercetin. **Electroanalysis**, 15, 1745-1750. 2003.

BREYER, E. U. **Abelhas e saúde**. 2ª ed. Porto União: Uniporto Gráfica e Editora Ltda; 1982.

BROWN, C. K. *et al.* Meeting report: FIP/AAPS Joint Workshop Report: Dissolution / In vitro Release Testing of Novel/Special Dosage Forms. **AAPS PharmSciTech**, 2011.

BURDOCK, G. A. Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (propolis). **Food Chem Toxicol** 36: 347-363. 1998.

CAMPOS, J. *et al.* Microencapsulation of Brazilian green propolis extract by spray drying: characterization, stability, and release profile. **Powder Technology**, v. 359, p. 363-372, 2020.

CASTALDO, S.; CAPASSO, F.. Propolis, an old remedy used in modern medicine. **Fitoterapia**, 73(1), S1–S6. 2002.

CASTRO, M. L. *et al.* Antitumor effect of Brazilian propolis fractions in a human larynx carcinoma cell line. **Oncology Reports**, v. 34, n. 3, p. 1378-1386, 2015.

CASTRO, M. L. *et al.* Própolis do sudeste e nordeste do Brasil: influência da sazonalidade na atividade antibacteriana e composição fenólica. **Química Nova** 30 (7) . 2007.

CAZAROLLI, L. H. *et al.* Evaluation of the antidiabetic activity of standardized extracts of *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC., *Bauhinia forficata* Link and *Myrcia sphaerocarpa* DC. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 18, n. 2, p. 203-211, 2008.

CERQUEIRA, F. M.; MEDEIROS, M. H, AUGUSTO, O. Antioxidantes dietéticos: controvérsias e perspectivas. **Quím Nova**; 30(2): 441-9. 2007.

CHEN, C. N. *et al.* Brazilian propolis suppresses angiogenesis by inducing apoptosis in tube-forming endothelial cells through inactivation of survival signal ERK1/2. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2011, p. 870753, 2011.

CLAUS, R.; KINSCHERF, R.; GEHRKE, C. Antiapoptotic effects of propolis extract and propol on human macrophages exposed to minimally modified low density lipoprotein. **Arzneimittelforschung**, v.50, p.373- 379, 2000.

COSTA, F. R. T. **Microscopia eletrônica de varredura: potencialidades e aplicações**. Monografia (bacharelado em química industrial). Universidade Federal

do Maranhão. São Luís, Maranhão. 2016.

COUTINHO, M. A. S.; MUZITANO, M. F.; COSTA, S. S. Flavonoides: potenciais agentes terapêuticos para o processo inflamatório. **Revista Virtual de Química**, v. 1, n. 3, p. 241-256, 2009.

CRUZ, A. P. G. **Avaliação do efeito da extração e da microfiltração do açaí sobre sua composição e atividade antioxidante**. Dissertação (mestrado em ciências). Instituto de Química, da Universidade Federal do Rio de Janeiro. 2008.

DANTAS SILVA, R. P. *et al.* Anticancer activity of Brazilian propolis and its isolated compounds: a review on their potential against human tumors. **Anticancer Agents in Medicinal Chemistry**, v. 19, n. 4, p. 409-424, 2019.

DAUGSCH, A. *et al.* Brazilian red propolis - Chemical composition and botanical origin. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 5, n. 4, p. 435-441, 2008.

DE MORAES, L. G. F. *et al.* Anticancer potential of Brazilian propolis on different neoplastic cell lines. **Brazilian Journal of Biological Sciences**, v. 6, n. 12, p. 225-232, 2019.

**desenvolvimento e controle de qualidade de medicamentos**. Trabalho de Conclusão de Curso (Especialização-Vigilância Laboratorial em Saúde Pública) - Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, CEFOR/SUS-SP, Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, 2019.

DEVASAGAYAM , T. P.; TILAK, J. C.; BOLOOR, K. K.; SANE, K. S.; GHASKADBI, S. S.; LELE , R. D. Freeradicals and antioxidants in human health: current status and future prospects. **Journal of the Association of Physicians of India**, v.52, p.794-804, 2004.

DIMOV, V. *et al.* Immunomodulatory action of propolis: IV. prophylactic activity against gram-negative infections and adjuvant effect of the water-soluble derivative. **Vaccine**, v. 10, n. 12, p. 817-823, 1992.  
extracts. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 21, n. 8, p. 614-621, 2008.

