



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
ESCOLA DE ENFERMAGEM E FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

CLINSTON PAULINO DE ALMEIDA

Obtenção e Caracterização de Microencapsulados de Caseinatos carregados com
Extrato de Própolis Vermelha

Maceió/AL

2017

CLINSTON PAULINO DE ALMEIDA

Obtenção e Caracterização de Microencapsulados de Caseinatos carregados com Extrato de Própolis Vermelha

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

Orientador(a): Prof. Dr. Ticiano Gomes do Nascimento.

Maceió/AL

2017

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico
Bibliotecária responsável: Valter dos Santos Andrade

A447o Almeida, Clinston Paulino de.

Obtenção e caracterização de microencapsulados de caseinatos carregados com Extrato de própolis vermelha / Clinston Paulino de Almeida. – 2017.
71 f.

Orientadora: Luciano Aparecido Meireles Grillo.
Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal de Alagoas. Escola de Enfermagem e Farmácia. Maceió, 2017.

Bibliografia: f. 65-71.

1. Caseína. 2. Própolis vermelha. 3. Caseinatos. 4. Microencapsulação.
5. Spray-dryer . I. Título.

CDU: 615.453

Folha de Aprovação

CLINSTON PAULINO DE ALMEIDA

Obtenção e Caracterização de Microencapsulados de Caseinatos carregados com Extrato de Própolis Vermelha

Dissertação submetida ao corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Alagoas e aprovada em (dia) de (mês) de (ano).



Prof. Dr. Ticiano Gomes do Nascimento, UFAL (Orientador)

Banca Examinadora



Prof.ª Dr.ª Ana Flavia Oliveira Santos (Examinador Externo)



Prof.ª Dr. Inaldo Diniz Basílio Júnior (Examinador Interno)

Dedico a todos que me incentivaram e que direta ou indiretamente
contribuíram para elaboração do trabalho.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por se fazer presente e por fazer com que minhas idealizações fossem suas vontades.

À minha família, por compreender o sentido profissional e pessoal da realização deste trabalho.

Aos meus tios João e Divanuzia, pelo incentivo e por acreditarem em todos os meus sonhos.

À minha filha Maria Antônia, razão do meu viver, a chama de todos os meus sonhos, a menina que em minha vida é sinônimo de motivação e dedicação.

A todos os amigos, pelo incentivo constante, pela compreensão e pelo apoio em todas as etapas. Obrigado pela presença e pelas palavras de motivação.

A meu orientador, Professor Dr. Ticiano Gomes do Nascimento, por ter me acolhido com sua generosidade e pela forma sutil e dedicada com que ensina. A maneira simples de encarar os obstáculos, sem menosprezá-los e o seu olhar crítico e sensato fizeram toda diferença na minha formação. Obrigado pela convivência e paciência durante esses dois anos.

À Professora Dra. Ana Flávia Oliveira Santos, pelo aceite em participar da banca de defesa, por ter participado da banca de qualificação e por toda dedicação à correção do meu trabalho.

Ao Professor Dr. Irinaldo Diniz Basílio Júnior pelo aceite em participar da banca de defesa, contribuindo com todo seu conhecimento.

À Professora Dra. Camila Braga Dornellas pela participação na banca de qualificação e pelas discussões e sugestões tão proveitosas.

À Professora Dra. Izabel Cristina Celerino de Moraes Porto pela participação na banca de qualificação e pelas discussões e sugestões tão proveitosas.

Ao Professor Dr. Alfredo Dias de Oliveira Filho, por me acompanhar na etapa de seleção para ingresso no PPGCF e pelos ensinamentos que me proporcionou.

Aos colegas de turma por tornar os dias mais fáceis durante o processo de formação, pelo entusiasmo contagiante, pela presteza e ajuda sempre tão disponível.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Escola de Enfermagem e Farmácia da Universidade Federal de Alagoas por permitir a concretização de um ideal.

Aos colaboradores da pesquisa, que contribuíram com a realização de análises: Josiel Santos, Antônio Thomás, Valdemir Costa, Tamires Andrade, Camila Camerino e Janaina Menezes. Obrigado pelas contribuições.

Aos companheiros de laboratório, Amanda Barbosa, Adriana Santos e Felipe Leão pelo auxílio na pesquisa e na realização de análises. Obrigado pela ajuda.

Ao companheiro de longas datas Abner Magalhães Nunes (BOKUS), pelo incentivo e pelas palavras de apoio. Obrigado.

Aos professores, Luciano Grillo, Camila Dornellas, Irinaldo Diniz, Mônica Meira, Zenaldo Porfirio, por liberar suas equipes e laboratórios para realização de teste durante a etapa de caracterização.

A todos os meus amigos e àqueles que passaram por mim durante essa fase da minha vida e que de uma forma ou de outra contribuíram para meu crescimento pessoal e para realização deste trabalho.

A FAPEAL e a CAPES agencias responsáveis pelo financiamento do projeto por meio de bolsa de estudo.

“Não é o mais forte nem o mais inteligente que sobrevive. É o
mais adaptado às mudanças.”

Charles Darwin

“A mente que se abre a uma nova idéia jamais voltará ao
seu tamanho original.”

Albert Einstein

RESUMO

A própolis é uma substância resinosa quimicamente complexa e rica em metabólitos secundários que lhe conferem uma vasta aplicação terapêutica frente a atividades, antimicrobianas, antioxidante, anticariogênica, anti-inflamatória e que quando associada a alimentos conferem a estes o caráter funcional. No entanto, sua aplicação se torna limitada devido suas características, como a baixa solubilidade e a desagradável adstringência, sendo necessária a utilização de mecanismos que sejam capazes de reverter e melhorar essas características indesejáveis. Diante disso, as indústrias farmacêuticas e alimentícias lançam mão dos processos que buscam fazer o beneficiamento e oferecer produtos enriquecidos com própolis que atendam a demanda e a necessidade de suas aplicações. Uma alternativa para o beneficiamento da própolis é aplicação de técnica de microencapsulação em spray-dryer, que consistem em incorporar o bioativo a uma matriz que seja capaz de conferir ao material encapsulado as características desejáveis industrialmente para o bioproduto. As diversas formas de caseínas vêm sendo aplicadas como agente encapsulante, isso acontece devido a sua estrutura ser físico-quimicamente favorável dentro dos diversos sistemas biológicos. Com isso o presente trabalho teve como objetivo a obtenção e caracterização de caseinatos, e buscou desenvolver micropartículas para aplicabilidade terapêutica ou funcional. Formada a solução caseína-própolis, a secagem foi realizada em spray-dryer seguindo parâmetros preestabelecido. Na etapa de caracterização foram aplicadas técnicas físico-químicas (tamanho de partícula, potencial zeta, FTIR, TG e DTA). A morfologia das micropartículas foi observada por MEV e a integridade da proteína no microencapsulado foi vista com auxílio de gel de acrilamida por técnica de eletroforese. A atividade antioxidante foi medida por ligação ao radical DPPH e a atividade antimicrobiana foi avaliada quanto a inibição de crescimento frente a cepas de *Pseudomonas aeruginosas* e *Stafilococcus aureus*. Os complexos formados foram submetidos a estudo de dissolução em diferentes meios (água osmose reversa e tampão fosfato pH 7,4) e agitação de 100 e 150 rpm. Com a caracterização físico-química foi possível constatar por meio de espectroscopia no infravermelho e análise térmica (TGA e DTA) a interação caseína-própolis e a formação das micropartículas que apresentaram população de partículas micrométricas (1186nm - 5463nm) e população sub-micrométricas (72nm - 715nm), mostrando serem estáveis quando em solução com potencial zeta entre -33,0 e -41,9 mV. O MEV revela partículas esféricas sem aparente porosidade ou formação de aglomerados. A eletroforese revelou bandas típicas da caseína confirmando a não degradação da proteína por parte da secagem. A capacidade antioxidante foi superior a 50%. No ensaio microbiológico por difusão em disco e em meio ágar as composições apresentaram halos de inibição entre 8 e 24 mm. No perfil de dissolução mostrou ser um complexo altamente solúvel em água com liberação imediata, principalmente em meio tampão fosfato pH 7,4 e água osmose reversa.

Palavras-chave: Caseína. Própolis. Caseinatos. Microencapsulação. spray-dryer.