FAGUNDES, N. C. F. *et al.* Propolis and its constituent caffeic acid suppress the growth of HeLa cervical carcinoma cells via induction of apoptosis. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 210, p. 48-58, 2018.

FARMACOPEIA BRASILEIRA, ANVISA. 5 ed. Brasília: [s.n.]. 2010. Disponível em: <<http://antigo.anvisa.gov.br/documents/33832/260079/5%C2%AA+edi%C3%A7%C3%A3o+-+Volume+1/4c530f86-fe83-4c4a-b907-6a96b5c2d2fc>>.

FENG *et al.* Isolation and structure identification of flavonoids. **Flavonoids, from biosynthesis to human health**. Justino, G.C., Ed.; IntechOpen; pp. 17–43. London, UK. 2017.

FERNANDES, J. R. A.; LOPES, M. M. R.; COLOMBARI, V.; MONTEIRO, A. C. M.; VIEIRA, E. P. Atividade antimicrobiana de própolis de *Apis mellifera* obtidas em três regiões do **Brasil**. **Ciênc Rural**.; 36(1):294-7. 2006.

FERNANDES, JR. A.; LOPES, C. A. M.; SFORCIN, J. M.; FUNARI, S. R. C. Population analysis of susceptibility to propolis in reference strains of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. **J. Venom. Anim. Toxins**, Botucatu, v.3, p. 287-294, 1997.

FERNANDES, JR. A.; SUGIZAKI, M. F.; FOGO, M. L.; FUNARI, S. R. C.; LOPES, C. A. M. *et al.* In vitro activity of própolis against bacterial and yeast pathogens isolated from human infections. **J. Venom. Anim. Toxins**, Botucatu, v. 1, p. 63-69, 1995.

FRANCO, S. L.; BRUSCH, M.L.; MOURA, L. P. P.; BUENO, J. H. P. Avaliação Farmacognóstica da própolis da região de Maringá. **Rev Bras Farmacogn** 9: 1-10. 2000.

FRANESI, A. P. **Efeitos da própolis de abelhas africanizadas e meliponíneos em microrganismos**. Dissertação Mestrado – Universidade Estadual de São Paulo. 89p. 2007.

FREITAS, D. G. C. *et al.* Encapsulation of Brazilian green propolis extracts by spray-drying using chitosan nanoparticles as wall materials. **Food Research International**, v. 125, p. 108547, 2019.

FUNARI, C. S.; FERRO, V. O. Análise de Própolis. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, v. 26, n. 1, p. 171-178, jan. 2006.

GARCIA, R. C; SÁ, M. E. P.; LANGONI H, FUNARI, S. R. C. Efeito do extrato alcoólico de própolis sobre a *Pasteurella multocida* in vitro e em coelhos. **Acta Scientiarum: Animal Sciences**. 26(1):69-44. 2004.

GHALY, M. F.; EZZAT, S. M.; SARHAN; M. M.. Use of propolis and ultragriseofulvin to inhibit aflatoxigenic fungi. **Folia Microbiologica**. 43: 156-160. 1998.

GHASEMI, S. *et al.* Determination of total flavonoids content in some medicinal plants using spectrophotometric method. **Advanced Herbal Medicine**, v. 4, n. 3, p. 21-26, 2018.

GHAZANFARI, S. *et al.* Determination of flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. **Journal of Food Science and Technology**, v. 54, n. 7, p. 2052-2059, 2017.

GHISALBERTI, E.L. Própolis: a review. **Bee World**, v.60, p.59-84. 1979.

GRANGE, J. M.; DARVEY, R. W. Antibacterial properties of propolis (bee glue). **Journal of the Royal Society of Medicine**, 83, 159–160. 1990.

HAVSTEEN, B. H. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. **Pharmacology and Therapeutics**, v.96, n.2/3, p.67-202, 2002.

HAYACIBARA, M. F. *et al.* In vitro and vivo effects of isolated fractions of Brazilian propolis on caries development. **J Ethnopharmacol** 101: 110-115. 2005.

HELFENBERG, K.D.; **Chem. Ztg.** 31, 987. 1908.

HERMANN, G. H.; BRACAMONTE, J. A.; **Aerosol & Cosmet**, 75, 8. 1991.

HU, F. *et al.* Effects of ethanol and water extracts of propolis (bee glue) on acute inflammatory animal models. **J Ethnopharmacol** 100: 276-283. 2005.

IOIRISH, N.; **As Abelhas: Farmacêuticas com Asas**, Editora Mir: Moscou, p. 228. 1982.

IULIU, P.; **Patente No.** RO 48101. 1965.

JÚNIOR, C. R. Abelhas usando própolis verde produzida em Minas Gerais a partir de resinas do alecrim-do-campo. Foto de arquivo pessoal. Emater/MG. 2019. Disponível em: <<https://www.saberatualizadonews.com/2021/01/estudo-brasileiro-encontra-beneficios.html>>. Acesso em: 02 de fevereiro de 2023.

JUNQUEIRA, N. G. *et al.* Antitumor and immunomodulatory effect of Brazilian red propolis on human cancer cells. **Journal of Immunology Research**, v. 2018, 2018.

KALOGEROPULOS *et al.* Chemical composition, antioxidant activity and antimicrobial properties of propolis extracts from Greece and Cyprus. **Food Chemistry**. V.116, I. 2, 15, P. 452-461. 2009.

KHALED, W. A. M. **Displacement estimation analyses for reconstructive ultrasound elastography using finite-amplitude deformations**. Dissertação de pós-doutorado, Universidade de Bochum, Bochum, Alemanha. 2007.

KIMOTO, T. *et al.* Apoptosis and suppression of tumor growth bt artepillin-C extracted from Brazilian propolis. **Cancer Detect. Prev.**, Amsterdam, v.22, n.6, p.506-515, 1998.

KONISHI, S. *et al.* Análise da influência de agentes solubilizantes na atividade antimicrobiana de extratos de própolis e de uma formulação de spray hidroalcoólico. **Mensagem Doce**, n. 75, p. 22-25, 2004.

KOO, M. H.; PARK, Y. K. Investigation of flavonoid aglycones in propolis collected by two different varieties of bees in the same region. **Biosci. Biotech. Biochem.**, v.61, p.367-369, 1997.

KOSALEC, I.; PEPELJNJAK, S.; BAKMAZ, M.; VLADIMIR-KNEZEVIC, S. Flavonoid analysis and antimicrobial activity of commercially available propolis product. **Acta Pharm.** 55(1):423-430. 2005.

KROL, W. *et al.* Brazilian propolis: a natural product that improved the fungicidal activity by blood leukocytes and IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  release by these cells after in vitro treatment. **Journal of physiology and pharmacology**, v. 64, n. 2, p. 249-255, 2013.

KUANG, Y., CHEN, J., CHEN, X., LI, W. Insulin microencapsulation by spray drying: Influence of formulation and process parameters on insulin stability and release. **Powder Technology**, 331, 146-153. 2018.

KUJUMGIEV, A. *et al.* Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin. **Journal of Ethnopharmacol.**, Amsterdam, v.64, n.3, p.235-240, 1999.

KUMAZAWA, S.; HAMASAKA, T.; NAKAYAMA, T. Antioxidant activity of propolis of various geographic origins. **Food Chemistry**, v. 84, n. 3, p. 329–339, 2004.

LANGONI, H. *et al.* Efeito antimicrobiano in vitro da propolis. Congresso Ibero-latinoamericano de Apicultura, 4. Rio Cuarto, Argentina, **Anais...** Rio Cuarto, Argentina: Editora, p. 189-192. 1994.

LANGONI, H.; DOMINGUES, P. F.; FUNARI, C. J. *et al.* Efeito antimicrobiano in vitro da própolis. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.48, p. 227-229, 1996.

LIU, J. *et al.* Brazilian green propolis ethanol extract and its constituent, artepillin C inhibits proliferation and induces apoptosis in retinoblastoma cells. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2019, p. 3861507, 2019.

LU, L.; CHEN, Y.; CHOU, C. Antibacterial activity of propolis against *Staphylococcus aureus*. **Int J Food Microbiol**, 102, 213-220. 2005.

LU, Y.; WU, C.; YUAN, Z. Determination of hesperetin, cinnamic acid and nicotinic acid in propolis with micellar electrokinetic capillary chromatography. **Fitoterapia**, v.75, n.3/4, p.267-276, 2004.

LUSTOSA, S. R. *et al.* Própolis: atualização sobre a química e a farmacologia. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.18, n.3, jul./set. 2008.

MACHADO, H.; NAGEM, T. J.; PETERS, V. M.; FONSECA, C. S.; OLIVEIRA, T. T. Flavonoides e seu potencial terapêutico. **Boletim do Centro de Biologia da Reprodução**, v. 27, n.1/2, p. 33-39, 2008.