ABSTRACT

The propolis is a resinous substance, chemically complex and rich in secondary metabolites that confer it to a vast therapeutic application against the activities, such as: the antimicrobial, antioxidant, anticariogenic, anti-inflammatory, and that when it associated to foods, it confers them to the functional character. However, its application becomes limited because of its characteristics, such as the low solubility and the unpleasant astringency, being therefore necessary the use of mechanisms that are capable of reverting and improving these undesirable characteristics. Due to this, the pharmaceutical and food industries take hold of the processes that seek to beneficiate and offer products enriched with propolis that meet the demand and the necessity of their applications. An alternative for the beneficiation of the propolis is the application of a microencapsulation technique in spray-drying, which consists in incorporating the bioactive into a matrix that is capable of conferring to the encapsulated material to the industrially desirable characteristics for the bioproduct. The various forms of caseins have been applied as an encapsulating agent, this happens because of its physico-chemically favorable structure within the various biological systems. Thus, this work had as objective to obtain and characterize caseinates, and sought to develop microparticles for the therapeutic or functional applicability. After forming the casein-propolis solution, the drying was carried out in a spray-dryer following pre-established parameters. In the characterization stage, physico-chemical techniques (particle size, zeta potential, FTIR, TGA and DTA) were applied. The microparticle morphology was observed by SEM and the integrity of the protein in the final product (propolis-casein complex) was seen with the help of acrylamide gel through the electrophoresis technique. The antioxidant activity was measured by connecting it to the radical DPPH and the antimicrobial activity was evaluated for the growth inhibition of the *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* strains. The complex was formed and submitted to a study of dissolution in different media (reverse osmosis water and phosphate buffer pH 7.4) and agitation at 100 and 150 rpm. With the physicochemical characterization; it was possible to identify, through spectroscopy in the infrared and thermal analysis (TGA and DTA), the interaction between casein-propolis and the formation of the microparticles that showed a population of micrometric particles (1186nm - 5463nm) and a sub-micrometric population (72nm - 715nm), proving to be stable when they are in a solution with a zeta potential between -33.0 and -41.9 mV. The SEM reveals spherical particles with no apparent porosity or formation of agglomerates. The electrophoresis revealed typical casein bands confirming the non-degradation of the protein through the drying. The antioxidant capacity was higher than 50%. Inhibition halos presented between 8 to 24 mm in the microbiological test through disc diffusion and in agar medium the compositions. In the dissolution profile, it showed to be a highly soluble complex in water with immediate release, mainly in a pH 7.4 phosphate buffer medium and reverse osmosis water.

Keywords: Casein. Propolis. Caseinates. Microencapsulation. Spray-drying.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Coleta de resina da <i>Dalbergia ecastophyllum</i> (rabo-de-bugio) efetuada por abelhas da espécie <i>Apis mellifera</i>	21
Figura 2 – Modelo esquemático da micela de caseína (caseína - PO_4^{3-} - Ca^{2+} - PO_4^{3-} - caseína)	23
Figura 3 – Esquema do Processo de Secagem em Spray-Dryer: obtenção de micropartículas	26
Figura 4 – Espectro Eletromagnético e a Excitação Molecular	29
Figura 5 – Curva de calibração com o flavonoide naringenina	42
Figura 6 – Formulações Obtidas no Processo de Secagem	43
Figura 7 – Fotomicrografia das formulações: CSSD (A); CSSPV 10% (B); CSPV 18% (C); CSPV 28% (D); CSPV 35% (E) e CSPV 50% (F)	44
Figura 8 - Espectros de FTIR para Caseína (A), Extrato Bruto de Própolis Vermelha e Formulações CSPV 10% (B); CSPV 18% (C); CSPV 28% (D), CSPV 35% (E) e CSPV 50% (F)	49
Figura 9 – Curvas Termogravimétricas (TG) das Formulações (CSPV 18%; CSPV 28%; CSPV 35%; CSPV 50%), CSSD e CSRG	52
Figura 10 – Curvas de DTA das Formulações das Formulações (CSPV 18%; CSPV 28%; CSPV 35%; CSPV 50%), CSSD, CSRG e Extrato Bruto de Própolis Vermelha	53
Figura 11 – Gráfico com Percentagens de Atividade Antioxidante de Formulações Contendo Extrato Bioativo	55
Figura 12 – Gel de Eletroforese em Poliacrilamida	57
Figura 13 – Perfil de dissolução para CSPV 18%, CSPV 28%, CSPV 35% e CSPV 50%, em água e agitação de 100 rpm	58

Figura 14 - Perfil de dissolução para CSPV 35% e CSPV 50%, em tampão fosfato, pH 7,4 e agitação de 100 e 150 rpm	59
Figura 15 - Perfil de dissolução para CSPV 35% e CSPV 50%, em água e tampão fosfato pH 7,4 e agitação de 150 rpm	60
Figura 16 – Atividade antimicrobiana dos caseinatos de própolis vermelha usando método de difusão em disco com cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Classificação da Própolis Brasileira	20
Tabela 2 - Tamanho de Partícula e Potencial Zeta	47
Tabela 3 – Teste de sensibilidade de difusão em disco das formulações CSPV 28%, CSPV 35% e CSPV 50% frente a cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	63

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMPS – Persulfato de Amônia

CIM – Concentração Inibitória Mínima

CSPV – Caseína Própolis Vermelha

CSRG – Caseína Reagente

CSSD – Caseína Spray Dryer

DPPH – 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo

DTA – análise Térmica Diferencial

FTIR - Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier

IV – Infravermelho

MET – Microscopia Eletrônica de Transmissão

MEV – Microscopia Eletrônica de Varredura

MO – Microscópio Óptico

PDI – Índice de Polidispersão

SDS – Dodecil Sulfato de Sódio

TEMED – Tetra Metil Etilenodiamina

TG – Termogravimetria

TGI – Trato Gastrointestinal

UV-Vis – Ultravioleta Visível

SUMÁRIO

1 - INTRODUÇÃO	16
2 - OBJETIVOS	18
2.1 - Objetivo Geral	18
2.2 - Objetivos Específicos	18
3 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
3.1 - Obtenção das Micropartículas	19
3.1.1 - Própolis	19
3.1.2 - Caseína	22
3.1.3 - Secagem em Spray-Dryer	25
3.2 - Caracterização das Micropartículas	27
3.2.1 - Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	27
3.2.2 - Tamanho de Partícula	28
3.2.3 - Potencial Zeta	28
3.2.4 - Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier – FTIR	29
3.2.5 - Análise Térmica	30
3.2.5.1 - Análise Termogravimétrica (TG)	30
3.2.5.2 - Análise Térmica Diferencial (DTA)	30
3.2.6 - Atividade Antioxidante por DPPH	31
3.2.7 - Eletroforese	32
3.2.8 - Dissolução	32
3.2.9 - Ensaio Microbiológico	33
4 - MATERIAL E MÉTODOS	33
4.1 - Material	33
4.1.1 - Equipamentos	33
4.1.2 - Reagentes e Insumos	34
4.1.2.1 - Obtenção de Extrato Bruto de própolis Vermelha	34
4.1.2.2 - Obtenção do Microencapsulados	34
4.1.2.3 - Caracterização	34

4.1.2.4 - Outros	35
4.2 - Métodos	35
4.2.1 - Preparo do Extrato Bruto de Própolis Vermelha	35
4.2.2 - Obtenção dos Microencapsulados em Sparay-Dryer	36
4.2.3 - Tamanho de Partícula e Potencial Zeta	37
4.2.4 - Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	37
4.2.5 - Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier – FTIR	38
4.2.6 - Análise Térmica: TG e DTA	38
4.2.7 - Determinação de Atividade Antioxidante por DPPH	38
4.2.8 - Eletroforese	39
4.2.9 - Ensaio de Dissolução	40
4.2.10 - Ensaio Microbiológico	41
5 - RESULTADOS E DISCUSSÃO	42
5.1 - Curva de Calibração	42
5.2 - Microencapsulados Obtidos em Spray-Dryer	43
5.3 - Microscopia Eletrônica de Varredura	43
5.4 - Tamanho de Partícula e Potencial Zeta	46
5.5 - Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)	48
5.6 - Termogravimetria (TG) e Análise Térmica Diferencial (DTA)	51
5.7 - Atividade Antioxidante	55
5.8 - Eletroforese	56
5.9 - Perfil de Dissolução	57
5.9.1 - Ensaio em água para dissolução de CSPV 18%, CSPV 28%, CSPV 35% e CSPV 50% sob agitação de 100 rpm	58
5.9.2 - Ensaio em tampão fosfato pH 7,4 para dissolução de CSPV 35% e CSPV 50% sob agitação de 100 e 150 rpm	59
5.10 - Atividade Antimicrobiana	61

6 – CONCLUSÃO	64
REFERÊNCIAS	

1 - INTRODUÇÃO

Produtos de origem natural ganha cada vez mais destaque e espaço frente a aplicação na terapêutica ou com a finalidade de conferir função a alimentos. Dentro dos produtos naturais podemos destacar os diferentes produtos apícolas, mel, pólen e as diferentes própolis já caracterizadas, entre elas a própolis vermelha de Alagoas. Conhecida como o decimo terceiro tipo de própolis, a vermelha é rica em metabolitos secundários como flavonoides, ésteres e ácidos fenólicos, isoflavonóides e seus derivados (pterocarpanos), estes constituintes, são vastamente utilizados e requerem atenção para novos estudos (RIGHI, 2011). Quando avaliadas para aplicações nos usos supracitados surge a necessidade do melhoramento das características peculiares como a baixa solubilidade em meio aquoso e o odor e sabor fortes, que a torna inviável para algumas aplicações. Com isso as indústrias farmacêuticas e de alimentos busca aplicar mecanismos capazes de melhorar esses aspectos desagradáveis (ACKERMAN, 1991; NORI et al. 2010).