MANACH, C. *et al.* Polyphenols: food sources and bioavailability. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.79, n.5, p.727- 747, 2004.

MANANDHAR, S. *et al.* Polymer-Drug Conjugates as Nanotheranostic Agents. **Journal of Nanotheranostics**, v. 2, n. 1, p. 63–81, 13 mar. 2021.

MARCUCCI, M. C. *et al.* Espectroscopia UV-vis e reação com o radical DPPH para a detecção de flavonoides e determinação do potencial antioxidante de extratos de própolis. **Rev. Eletrôn. Ciên. Exatas**. v. 1, n. 1, p. 1–9, 2020.

MARCUCCI, M. C. Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity. **Apidologie**, v. 26, n. 2, p. 83-99, 1995.

MARCUCCI, M. C.; FERRERES, F.; VIGUERA, G. C.; BANKOVA, S.; CASTRO, S. L.; DANTAS, A. P.; VALENTE, P. H. M.; PAULINO, N. Phenolic compounds from Brazilian propolis with pharmacological activities. **Journal of Ethnopharmacology**. 74, 105-112. 2001.

MARCUCCI, M.C. Propriedades biológicas e terapêuticas dos constituintes químicos da própolis. **Química Nova**, 19, 529-535. 1996.

MARKHAM, K. R. Chemical methods used in flavonoid structure elucidation. In: \_\_o Techniques of flavonoid identification. London, **New York: Academic Press**, cap.5, p.62-70. (Biological techniques series). 1982.

MARQUELE, F. D. *et al.* Assessment of the antioxidant activities of Brazilian extracts of propolis alone and in topical pharmaceutical formulations. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.39, n.3/4, p.455-462, 2005.

MARUYAMA, H. *et al.* Antimicrobial components of propolis. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 57, n. 3, p. 501-504, 1993.

MATSUDA, A. H. **Caracterização e Controle de Qualidade de própolis proveniente de diversas regiões do Brasil**. Dissertação (mestrado em bromatologia). Instituto de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo. 2006.

MATSUDA, A. H.; MACHADO, L. B; MASTRO, N. L. Thermal analysis applied to irradiated propolis. **Radiat Phys Chem** 63: 353-355. 2002.

MENEZES, H. *et al.* Propolis: A complex natural product with a plethora of biological activities that can be explored for drug development. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2020, p. 1-31, 2020.

MENEZES, H. Própolis: Uma revisão dos recentes estudos de suas propriedades farmacológicas. **Arq. Inst. Biol.** 72: 405-411. 2005.

MOLYNEUX, P. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. **Journal of Science and Technology**, v. 26, n. 2, p. 211-219, 2004.

MOON, J. K.; SHIBAMOTO, T. Antioxidant assays for plant and food components. **Agric Food Chem**; 57(5): 1655-66, 2009.

MOREIRA, L. L. *et al.* In vitro antifungal activity of Brazilian propolis against *Candida* species. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2016, p. 1-8, 2016.

MORENO, M. I. N.; ISLA, M. I.; SAMPIETRO, A. R.; VATTUONE, M. A. Comparison of the free radical scavenging activity of propolis from several regions of Argentina. **Journal of Ethnopharmacology**, v.71, p.109- 114, 2000.

MOTOMURA, M. *et al.* Brazilian propolis induces apoptosis-like cell death in human leukemia cells. **International Immunopharmacology**, v. 11, n. 10, p. 1387-1396, 2011.

MOURA, S. A. C *et al.* Brazilian red propolis: promising antitumor activity on human breast cancer cells. **Journal of ethnopharmacology**, v. 221, p. 1-8, 2018.

MOURA, S. *et al.* Determination of total flavonoids in Brazilian propolis by UV-Vis spectrophotometry. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 29, n. 8, p. 1650-1657, 2018.

NAGAI, T.; INOUE, R.; INOUE, H.; SUZUKI, N.; FUJITA, M.; NAGASHIMA, T. Effects of topical application of propolis on dental caries in rats. **Caries Research**, v. 36, p. 281-286, 2002.

NAGAY, M.; GRANCAI, D. Colorimetric determination of flavanones in propolis. **Pharmazie**, Eschborn, v.51, n.2, p.100-101, 1996.

NIEVA MORENO, M. I.; ISLAA, M. I.; CUDMANIB, N. G.; VATTUONEA, M. A.; SAMPIETRO, A.R. Screening of antibacterial activity of Aimacha del Valle (Tucumán, Argentina) propolis. **Journal Ethnopharmacology**, 68(1- 3):97-102. 1999.

OLIVEIRA, C. A. *et al.* Development and characterization of microencapsulated flavonoids for application in functional foods. **Food Chemistry**, v. 312, p. 126098, 2020.

OLIVEIRA, C. A. C. *et al.* The use of propolis against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). In: MÉNDEZ-VILAS, A. (ed.). Microbial pathogens and strategies for combating them: science, technology and education. **Formatex Research Center**, p. 645-652. 2020.

OLIVEIRA, C. L. **Teste de Dissolução: conceitos, aplicações e relevância no desenvolvimento e controle de qualidade de medicamentos.** Trabalho de Conclusão de Curso (Especialização-Vigilância Laboratorial em Saúde Pública) - Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, CEFOR/SUS-SP, Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, 2019.

OLIVEIRA, F. P.; LIMA, E. O.; SIQUEIRA JÚNIOR, J. P.; SOUZA, E. L.; SANTOS, B. H. C.; BARRETO, H. M. Effectiveness of *Lippia sidoides* Cham. (Verbenaceae) essential oil in inhibiting the growth of *Staphylococcus aureus* strains isolated from clinical material. **Rev. Bras. Farmacogn.** 16, 510-516. 2006.

OLIVEIRA, G. L. S. Determinação da capacidade antioxidante de produtos naturais in vitro pelo método do DPPH•: estudo de revisão. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 17, n. 1, p. 36–44, jan. 2015.

OLIVEIRA, G. L. S. Determinação da capacidade antioxidante de produtos naturais in vitro pelo método do DPPH•: estudo de revisão. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 17, p. 36-44, 2015.

OLIVEIRA, J.; MOMESSO, L. S. **Própolis: fontes, composição química e ações.** Curso de Farmácia, Faculdades Integradas de Ourinhos. Ourinhos, São Paulo. p.9. 2018.

OLIVEIRA, M. A. DE; YOSHIDA, M. I.; GOMES, E. C. DE L. Análise térmica aplicada a fármacos e formulações farmacêuticas na indústria farmacêutica. **Quím. Nova**, v. 34, n. 7, p. 1224-1230, 11.

ORIHUELA-ALONSO, M. A. *et al.* Propolis, a natural product with antimicrobial activity. **Revista Latinoamericana de Microbiología**, v. 53, n. 3-4, p. 129-139, 2011.

ORSI, R. O. *et al.* Susceptibility profile of *Salmonella* against the antibacterial activity of propolis produced in two regions of Brazil. **J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis.**, Botucatu, vol. 11, n. 2, p. 109-116, 2005.

ORSI, R.D.; SUGUIO, K.; SAKAMOTO, I.K.; SALDANHA, E.T.; FUNARI, S.R.C.; GOMES, E.; HASSAN, W. Propolis and saliva in the prevention of dental caries. **New Microbiologica**, v. 34, p. 53-60, 2011.

OYAIZU, M.; OGIHARA, H.; FUJIMOTO, Y. Antioxidative activity of extracts from propolis. **Journal of Japan Oil Chemists' Society**, v.48, p.135-138, 1999.

OZKUL, Y.; SILICI, S.; ERÖGLU, E. The anticarcinogenic effect of propolis in human lymphocytes culture. **Phytomedicine** 12: 742-747. 2004.

PACKER, J. F.; LUZ, M. M. S. Método para avaliação e pesquisa da atividade antimicrobiana de produtos de origem natural. **Rev. Bras. Farmacogn.** 17(1), 102-107. 2007.

PANZIERA, F. B., DORNELES, M. M., DURGANTE, P. C., SILVA, V. L. Avaliação da ingestão de minerais antioxidantes em idosos. **Rev Bras Geriatr Gerontol**; 14(1): 49-58, 2011.

PARK, Y. K.; ALENCAR, S. M.; SCAMPARINE, A. R. P.; AGUIAR, C. L. . Própolis produzida no sul do Brasil, Argentina e Uruguai: Evidências fitoquímicas de sua origem vegetal. **Ciência Rural** 2: 997-1003. 2002.

PARK, Y. K.; IKEGAKI, M.; ALENCAR, S. M.; MOURA, F. F.; **Honeybee Sci.** 21, 85. 2000.

PARK, Y. K.; KOO, M. H., SATO, H. H.; CONTADO, J. L. Estudo de alguns componentes da própolis coletada por *Apis mellifera* no Brasil. **Arq. Biol. Tecnol.**, v.38, p.1253- 1259, 1995.