As técnicas de microencapsulação é uma boa alternativa aplicada na busca de modificar esse tipo de ponto negativo dentro dos produtos naturais, pois permite prevenir, por exemplo, a perda de substâncias por oxidação ou volatilização, além de controlar a liberação de aromas, perda de nutrientes e preservar a cor e o sabor do agente encapsulado. O processo se baseia na incorporação das substâncias bioativas numa matriz que atua como um material de revestimento, obtendo-se micropartículas que, dependendo da necessidade podem apresentar também um controle no tempo de liberação do princípio ativo. É importante salientar que a técnica é normalmente aplicada a produtos que apresentam baixa biodisponibilidade. O que é observado, por exemplo, em substâncias hidrofóbicas e material resinoso como a própolis vermelha (BRASILEIRO, 2011).

Segundo Brasileiro (2011), se encontram disponíveis vários métodos para a preparação de microencapsulados, que podem variar entre métodos químicos, físicos ou físico-químicos. No entanto, para a escolha do melhor método deve ser levado em consideração alguns fatores, como o custo, a eficiência do método, reprodutibilidade de amostra e se o método é de fácil reprodução em escala industrial. Um outro fator importante é sua flexibilidade em relação a escolha de matriz de encapsulação (ESTEVINHO, 2013).

Para Estevinho (2013), a matriz deve ser escolhida de acordo com as características do agente que será encapsulado e deve possuir propriedades que agreguem valor ao composto bioativo ou confira as mesmas características vistas como positivas. Na atualidade, as indústrias alimentícia e farmacêutica vêm usando as diferentes técnicas de microencapsulação para conferir propriedades funcionais ou carrear fármacos, respectivamente.

Existem diversos trabalhos publicados que utilizam matrizes de encapsulação com diversas finalidades. Um material vastamente utilizado atualmente são os diversos produtos proteicos. Proteínas são uma boa escolha por serem vastamente conhecidas, não serem tóxicas, serem solúveis em meio aquoso e capazes de formar complexo com componentes endógenos, além serem de fácil obtenção (BRITO, 2011).

Razmi (2013) utilizou um complexo de proteína-quitosana como carreador de fármaco no tratamento de câncer. Proteína láctea também foi utilizada por Penalva (2014) para impedir que moléculas de ácido fólico sofressem degradação por reações de oxidação. As proteínas do leite são de característica anfipática e quando adicionada a uma formulação conferem ao agente ativo propriedades como uma melhor solubilidade em água e atividade anabólica, quando consumida associada a prática de atividade física (BRITO, 2011).

Dentre as proteínas lácteas a caseína vem sendo amplamente empregada na indústria farmacêutica. Essa aplicação se deve a sua variada característica físico-química, que confere a formulação estabilidade e melhora de forma significativa aspectos necessariamente importantes em formulações com fim terapêutico como o carregamento para sítios ativos importantes, facilitando a interação fármaco receptor. Raffin e colaboradores (2006), utilizou de caseína para melhorar a solubilidade de fármaco pouco solúvel, melhorando sua absorção no meio gástrico.

Diante da vasta aplicação das proteínas lácteas frente ao melhoramento de características de produtos terapeuticamente ativos, o presente trabalho tem por finalidade o uso de caseína como matriz encapsulante de extrato bruto de própolis vermelha, utilizando técnica de secagem por atomização (spray-dryer) para obtenção de micropartículas. Seguindo com posterior caracterização físico-química e morfológica dos microencapsulados obtidos e aplicação em ensaios microbiológicos.

2 - OBJETIVOS

2.1- Objetivo Geral

Obter e caracterizar microncapsulados de caseinatos carregados com extrato de própolis vermelha utilizando a técnica de spray-drying visando produção em escala semi-industrial e estudo de aplicabilidade dos microencapsulados enriquecidos com compostos bioativos.

2.2- Objetivos Específicos

- Obter microencapsulados de própolis na forma de caseinatos usando a técnica de spray-dryer em diferentes concentrações de extrato de própolis vermelha;
- Caracterizar físico-quimicamente as composições de microencapsulados de caseinatos de própolis vermelha;
- Avaliar a morfologia dos complexos de caseinatos contendo própolis vermelha;
- Avaliar o mecanismo de dissolução e cinética de dissolução dos complexos de caseinatos de própolis vermelha;
- Avaliar a atividade antioxidante e a concentração inibitória mínima (CIM) necessária para a inibição do crescimento de cepas de *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*.
- Propor uma composição final sólida contendo os complexos de caseinatos de própolis vermelha.

3- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1- Obtenção das Micropartículas

3.1.1- Própolis

A própolis é um material resinoso produzido por diversas espécies de abelhas. É constituída em sua maior parte por cera e apresenta uma complexa composição química e que está diretamente ligada a ecologia, região e período na qual foi coletada (DIAZ-CARBALLO et al, 2008).

Na cultura egípcia se tinha o conhecimento de propriedades da própolis que não permitiam a putrefação dos cadáveres, sendo assim utilizada no embalsamento dos faraós (CASTALDO, 2002). Já nos países orientais, desde os séculos passados, o uso da própolis se dá no intuito de alcançar efeitos terapêuticos, tais como: atividades anti-inflamatórias e antioxidantes (NAITO et al, 2007). A Farmacopeia Britânica lista os diferentes tipos de própolis como sendo uma droga oficial na farmácia magistral. Atualmente a própolis vem sendo muito estudada e em muitos desses estudos mostram que a mesma tem sido incorporada a formulações como cosméticos, mesmo que de forma empírica, buscando agregar um efeito terapêutico ao uso (CASTALDO, 2002).

Em sua composição, a própolis apresenta, além do material resinoso, compostos voláteis e compostos fenólicos, e em menor proporção outros constituintes, tais como açúcares, aminoácidos e polifenóis. Como já dito anteriormente o que determina sua composição química, além da planta coletada, são, sua localização e época do ano em que for coletada. No continente europeu por exemplo, os componentes predominantes são os flavonóides e os ésteres de ácidos fenólicos. Já na própolis cubana predominam as benzofenonas, diferente da própolis mexicana que é rica em isoflavonas e flavonas (RIGHI, 2011).

Righi (2011), ainda informa que o Brasil é possível encontrarmos uma outra diversidade de própolis. Na região sul e sudeste temos a própolis verde, obtida da *Baccharis dracunculifolia* (alecrim do campo), essa por sua vez é rica em fenilpropanoides, triterpenos, ácidos clorogênicos e ácido benzóico. Na região nordeste encontramos a própolis vermelha, que contém compostos como isoflavonoides e seus derivados (pterocarpanos); encontram-se ainda, benzofenonas

e fenilpropanóides. A tabela 1 reúne os diferentes tipos de própolis já descritas na literatura.

Tabela 1 - Classificação da Própolis Brasileira.

Própolis	Cor	Origem Geográfica	Origem Botânica	Composição Química	Referência
Grupo 1	Amarelo	Sul (RS)	-	-	PARK et al. 2002
Grupo 2	Castanho Claro	Sul (RS)	-	-	PARK et al. 2002; SILVA, 2008
Grupo 3	Castanho Escuro	Sul (PR)	<i>Populus alba</i>	Éster do ácido dimetil dialil caféico; flavonoides: crisina e galangina;	PARK et al. 2000 e 2002; SILVA, 2008
Grupo 4	Castanho Claro	Sul (PR)	-	-	PARK et al. 2000 e 2002; SILVA, 2008
Grupo 5	Marrom Esverdeado	Sul (PR)	-	-	PARK et al. 2000 e 2002; SILVA, 2008
Grupo 6	Marrom Avermelhado	Nordeste (BA)	<i>Hyptis divaricata</i>	Ésteres de ácidos graxos, compostos aromáticos, Terpenos, Flavonóides	PARK et al. 2000 e 2002; SILVA, 2008; CASTRO et al. 2007.
Grupo 7	Marrom Esverdeado	Nordeste (BA)	-	-	PARK et al. 2000 e 2002; SILVA, 2008
Grupo 8	Castanho Escuro	Nordeste (PE)	-	-	PARK et al. 2000; SILVA, 2008
Grupo 9	Amarelo	Nordeste (PE)	-	-	PARK et al. 2000 e 2002; SILVA, 2008
Grupo 10	Amarelo Escuro	Nordeste (CE)	-	-	PARK et al. 2002
Grupo 11	Amarelo	Nordeste (PI)	-	-	PARK et al. 2002
Grupo 12	Verde ou Marrom Esverdeado	Sudeste (SP, MG)	<i>Baccharis dracunculifolia</i>	Flavonóides, ácidos fenólicos, cetonas, aldeídos aromáticos, Alcoóis, terpenos, ácidos graxos, aminoácidos, oligoelementos, vitaminas B1, B2, B6, E, C e hidrocarbonetos.	PARK, 2004 e 2002; FUNARI e FERRO, 2006; MARCUCCI, 2007; BANKOVA, 2000; SOUSA, 2007; SIQUEIRA, 2008a.
Grupo 13	Vermelha	Nordeste (AL, BA, PB)	<i>Dalbergia ecastophyllum</i>	Flavonóides: pinocembrina, Formononetina, rutina, quercetina, dalbergina entre outros); Ácido: fenólico (ácido felúrico)	SILVA et al. 2007; DAUGSCH et al. 2007; SIQUEIRA, 2008a.