PARK, Y. K; KOO, M. H.; IKEGAKI, M.; CONTADO, J. L. Comparison of the flavonoid aglycone contents of *Apis mellifera* propolis from various regions of Brazil. **Arq. Biol. Tecnol.**, v.40, p.97-106, 1997.

PARK, Y. P., IKEGAKI, M., ABREU, J. A. S.; ALCICI, N. M. F. Estudo da preparação dos extratos de própolis e suas aplicações. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 18 (3), p. 1998b.

PAULINO, N. *et al.* Cytotoxicity and apoptotic effects of polyphenolic compounds from Brazilian propolis on human leukemic cells. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 214, p. 293-303, 2018.

PAULINO, N. *et al.* Evaluation of the analgesic and anti-inflammatory effects of a Brazilian green propolis. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 120, p. 372-377, 2008.

PEPEJNJAK, S.; JALSENJAK, I.; MAYSINGER, D. Flavonoid content in propolis extract and growth inhibition of *Bacillus subtilis*. **Pharmazie**, Eschborn, v.40, n.2, p.122-123, 1985.

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

PEREIRA, D. S. *et al.* Histórico e principais usos da própolis apícola. **Agropecuária Científica no Semi-Árido**, V. 11, n. 2, p. 01-21, abr – jun. 2015.

PEREIRA, T. M. M. **Caracterização térmica (TG/DTG, DTA, DSC, DSC-fotovisual) de hormônios bioidênticos (estriol e estradiol)**. Dissertação (mestrado em ciências farmacêuticas). Universidade Federal do Rio Grande do Norte. 2013.

PERUCHI, C. M. S.; SILVA, E. B.; ANDRADE, R. A.; FRANCO, S.L.; RAMATHO, L. T. O. Efecto del propóleos en la cicatrización de lesiones subcutáneas inducidas en el dorso de ratones: estudio histológico. **Rev Fac Odontol Univ Chile.**;19(2):23-34. 2001.

PINELA, J. V. S. **Efeito do processo de secagem no potencial antioxidante e na composição fitoquímica de plantas medicinais da família Fabaceae**. Dissertação (mestrado em biotecnologia). Escola Superior Agrária de Bragança. 2012.

PINTO, L. M. A. DO PRADO, N. R. T. DE CARVALHO, L. B. Propriedades, usos e aplicações da própolis. **Revista Eletrônica de Farmácia** Vol. VIII (3), 76 - 100, 2011.

PINTO, M. S.; FARIA, J. E.; CASSINI, S. T. *et al.* Curva de sobrevivência de bactérias isoladas do leite de vacas com mastite a três extratos etanólicos de própolis. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v. 10, n. 1, p. 21-26, 2003.

PINTO, M. S.; FARIA, J. E.; MESSAGE, D. *et al.* Efeito de extratos de própolis verde sobre bactérias patogênicas isoladas do leite de vacas com mastite. **Brazilian Journal of Veterinary Animal Science**, v. 38, n. 6, p. 278-283, 2001.

POPOVA, M. *et al.* Chemical characteristics of poplar type propolis of different geographic origin. **Apidologie**, v. 48, n. 1, p. 776-787, 2017.

PORTILHO, D. R. *et al.* Avaliação da Atividade Antibacteriana e Antifúngica da Própolis Produzida no Estado do Tocantins. **Revista Científica do Itpac**, Araguaína, v. 6, n. 2, 2013.

RAMOS, M. F. S. **Reação de polimerização em cadeia**. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brasil, 1995.

RIBEIRO, V. H. *et al.* Characterization of propolis encapsulated by spray drying using sodium alginate as wall material. **Food and Bioprocess Technology**, v. 10, n. 7, p. 1354-1362, 2017.

ROCHA, L. *et al.* Otimização do processo de extração de própolis através da verificação da atividade antimicrobiana. **Rev Bras Farmacogn** 13: 71-74. 2003.

ROJAS, N. M. Premisas necesarias para la elaboracion de medicamentos antimicrobianos a base de propoleo. *In*: ASIS, M. Investigaciones cubanas sobre el propoleo: Memorias del 1o Simposio sobre los efectos del propoleo en la salud humana y animal, 1988. Varadero. **Matanzas: Consejo Cientifico del Instituto de Medicina Veterinaria**, Cuba, p. 256-259. 1989.