Fonte: Adaptado de Silvino, (2011).

Em 2007, Dausch e colaboradores realizaram estudos de origem botânica e composição química da própolis vermelha. Como esperado, a própolis vermelha, assim como em outros tipos de própolis tem sua composição e coloração diretamente ligadas a planta da qual as abelhas coletaram a resina. Neste caso, abelhas da espécie *Apis mellífera* coletam a resina da *Dalbergia ecastophyllum* (rabo-de-bugio) da família Fabaceae (Leguminosae), como mostra a figura 1.

Figura 1 – Coleta de resina da *Dalbergia ecastophyllum* (rabo-de-bugio) efetuada por abelhas da espécie *Apis mellífera*.



Fonte: Dausch, (2007).

Quando utilizada em testes biológicos, a própolis vermelha apresentou atividade bactericida para cepas de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. Feita a avaliação para atividade antifúngica, a mesma apresentou atividade contra *Candida albicans*. Também demonstrou potencial ação antioxidante e anti-inflamatória e efeito agonista frente a células cancerígenas (TRUSHEVA, 2006; MENDONÇA, 2015).

Atualmente, uma das aplicações da própolis é a adição em produtos alimentícios, agregando ao alimento uma atividade funcional. No entanto essa aplicação vem sendo limitada principalmente por sua solubilidade ser em álcool e pelo sabor forte e amargo (ACKERMAN, 1991; NORI, 2011). O sabor amargo da própolis pode estar relacionado à presença de flavonoides como as antocianinas (PROUDLOVE, 1996). Uma alternativa para uma melhor aplicação da própolis em alimentos seria a aplicação de técnicas visando à microencapsulação da mesma, sendo possível sua liberação no alimento de forma controlada (NORI, 2011).

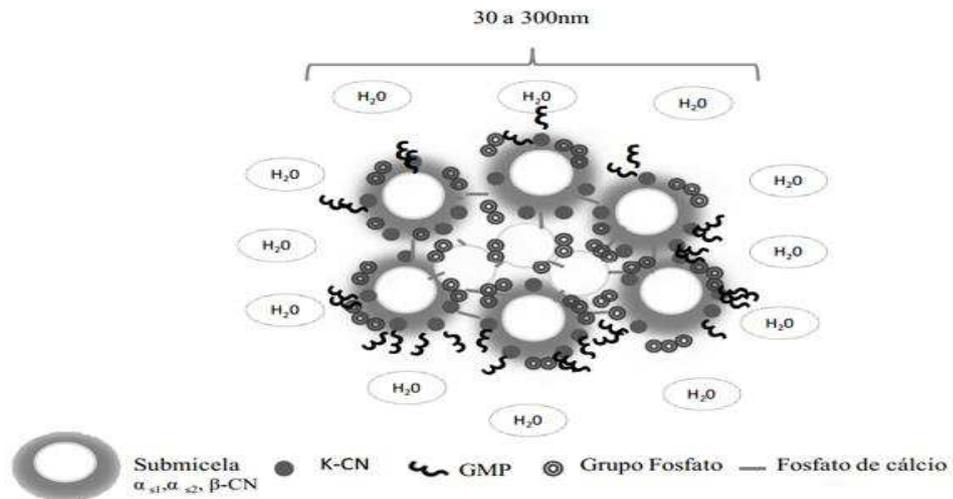
Nori (2011) aplicou a técnica de microencapsulação por liofilização para encapsular diferentes tipos de própolis utilizando como agente encapsulante a pectina (proteína extraída da soja). Neste estudo o processo demonstrou eficiência na formação de complexo, apresentou atividade antioxidante, bactericida para cepas de *S. aureus* e potencial proteção dos constituintes fenólicos da própolis, confirmados em estudos de estabilidade das formulações em um intervalo de 180 dias.

3.1.2- Caseína

As proteínas são macromoléculas constituídas por diversos aminoácidos e são de fundamental importância para a manutenção funcional do indivíduo. Diversas são as fontes para obtermos uma nutrição rica em proteínas, mas um dos alimentos que a possuem em maior quantidade e disponibilidade são os diferentes tipos de leite. O leite bovino possui cerca de 3 a 4% de proteínas em sua composição e são subdivididas entre proteínas do soro e caseína, estas, na maioria dos casos, são descartadas durante os processos de beneficiamento do leite (OLIVEIRA; TIMM, 2007). Sgarbieri (1996) classifica as proteínas do leite de acordo com as propriedades físico-químicas e estruturais, fazendo essa classificação em quatro grupos: proteínas do soro, caseína, proteínas das membranas dos glóbulos de gordura, enzimas e fatores de crescimento.

As caseínas são conhecidas como fosfoproteínas que possuem variados grupos fosfatos ligados à serina (P-ser). Estes radicais se encontram em diferentes regiões dentro das cadeias polipeptídicas, possuindo regiões de caráter hidrofílico e mais hidrofóbico, apresentando assim atividade anfipática, o que a torna mais susceptível à proteólise (SGARBIERI, 2005). As células epiteliais das glândulas mamárias são as responsáveis por secretar as moléculas de caseína na forma de micelas (grandes grânulos de caseína). Essas micelas possuem grupos fosfatos covalentes que estão envolvidos nas ligações com o cálcio. Depois que a caseína é fosforilada, o cálcio se liga ao fosfato para iniciar a polimerização das partículas de micelas. Esta estrutura (caseína - PO_4^{3-} - Ca^{2+} - PO_4^{3-} - caseína) é denominada de micela em formação (TRONCO, 1997). A figura 2 mostra um modelo esquemático da estrutura da micela de caseína.

Figura 2 – Modelo esquemático da micela de caseína (caseína - PO_4^{3-} - Ca^{2+} - PO_4^{3-} - caseína).



Fonte: Adaptado de Fortuna, (2015).

A literatura traz ainda que a caseína é constituída por um grupo específico de fosfoproteínas insolúveis e representa cerca de 80% das proteínas presentes no leite bovino, sendo estas estáveis quando submetidas ao processo de pasteurização, mas não apresentando a mesma estabilidade quando há acidificação do leite, pois ocorre desnaturação das micelas de caseína e formação de coágulos (FOX; BRODKORB, 2008).

As caseínas α , β , κ e γ são constituídas por 199, 207, 209 e 169 resíduos de aminoácidos, e apresentam 23, 25, 24, e 19 KDa, respectivamente. O restante do peso das micelas apresenta-se na forma de cálcio inorgânico (2,87%), fosfato (2,89%), citrato (0,4%), magnésio, sódio e potássio em pequenas quantidades. As formas α e β caseínas estão situadas no centro das micelas e estão ligadas com o fosfato de cálcio coloidal, já a κ -caseína se localiza na região externa e não permite a precipitação das caseínas sensíveis ao Ca^{2+} por ação dos sais de cálcio do leite (SGARBIERI, 2005). A κ -caseína não tem sua solubilidade afetada na presença do cálcio devido a uma região da sequência primária para- κ caseína (resíduos de aminoácidos básicos e resíduos apolares que se encontram agrupados na região amino terminal, formando uma região insolúvel e apolar). Por ser apolar a região para- κ caseína encontra-se voltada para o interior da estrutura micelar e interage, por meio de grupos hidrofóbicos com as α_s e β caseínas dispostas no núcleo da micela. Já a região hidrofílica (região glicomacropéptica, GMP, carboxiterminal) da κ caseína

orienta-se para o exterior da micela, fazendo interação com a água. São essas interações da sequência primária da κ -caseína que conferem estabilidade das micelas no leite (FORTUNA, 2015).

Em seu trabalho, Huraguchi (2006), afirmou que as proteínas são importantes fontes de aminoácidos, principalmente os aminoácidos essenciais, que são de fundamental importância na nutrição e na suplementação humana. Afirma ainda que as mesmas podem ser incorporadas em diversas formulações, tais como suplementos utilizados por atletas no intuito de acelerar o processo de anabolismo muscular após a realização de atividade física, ou ainda auxiliar na redução de gordura corporal. Diz ainda que as diversas proteínas lácteas são macromoléculas que possuem atividades antimicrobiana, anti-hipertensiva e são capazes de regular funções imunológicas.

Diante de uma vasta apresentação e características potenciais para diversas aplicações, pesquisadores das áreas de ciências farmacêuticas e de alimentos vêm desenvolvendo produtos enriquecidos com caseína. Estes vão desde alimentos com propriedades funcionais, a medicamentos, tendo a proteína como ferramenta para melhorar, modular ou carrear fármacos no organismo.

No que diz respeito a indústria farmacêutica, as proteínas vêm ganhando destaque no âmbito das novas tecnologias voltadas principalmente para a melhoria da liberação dos fármacos em sítios alvos. Sua vantagem nessa aplicação é que, polímeros naturais são considerados seguros, principalmente do ponto de vista toxicológico. Outras vantagens que justificam o uso de proteínas alimentares em sistemas de distribuição de bioativos é a agregação de seu valor nutricional e suas propriedades funcionais, além de conferir propriedades físico-químicas desejáveis para uma boa biodisponibilidade de compostos ativos. Estudos mostram que ocorre aumento da solubilidade destes ativos nos diversos líquidos corporais (SHAPIRA, 2012; BOCHAR, 2012).

A β -caseína se mostra um eficiente carreador de paclitaxel (fármaco utilizado no tratamento do câncer gástrico), sendo efetiva na proteção do medicamento melhorando seu perfil de liberação e reduzindo desconforto no trato gastrointestinal superior. Bochar (2012), fez estudo semelhante, tendo como objetivo melhorar a solubilidade do celocoxibe, anti-inflamatório não-esteroidal usado para o tratamento de artrite reumatóide e osteoartrite.

A resposta para tais mudanças na característica de solubilidade e proteção da mucosa gástrica superior dos fármacos citados, estão ligadas a capacidade de interação que a estrutura das caseínas possuem de interagir com muitos compostos ativos, via grupos funcionais, conferindo a essas macromoléculas uma vasta possibilidade de interagir através de ligações do tipo reversíveis com diferentes moléculas ao longo dos diferentes tecidos orgânicos e no final protegendo o componente ativo até atingir seu alvo terapêutico (ELZOGHBY, 2011).

Por ser altamente solúvel em água e ser capaz de interagir com diversas compostos, Penalva e colaboradores (2014) associaram a β -caseína ao ácido fólico, que é importante na nutrição humana por reduzir os riscos de doenças do tubo neural. Por ser facilmente oxidado, o ácido fólico foi microencapsulado por caseína em processo de liofilização, o complexo obtido demonstrou efetividade frente aos fatores ambientais ditos degradantes para o ativo em estudo.

Esta mesma aplicação pode ser feita no âmbito da nutrição, visando além da proteção de fatores ambientais e sensoriais a aplicação no intuito de criar ou potencializar a atividade funcional de alimentos. Moreira (2007), aplicou esta proteína como um agente protetor de extrato de resíduos oriundos do processamento de suco de acerola, seu objetivo era impedir a degradação do ácido ascórbico e das antocianinas (constituintes que apresentam atividade antioxidante).

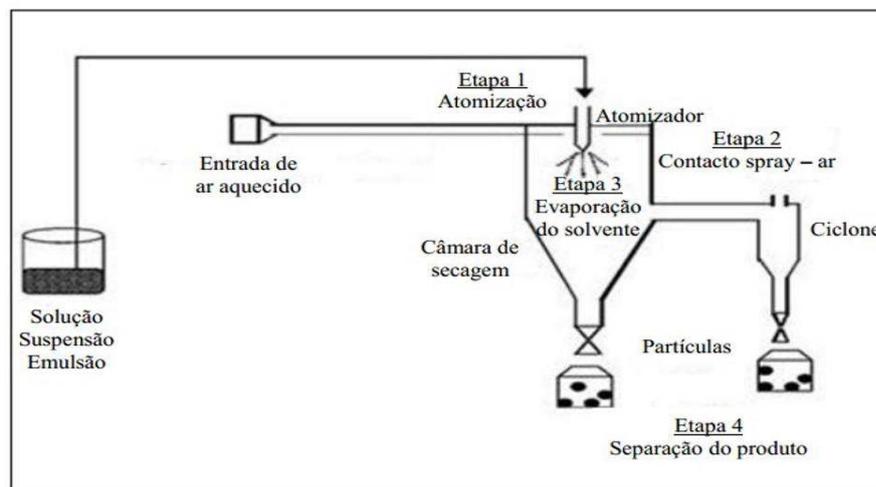
3.1.3 - Secagem em Spray-Dryer

A técnica de secagem por *Spray drying*, também denominada secagem por atomização ou pulverização, é um processo que consiste na transformação de materiais em estado líquidos ou semissólidos (soluções, suspensões, géis ou pastas) em produto seco, utilizando para isso um único processo de secagem (ESTEVES, 2006). Durante o processo no *Spray-Dryer* a vaporização da parte líquida da amostra é possível acontecer a partir do contato com um corrente ar, levando a desintegração da corrente líquida (atomização), que é projetada por um bico aspersor dentro de uma câmara normalmente cônica, desta aspensão surgem pequenas gotículas que entram em contato com uma corrente de ar quente, suficiente para tal vaporização, obtendo no final do processo um material sólido (pó) (AZEREDO, 2004).

Ainda de acordo com Esteves (2006), o processo de secagem por atomização é dividido em quatro etapas:

- a) Espalhamento do líquido em gotículas, aumentando área de superfície de contato. Este depende do tipo de bico atomizador (rotativo ou por bocal);
- b) Vaporização do líquido por contato com ar quente em um curto intervalo de tempo, gerando calor suficiente para evaporação;
- c) Evaporação do líquido, que depende diretamente dos fatores: tempo e temperatura do ar;
- d) Coleta do produto seco.

Figura 3 – Esquema do Processo de Secagem em Spray Dryer: obtenção de micropartículas.



Fonte: Adaptado de Swati, (2014).

A secagem de produtos em spray-dryer é vasta e se aplica em vários processos e áreas. Na indústria de alimentos produtos como leite, soro, ovos, caldos e sucos, são processados buscando uma maior vida de prateleira (ADAMOPOULOS; GOULA, 2005). Já na indústria farmacêutica a secagem por spray-dryer vem sendo empregada na microencapsulação de produtos farmacologicamente ativos, sejam eles sintéticos ou de origem natural. Essa encapsulação ajuda a mascarar sabor e aroma desagradáveis além de proteger produtos voláteis ou fotossensíveis, levando uma maior estabilidade para estes (BRUSCHI ET AL, 2003). Yoshii (2001) relata em seu

trabalho que com a encapsulação por spray drying é possível obter formulações com liberação controlada e liberação em locais específicos.

A técnica de microencapsulação consiste no aprisionamento de um componente biologicamente ativo ou de caráter funcional numa matriz sólida. Como já dito anteriormente, este processo possui vantagens, tais como a proteção do material ativo e o baixo custo de aplicação (ONEDA, 2003).

A literatura trata de diversos trabalhos que utilizaram a microencapsulação em spray dryer no intuito de melhorar características de diversos produtos como no estudo realizados por Ascheri; Marquez; Martucci (2003). Neste trabalho a técnica foi utilizada no intuito de melhorar a solubilidade de óleos extraídos da casca de frutas cítricas.

No que se refere a pesquisa na área da indústria farmacêutica muitos estudos têm aplicado a técnica de spray drying para incorporar fármacos insolúveis em matrizes de caráter anfipático (Shapira, 2012). A microencapsulação também vem sendo aplicada para direcionar o fármaco para um determinado tecido orgânico, como no estudo proposto por Raffin e colaboradores (2006), o qual teve como objetivo reduzir o efeito do pH ácido sobre a degradação do pantoprazol, fármaco utilizado no tratamento de úlcera gástrica. Como o pantoprazol necessita ser ativado dentro das células parietais gástricas, por meio de ligação irreversível com a bomba de $H^+ / K^+ - ATPase$ ele precisa ser absorvido de forma intacta pelo trato gastrointestinal (TGI) e uma alternativa foi o revestimento por matriz, utilizando microencapsulação por spray-drying.

3.2 - Caracterização das Micropartículas

3.2.1- Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A MEV é muito usada rotineiramente por ser um instrumento de alta versatilidade para análise microestrutural de materiais sólidos. Dentre os diversos campos de aplicação podemos destacar: engenharia e ciências de materiais, engenharia metalúrgica, ciências biológicas, ciências farmacêuticas, dentre outras. Como princípio a técnica atua através da interação de um fino feixe de elétrons focalizado sobre a área ou microvolume a ser analisado, gerando assim uma série de sinais que são utilizados para caracterizar as propriedades das amostras, tais como

composição, superfície topográfica e cristalografia. Isso é possível ser feito devido ao aumento máximo conseguido pelo MEV, que fica entre o microscópio óptico (MO) e o microscópio eletrônico de transmissão (MET) (KAHN, 2001).

Como vantagem, o MEV apresenta alta resolução, na ordem de 2 a 5 nm (20 – 50 A°). Diferente do MO que possui resolução de 0,5 µm. Já a vantagem em relação ao MET é a facilidade de preparar as amostras (MALISKA, 2000).