ROJAS-SANDOVAL, J. *Apis mellifera* (European honeybee). **CABI Compendium**. CABI International. doi: 10.1079/cabicompendium.6359. 2022.

ROUSSIS, I. G. *et al.* Antioxidant activities of some Greek wines and wine phenolic extracts. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 21, n. 8, p. 614-621, 2008.

ROWE, R. C.; SHESKEY, P. J.; QUINN, M. E. **Handbook of Pharmaceutical Excipients**. In: pharmaceutical press. [s.l: s.n.]. v. 6p. 917.

SAHINLER, N. & KAFTANOGLU, O. Natural product propolis: chemical composition. **Natural Product Research**, v.19, n.2, p.183-188, 2005.

SALATINO, A. *et al.* Phenolic compounds and antioxidant activity of Brazilian propolis from São Paulo State. **Zeitschrift für Naturforschung C**, v. 60, n. 3-4, p. 278-283, 2005.

SALATINO, A.; T EIXEIRA, E. W.; NEGRI, G.; MESSAGE, D. Origin and Chemical Variation of Brazilian Propolis. **Evidencebased Complementary and Alternative Medicine**, v.2, n.1, p.33-38, 2005.

SANTOS, D. A. *et al.* Spray-drying of brown propolis extract: influence of inlet air temperature and maltodextrin concentration. **Food Science and Technology**, v. 40, n. 2, p. 430-436, 2020.

SANTOS, M. J.; VIANNA, L. A. C; GAMBA, M. A. Avaliação da eficácia da pomada de própolis em portadores de feridas crônicas. **Acta Paul Enferm**; 20(2):199-204. 2007.

SANTOS, S. A. O. *et al.* Espectroscopia UV-Vis e suas aplicações em análise quantitativa. **Química Nova**, v. 40, n. 6, p. 672-680, 2017.

SAWICKA, D. *et al.* Polyphenolic compounds of propolis: the role of bees and plants. **Molecules**, v. 25, n. 24, p. 5999, 2020.

SEABRA, R. M., *et al.* Antioxidant compounds extracted from several plant materials. In: Fingerman M, Nagabhushanam R. **Biomaterials from aquatic and terrestrial organisms**. Enfield (NH) USA: Science, 115-174. 2006.

SFORCIN, J. M.; FERNANDES, A.; JR. LOPES, C. A. M.; FUNARI, S. R. C.; BANKOVA, V. Seasonal effect of Brazilian propolis on *Candida albicans* and *Candida tropicalis*. **Journal of Venomous Animals and Toxins**. 7, 139-144. 2001.

SHAHIDI, F.; AMBIGAIPALAN, P. Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: antioxidant activity and health effects – A review. **Journal of Functional Foods**, v. 18, Part B, p. 820-897, 2015.

SHIMIZU, T.; HINO, A.; TSUTSUI, T.; PARK, Y.K.; WATANABE, W.; KUROKAWA, M. Anti-influenza virus activity of propolis in vitro and its efficacy against influenza infection in mice. **Antiviral Chemistry & Chemotherapy**, v. 26, p. 389-396, 2016.

SILVA, A. *et al.* Aplicações da microscopia eletrônica de varredura (MEV) em ciências dos materiais. **Revista Brasileira de Engenharia de Materiais**, v. 5, n. 2, p. 61-70, 2018.

SILVA, A. *et al.* Application of UV–Vis spectrophotometry in the characterization of propolis samples. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 128, p. 852-856, 2014.

SILVA, A. *et al.* Influence of simulated gastrointestinal fluids on the solubility and dissolution behavior of flavonoids. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 531, n. 1, p. 245-254, 2017.

SILVA, B. B. *et al.* Chemical composition and botanical origin of red propolis, a new type of Brazilian própolis. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, 5,313-316. 2007.

SILVA, J. M. S. *et al.* Antifungal activity of Brazilian propolis microparticles against *Candida* species. **Journal of Applied Microbiology**, v. 124, n. 6, p. 1469-1480, 2018.

SILVA, R. O. *et al.* Brazilian propolis accelerates mouse skin wound healing by modulating inflammation and angiogenesis. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2011, p. 423809, 2011.

SILVA, T. M. S. *et al.* Caracterização físico-química de própolis de diferentes regiões do estado do Rio Grande do Norte, Brasil. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 19, n. 3, p. 1-8, 2017.

SILVERSTEIN, R. M.; BASSLER, G. C.; MORRILL, T. C. **Spectrometric Identification of Organic Compounds**. 7. ed. New York: John Wiley & Sons, 1994.