3.2.2 - Tamanho de Partícula

Ter o conhecimento das dimensões dos produtos sólidos particulados é de fundamental importância quando o objetivo é a produção de pó para aplicação terapêutica. O tamanho das partículas é um dos parâmetros que deve ser levado em consideração no momento da obtenção e caracterização destes produtos, pois afetam diretamente na escolha da forma farmacêutica na qual o fármaco vai se apresentar. (AULTON, 2005).

Ainda de acordo com Aulton (2005), em escala magistral, o tamanho das partículas é um parâmetro que pode, por exemplo, influenciar no enchimento de cápsulas. Variações de tamanho interfere no volume que determinado pó ocupa dentro de uma cápsula, comprometendo lotes e conseqüentemente a terapêutica desejada.

O tamanho das partículas também influencia em um outro parâmetro importante que deve ser levado em consideração na obtenção de formas farmacêuticas sólidas. Estudos como o proposto por Morcolongo (2003) mostram que diferentes tamanhos de partículas possuem variadas áreas de superfície. Como a área de superfície é inversamente proporcional ao tamanho das partículas, formulações com partículas de tamanho menor demonstram melhor perfil de dissolução, isso se deve a maior área de superfície apresentada por estas partículas.

3.2.3 - Potencial Zeta

A determinação do potencial zeta é uma técnica utilizada com o intuito de avaliar as interações intermoleculares. O potencial zeta é uma propriedade

eletrocínética interfacial e se aplica em estudos de fenômenos naturais tais como, a cinética de eletrodo, corrosão, adsorção, eletrocatalise, crescimento de cristais, estabilidade coloidal e características de soluções de eletrólitos e de fluxos de suspensões coloidais através de meios porosos e microcanais. “Este é um parâmetro chave na determinação da energia de interação entre as partículas e consequentemente, a estabilidade dos sistemas de suspensão coloidais” (HUNTER, 1981).

Conhecendo o valor do potencial zeta é possível saber a magnitude da carga das partículas coloidais indicando a estabilidade do sistema (SOUZA, 2014 APUD MARRISON; ROSS, 2002).

3.2.4 - Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier – FTIR

A radiação infravermelha dentro do espectro eletromagnético encontra-se situada entre as regiões do visível e das micro-ondas (Figura 4), sendo a porção denominada infravermelho médio (4000 cm^{-1} – 400 cm^{-1}) a de maior importância para a análise de grupos funcionais de estruturas orgânicas (BRUCE, 2006).

Quando a radiação infravermelha (IV), em frequência menor que 100 cm^{-1} for absorvida por moléculas orgânicas, esta radiação é convertida em energia de rotação molecular. Como consequência, o processo de absorção é quantizado e o espectro de rotação das moléculas são gerados em forma de linhas (SILVERSTEIN; BASSLER; MORRILL, 1994).

Figura 4 – Espectro Eletromagnético e a Excitação Molecular.



Fonte; adaptado de Bruce, (2006).

Para Bruice (2006), o princípio da técnica diz que, quando a amostra a ser analisada é colocada em contato com a radiação do IV, essa radiação atravessa a amostra e a radiação transmitida é então comparada com aquela transmitida na ausência de amostras. O espectrômetro registra estes resultados em forma de bandas de absorção. Ainda de acordo com Bruice (2006) quando se deseja um espectrômetro de maior sensibilidade usa-se um com transformada de Fourier (FTIR), este emprega um interferômetro de Michelson, que tem por finalidade dividir o feixe de radiação da fonte de IV de maneira que ele reflita simultaneamente a partir de um espelho em movimento e de um espelho fixo. Quando refletidos, os feixes voltam a se combinarem e ultrapassam as amostras chegando ao detector, sendo gerados na forma de gráfico de tempo contra a intensidade do sinal conhecido como interferograma.

3.2.5 - Análise Térmica

3.2.5.1- Análise Termogravimétrica (TG)

A termogravimetria é uma técnica na qual é possível avaliar a variação de massa de uma dada amostra em relação a temperatura ou tempo de aquecimento, para isso é utilizado programa controlado de temperatura. A aparelhagem é constituída por uma termobalança de alta precisão, contendo uma porta amostra no qual é inserido o material a ser analisado, que por sua vez é submetido a aquecimento em atmosfera previamente especificada de acordo com a metodologia aplicada. O dispositivo encontrado no equipamento permite aquecer e medir simultaneamente a massa do analito. Podendo ainda, em algumas situações, acoplar o aparelho a um sistema que possibilite detectar e analisar produtos voláteis (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010).

3.2.5.2 - Análise Térmica Diferencial (DTA)

A técnica térmica de medição DTA é uma análise que faz a medição continua das temperaturas da amostra e de um material de referência termicamente inerte à medida que vão sendo aquecidos ou resfriado em um forno. As medições são ditas diferenciais por registra-se a diferença entre a temperatura da referência T_r em relação a temperatura da amostra T_a ($T_r - T_a = \Delta T$) em função das condições de temperatura ou do tempo, salientando que o aquecimento ou resfriamento são

aplicados de forma linear. Com essa técnica é possível acompanhar efeitos de calor em conjunto com alterações, como a transição de fase (fusão, ebulição, sublimação, congelamento, inversão de estruturas cristalinas) ou reações de óxido-redução, dissociação, desidratação e decomposição das amostras (IONASHIRO, 2004).

Em aspectos gerais, transições de fase, reações de decomposição, redução e desidratação produzem efeitos endotérmicos, já as cristalizações, oxidações e certas reações de decomposição que são capazes de gerar efeitos exotérmicos. É possível ainda analisar transições que envolvem variações de entropia que alguns polímeros podem sofrer, entre elas estão as transições vítreas (IONASHIRO, 2004).

3.2.6 - Atividade Antioxidante por DPPH

Compostos que possuem atividade antioxidantes e que são de fontes naturais vêm ao longo dos anos ganhando um espaço importante e de destaque dentro das ciências farmacêuticas e de alimentos. A capacidade de prevenir reações oxidativas fazem desses produtos desejo de consumo, seja na prevenção da formação de radicais livres no organismo humano ou dentro da indústria, buscando reduzir degradação oxidativa em alimentos, conferindo uma maior vida de prateleira para estes (HALLIWELL, 1995; SHAHIDI, 2007).

Quando elaborada uma nova formulação contendo compostos fenólicos é importante fazer a quantificação destes e avaliar sua capacidade de sequestrar radicais livres. O presente trabalho aborda a determinação da atividade antioxidante pelo método de DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazila), que tem como fundamento a capacidade que o agente antioxidante possui em sequestrar o radical livre DPPH. Durante a reação o DPPH sofre redução para difenil-picril-hidrazina, essa redução é possível devido a ação de uma espécie antioxidante. Quando feita a leitura na região do UV é notado o desaparecimento da absorção, sendo assim, durante a análise monitora-se o decréscimo da absorbância de várias soluções com concentrações diferentes e conhecidas. Com esta diminuição que ocorre é possível calcular o consumo do radical livre DPPH, que é representada em porcentagem, a mesma corresponde a quantidade de DPPH que é consumida pelo antioxidante (SOUZA et al, 2007).

3.2.7 – Eletroforese

“O termo eletroforese se refere a migração de partículas carregadas sob influência de um campo elétrico”. Biomoléculas como, peptídeos, aminoácidos, nucleotídeos, ácidos nucleicos e proteínas possuem em suas estruturas grupamentos funcionais ionizáveis, conferindo-lhes carga positiva ou negativa em um determinado pH. Sendo assim, essas moléculas quando em contato com um campo elétrico migram para o cátodo (+) ou ânodo (-), dependendo de sua carga líquida (WILSON & WALKER, 2010). A técnica de eletroforese permite fazer uma separação de diferentes tipos de proteínas, utiliza para isso um suporte que normalmente pode ser gel de agarose, acetato de celulose ou gel de poliacrilamida (SGARBIERI, 1996).

Para Sgarbieri (1996), a eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) pode ser realizada com a proteína em sua forma nativa (eletroforese simples) ou utilizando o dodecil sulfato de sódio (SDS), que é capaz de desnaturar as proteínas. Esta técnica é também conhecida como SDS-PAGE.

3.2.8 - Dissolução

Dentre os vários processos e teste aos quais novos medicamentos devem ser submetidos para sua aprovação e posterior consumo, a solubilidade, permeabilidade, dissolução e farmacocinética devem ser consideradas. São estes parâmetros que determinam por exemplo, a dose e intervalos de administração de medicamentos. Com os estudos de dissolução é possível prever a liberação e solubilização de fármacos contidos em formas farmacêuticas solidas *in vitro*. Com estes ensaios é possível obter informações de permeabilidade através das membranas do trato gastrointestinal, quando estes fármacos forem submetidos as condições fisiológicas (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010).