SINGLETON, V. L. *et al.* Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. **Methods Enzymology**. V.299, p.152 -178, 1999.

SIQUEIRA, A. B. S. **Perfil enzimático de dermatófitos e avaliação da atividade antifúngica de própolis e lectinas**. – Tese de doutorado, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brasil, 2008.

SIQUEIRA, A. L. **Estudo da ação antibacteriana do extrato hidroalcoólico de própolis vermelha sobre *Enterococcus faecalis*** – Dissertação de mestrado, Universidade Tiradentes, Aracaju, SE, Brasil, 2008.

SOARES, S. F. C. *et al.* Propolis and its constituent caffeic acid suppress LPS-stimulated pro-inflammatory response by blocking NF- $\kappa$ B and MAPK activation in macrophages. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 226, p. 95-106, 2018.

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

SOUZA, J. *et al.* Avaliação da dissolução in vitro de formas farmacêuticas sólidas: uma revisão. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 100, n. 2, p. 222-231, 2019.

SUN, F.; H AYAMI, S.; HARUNA, S. In vivo antioxidative activity of propolis evaluated by the interaction with vitamins C and E and the level of lipid hydroperoxides in rats. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.48, p.1462-1465, 2000.

TEIXEIRA, E. W.; NEGRI, G.; MEIRA, R. M.; MESSAGE, D.; SALATINO, A. Plant Origin of Green Propolis: Bee Behavior, Plant Anatomy and Chemistry. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v.2, n.1, p.85- 92, 2005.

TOSI, B.; DONINI, A.; ROMAGNOLI, C. E.; BRUNI, A. Antimicrobial activity of some comercial extracts of propolis prepared with different solvents. **Phytotherapy research: PTR**, 1014, 335-336. 1996.

TURECK, C. *et al.* Evaluation of the Brazilian population's intake of antioxidant nutrients and their relation with the nutritional status. **Rev Bras Epidemiol JAN-MAR**; 20(1): 30-42. 2017.

VALDERRAMA, L. A. *et al.* Spray drying microencapsulation of green propolis extract using different encapsulating agents: physicochemical characterization, stability, and bioactivity. **Food Science and Technology**, v. 39, n. 3, p. 708-716, 2019.

VALKO, M.; LEIBFRITZ, D.; MONCOL, J.; CRONIN, M. T.; MAZUR, M.; TELSER, J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **Int J Biochem Cell Biol**; 39(1): 44-84, 2007.

VARGAS, A. C; LOGUERCIO, A. P.; WITT, N. M. *et al.* Atividade antimicrobiana in vitro de extrato alcoólico de própolis. **Ciência Rural**, v.34, n.1, p.159-163, 2004.

VERSCHUEREN, M.; STRAATSMA, J.; SCHUTYSER, M.; AKKERMAN, C.; DE JONG, P. New tools to optimise spray dryers. **New food**, issue 2. 2007.

VYNOGRAD, N. *et al.* A comparative multi-centre study of the efficacy of propolis, acyclovir and placebo in the treatment of genital herpes (HSV). **Phytomedicine**, v. 7, n. 1, p. 1-6, 2000.

WOISKY, R. G.; GIESBRECHT, A. M; SALATINO, A. Actividade Antibacteriana de uma Formulação preparada a partir de Própolis de Apis mellífera L. **Actas del IV Congreso Iberoamericano de Apicultura**. I Foro ExpoComercial Internacional de Apicultura. Rio Cuarto. Córdoba. Argentina. p. 213-216, 1994.

WOISKY, R. G.; SALATINO, A. Analysis of propolis: some parameters and procedures for chemical quality control. **J Apicult Res** 37: 99-105. 1998.

ZIMMERMANN, A. M.; KIRSTEN, V. R. Alimentos com função antioxidante em doenças crônicas: uma abordagem clínica. **Disc Scientia**; 9(1): 51-68. 2008.

ZUANAZZI, J. A. S. Flavonoides. In: SIMÕES, C.M.O. *et al.*, orgs. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre: UFRG; Florianópolis: UFSC. cap.23, p.489-516. 1999.

ZUANAZZI, J. A. Z., MONTANHA, J. A. . Flavonóides. In: Simões CMO, Schenkel EP, Gosmann G, Mello JCP, Mentz LA, Petrovick PR (Org.). **Farmacognosia da planta ao medicamento**. Porto Alegre/Florianópolis: UFRGS/UFSC, p. 576-614. 2003.