Chorilli (2010), define dissolução como sendo o processo pelo qual o fármaco é liberado de sua forma farmacêutica para que se torne disponível e posteriormente venha sofrer absorção do organismo. Classifica ainda os ensaios de dissolução em três categorias, permitindo avaliar e comparar os parâmetros cinéticos e eficácia de dissolução dos produtos testados: ensaio de dissolução de um único ponto; ensaio de dissolução de dois pontos e perfil de dissolução.

Com o perfil de dissolução da porcentagem dissolvida do fármaco em diferentes tempos de amostragem (*in vitro*) torna possível ter uma visão mais ampla e mais conclusiva do comportamento do produto no organismo (CHORILLI, 2010).

3.2.9 - Ensaio Microbiológico

Os testes microbiológicos são de fundamental importância para validação de estudos que têm como finalidade o desenvolvimento de novas formulações com aplicação terapêutica. Principalmente quando o estudo em questão traz ativos que já possuem atividade microbiológica comprovada, como é o caso da própolis vermelha. Dentre os testes mais utilizados nesses estudos podemos destacar os que utilizam o princípio da sensibilidade frente a cepas semeadas em meio de cultura para formação de halos de inibição, formados por discos impregnados com o ativo (NCCLS, 2003).

4 - MATERIAL E MÉTODOS

4.1 – Material

4.1.1 - Equipamentos

- Rotaevaporador digital IKA RV 10
- Spray Dryer LM MSD 1.0
- Analisador de Tamanho de Partícula e Potencial Zeta – Malvern ZETASIZER NANO Z590
- Microscópio Shimadzu SSX – 550
- Balança de Umidade Shimadzu MOC 120 H
- Metalizador Sonyu Electro Quick Coater SC – 701
- Espectrômetro de Infravermelho com Transformada de Fourier THERMO SCIENTIC
- Analisador Termogravimétrico Shimadzu DTG 60 H
- Espectrofotômetro Shimadzu UV – 1280
- Cuba de Eletroforese para Mini Gel VERT – i10
- Dissolutor Agilent Technologies 708 – DS
- Balança Analítica Shimadzu AX 200

- Agitador Magnético com Aquecimento IKA HS 10
- Estufa Bacteriológica DDL BAC-42-DIG

4.1.2 - Reagentes e Insumos

Os reagentes e insumos utilizados apresentam-se como grau analítico (PA) ou grau farmacêutico, no caso de excipientes.

4.1.2.1 - Obtenção de Extrato Bruto de Própolis Vermelha

- Própolis Vermelha do Município de Marechal Deodoro – Alagoas
- Etanol 99° GL - Fornecedor CICLO FARMA

4.1.2.2 - Obtenção dos Microencapsulados

- Caseína de sódio de leite bovino (micelar) – Fornecedor SIGMA
- Dióxido de silício coloidal (Aerosil® 200) – Fornecedor DEGUSA
- Extrato bruto de própolis vermelha concentrado

4.1.2.3 - Caracterização

- Ácido acético – Fornecedor SYNTH
- Ácido aminoacético – Fornecedor SYNTH
- Ácido fosfórico – Fornecedor SYNTH
- Azul de bromofenol – Fornecedor SYNTH
- Acrilamida – Fornecedor VETEC
- Bis – Acrilamida – Fornecedor VETEC
- Brometo de Potássio (KBr) – Fornecedor SYNTH
- Coomassie - Fornecedor SIGMA
- 2,2-Difenil-1-picrilhidrazil – Fornecedor SIGMA
- Fosfato de sódio monobásico – Fornecedor NEON
- Fosfato de Sódio bibásico – Fornecedor NEON
- Glicerina – Fornecedor IMPEX
- Hidróxido de sódio - Fornecedor SYNTH
- Lauril sulfato de sódio (Dodecil sulfato de sódio - SDS) – Fornecedor

VETEC

- Metanol – Fornecedor J. T. BAKER
- Mercaptoetanol – Fornecedor SIGMA
- Persulfato de amônia (AMPS) – Fornecedor VETEC
- Tetrametil-Etilenodiamina (TEMED) – Fornecedor SIGMA
- Tris (hidroximetil) aminometano – Fornecedor SYNTH
- Cepas de *Pseudomonas aeruginosas* – Fornecedor LABOCLIN
- Cepas de *Stafilococcus aureus* – Fornecedor LABOCLIN
- Meio de cultura Mueller Hinton – Fornecedor LABOCLIN
- Discos de impregnados com ampicilina – Fornecedor LABOCLIN
- Discos impregnados com ciprofloxacina - Fornecedor LABOCLIN
- Cápsulas 00 – Fornecedor EMBRAFARMA
- Filtro de papel – Fornecedor J. PROLAB

4.1.2.4 - Outros

- Água Milli-Q produzida no Laboratório de Eletroquímica do Instituto de Química e Biotecnologia da UFAL.
- Água osmose reversa produzida no Departamento de Nefrologia do HUPAA-UFAL.
- Cubeta de Quartzo para espectrofotometria de absorção no UV-Vis.

4.2 - Métodos

4.2.1 - Preparo do Extrato Bruto de Própolis Vermelha

O extrato bruto foi obtido utilizando o método de extração denominado maceração. O extrato obtido para o presente estudo utilizou própolis vermelha coletada em região de mangue do município de Marechal Deodoro no estado de Alagoas e álcool etílico em concentração de 99 °GL. Cerca de 100 g de própolis vermelha foi triturada e colocada em um tubo apropriado para extração, em seguida o solvente supracitado foi adicionado, sendo misturado a um volume de água destilada, correspondente a 10% do volume final do líquido extrator. Neste caso o volume final foi de 360 mL, ou seja, utilizou-se 324 mL de álcool e 36 mL de água.

A própolis já triturada foi misturada ao solvente, sendo retirado o sobrenadante em períodos de 48 horas, adicionando o mesmo volume de líquido extrator

(remaceração) até esgotamento da matriz vegetal. Posteriormente, as diferentes porções extraídas ao longo dos dias foram concentradas em rotaevaporador digital IKA® RV 10, acoplado a uma bomba de vácuo (Tecnal®) usando as seguintes condições: 80 rpm; pressão de 600 mmHg e banho-maria com temperatura de 45 °C.

4.2.2 - Obtenção dos Microencapsulados em Spray Dryer

Foram preparadas cinco formulações de microencapsulados, tendo caseína como agente encapsulante, extrato bruto de própolis vermelha como agente encapsulado e aerosil como agente dispersante. Estas formulações foram denominadas, CSPV-10%, CSPV-18%, CSPV-28%, CSPV-35% e CSPV-50%, sendo o valor em percentagem referente a concentração de extrato bruto de própolis vermelha contido em cada uma das formulações. Em seguida foram adicionados 5% de Aerosil e a caseína em quantidade suficiente para completar o equivalente a 100 g de mistura.

Em um Becker e com auxílio de um agitador mecânico foram adicionados componentes das formulações, de acordo com a seguinte ordem:

- Solubilização da caseína em 500 mL de água destilada, adicionando de forma lenta e contínua, para evitar formação de aglomerados;
- Solubilização do extrato bruto de própolis em 500 mL de álcool de cereais;
- Adição do extrato etanólico de própolis a solução de caseína, essa adição foi feita de forma lenta e contínua, para evitar a precipitação da própolis em solução;
- Adição de aerosil a solução de própolis + caseína. A massa de aerosil adicionada é referente a 5% da massa sólida contida em solução.

As etapas descritas acima foram efetuadas sob agitação constante utilizando agitador mecânico até o momento de levar as soluções para secagem. Durante o processo de secagem foi mantida a agitação da solução, utilizando placa com agitador, evitando decantação dos constituintes presentes na mesma.

A secagem para formação das micropartículas foi realizada por spray-dryer LM MSD 1.0, tendo como parâmetros programados para formação dos

microencapsulados as seguintes condições: temperatura de entrada 177 °C, temperatura de saída 115 °C, fluxo de bombeamento 0,46 L/h e vazão de ar 3,02 L.

4.2.3 - Tamanho de Partícula e Potencial Zeta

Para a determinação do tamanho de partícula e potencial zeta foram utilizadas as técnicas de espalhamento de luz dinâmico e espalhamento de luz eletroforético, respectivamente, tendo como suporte o equipamento Zetasizer Nano ZS90 do Laboratório de Tecnologia de Nanosistemas Carreadores de Substâncias Ativas (TECNano) da Escola de Enfermagem e Farmácia (EENFAR).

Para tais análises, 10 mg de cada uma das formulações foram solubilizadas em 10 mL de água Milli-Q e colocadas em tubos do tipo Falcon. Durante as análises todas as amostras diluídas foram mantidas em banho ultrassônico modelo USC-700.

Alíquotas de cerca de 1 mL foram colocadas em uma célula (cubeta própria do equipamento) e levadas para leitura.

4.2.4 - Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

O estudo da morfologia das amostras foi realizado em microscópio eletrônico de varredura da Shimadzu, modelo SSX-550 super scan. Em um porta amostra circular de aço, colocou-se tiras de fitas de carbono, para fazer o depósito das amostras a serem analisadas.

O preparo das amostras se deu por:

- Retirada de umidade do pó em balança de umidade utilizando temperatura de 105 °C;
- Metalização do pó em com alvo de platina por três minutos, seguida de aplicação de alvo de ouro durante 5 minutos (corrente de 10 mA em Ambas).

A varredura do pó se deu em diferentes pontos com ampliação de foco que variaram de 300 – 4000 vezes.

4.2.5 - Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier - FTIR

Os espectros de infravermelho foram obtidos com uso de pastilhas de brometo de potássio (KBr) com leitura em espectrômetro de infravermelho com transformada de Fourier – Thermo Scientific do Laboratório de Tecnologia de Nanosistemas Carreadores de Substâncias Ativas (TecNano–ESENFAR-UFAL).

Amostras de todas as formulações mais a proteína pura, foram encaminhadas para análises em região média do infravermelho, compreendida entre os números de onda de 4000 – 400 cm^{-1} e número de scan de 64. A técnica utilizou cerca de 2 mg de amostra para 200 mg de KBr. Os resultados foram tratados no origin versão 6.0.

4.2.6 - Análise Térmica: Termogravimetria (TG) e Análise Térmica Diferencial (DTA)

O perfil de degradação das formulações secadas em spray-dryer foram realizados no Laboratório de Síntese de Catalisadores – LSCat do Instituto de Química e Biotecnologia da UFAL.

Para a avaliação termogravimétrica (TG), cerca de 6,0 mg de cada amostra foi utilizado na termobalança, tendo como parâmetros de análise uma razão de aquecimento de 10 $^{\circ}\text{C}/\text{minuto}$, iniciando em 25 $^{\circ}\text{C}$ aquecendo até 900 $^{\circ}\text{C}$. A atmosfera empregada foi de N_2 com aplicação de ar sintético, sendo 50 e 20 mL/minuto , respectivamente. As mesmas condições foram usadas para a análise por DTA.

4.2.7 - Determinação de Atividade Antioxidante por DPPH

A atividade antioxidante foi determinada utilizando reagente DPPH solubilizado em meio alcoólico (etanol absoluto). Foram pesados 4 mg do reagente DPPH e solubilizado em um balão volumétrico com capacidade para 100 mL, e a solução obtida foi armazenada sob refrigeração em fraco âmbar.

Na avaliação da atividade antioxidante foi necessário preparar uma solução estoque de cada uma das formulações. Então foram pesados 50 mg (correspondente ao extrato de própolis vermelha) de cada pó e solubilizado em balão volumétrico com capacidade para 50 ml, usando água destilada como solvente, seguindo com a retirada de alíquotas de 800 μL , 400 μL , 200 μL , 100 μL , 50 μL , 25 μL , 13 μL e 6 μL

que foram transferidas para balão volumétrico de 5 mL, as análises foram feitas em triplicata.

Adicionou-se 2 ml de reagente DPPH incubando por 30 minutos protegido da luz. Decorrido o tempo de reação foi completado o volume do balão com etanol absoluto, realizando em seguida a leitura utilizando espectroscopia UV com comprimento de onda de 518 nm. Os dados foram tratados e a atividade antioxidante foi expressa de acordo com a equação de Menson et al. (2001): %AA = $100 - \frac{[(Abs_{\text{amostra}} - Abs_{\text{branco}}) \times 100]}{Abs_{\text{controle}}}$.

4.2.8 - Eletroforese

As análises por eletroforese foram realizadas utilizando gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (SDS-PAGE) de acordo com protocolo validado pelo Laboratório de Bioquímica e Fisiologia de Insetos (LBFI-UFAL). Esta metodologia mostra a preparação do gel de corrida (12% de acrilamida), gel de empilhamento (4% de acrilamida), tampão de desnaturação das amostras, tampão de corrida, solução corante e solução descorante. As soluções utilizadas e suas respectivas concentrações foram as seguintes:

- Tampão tris a 1,5 M e pH 8,8;
- Tampão tris a 0,625 M e pH 6,8;
- Acrilamida a 30% (sendo 29:1 de acrilamida/bisacrilamida, respectivamente);
- Dodecil Sulfato de Sódio (SDS) 20% (p/v);
- Persulfato de Amônio (AMPS) 10% (p/v).

Para preparação do gel de corrida 2,6 ml de água destilada foi adicionada a 3,35 ml de tampão Tris com concentração de 1,5 M (concentração final de 0,5 M) e pH 8,8, adicionando posteriormente 4 mL de acrilamida a 30% (obtendo uma concentração final de acrilamida de 12%). Para aplicação das condições desnaturantes, trabalhamos com 100 µL de SDS 12% (obtendo uma concentração final de 0,2%) e para polimerização do gel 100 µL de AMPS a 10% e 25 µL de TEMED. A solução foi agitada em placa magnética para uma melhor homogeneização e rapidamente vertida no sistema de montagem do gel.

Para o gel de empilhamento utilizamos 3,0 mL de água destilada que foi adicionada a 1,25 mL de tampão tris (0,625 M) e pH 6,8, adicionando posteriormente 0,65 mL de acrilamida a 30% (obtendo uma concentração final de acrilamida de 4%), para conseguirmos as condições desnaturante, acrescentamos a solução 50 µL de SDS (20%). Na polimerização do gel 50 µL de AMPS (10%) e 12,5 µL de TEMED. A solução foi agitada e rapidamente vertida sobre o gel de corrida e em seguida foi colocado pente para formação dos poços com capacidade de receber até 30 µL de amostra/reagente.

A preparação dos tampões se deu da seguinte forma: tampão de eletroforese (tris-glicina) 100 mM de tris:100 mM glicina mais 0,1% de SDS. O tampão de desnaturação das amostras foi preparado com 10% de β-mercaptoetanol (10 ml), 2% de SDS (4 g), 25 mL de tampão tris pH 7,4 (concentração final de 125 mM), 20 mL de glicerol (concentração final de 10%), utilizou água para ajustar a mistura para um volume de 100 mL.

Montado o gel foi realizada corrida das amostras utilizando cuba para eletroforese Vert-i10 em sistema de gel vertical com voltagem de 210 Amperes. As amostras ficaram na cuba submetidas a voltagem por cerca de 4 horas. Depois desse tempo o gel foi retirado com auxílio de uma espátula e água corrente, seguindo com coloração. A solução de coloração foi preparada com coomassie a 0,25%; metanol 50% e ácido acético a 10% em agitação constante por cerca de 12 horas. O passo seguinte foi fazer a descoloração com solução contendo 25% de metanol e 5% de ácido acético. O gel foi revelado no equipamento FlexStation 3 Microplate Reader do Laboratório de Bioquímica e Fisiologia de Insetos (LBFI-ESENFAR-UFAL).

4.2.9 - Dissolução

Os estudos de perfil de dissolução dos caseinatos foram realizados no Laboratório de Análises Farmacêutica e de Alimentos (LAFA) da ESENFAR – UFAL utilizando dissolutor Agilent Technologies 708 - DS de oito cubas. Para dissolução foram utilizados dois meios (água osmose reversa e tampão fosfato pH 7,4), temperatura das cubas de 37 °C com aparato pá sob agitação constante. Os estudos utilizaram para os dois meios testados rotações de 100 e 150 rpm e cubas contendo 250 ou 500 mL da solução.

As cápsulas de tamanho 00, pesadas em balança analítica Shimadzu AX 200 comportavam o pó correspondente a 40 mg de extrato de própolis vermelha. Para cada formulação foram pesadas as seguintes massas de pó: CSPV 18% (222 mg), CSPV 28% (143 mg), CSPV 35% (114 mg) e CSPV 50% (80 mg).

Para preparar o tampão fosfato foram pesados 20,8 g de fosfato de sódio bibásico heptahidratado e 3,08 g de fosfato de sódio monobásico monohidratado em 900 mL de água, ajustando pH em $7,4 \pm 0,1$ com ácido fosfórico SR ou hidróxido de sódio SR, tendo o volume ajustado para um litro. Todos os cálculos foram feitos baseados em 1 litro de tampão, fazendo ajustes para os volumes necessários.

Quando levadas para o dissolutor as cápsulas foram adicionadas a solução com intervalos de 1 minuto de uma para outra, estratégia adotada visando facilitar no momento das coletas, que foram realizadas em 15, 30, 60, 90 e 120 minutos, coletando 5,0 mL em cada tempo estabelecido. Após filtração em filtro de papel as amostras foram submetidas a espectroscopia UV-Vis com comprimento de onda de 280 nm.

4.2.10 - Estudo de Sensibilidade Microbiológica

O experimento foi desenvolvido no Laboratório de Análises Farmacêuticas e de Alimentos Escola de Enfermagem e Farmácia da Universidade Federal de Alagoas e no Laboratório de Microbiologia do Departamento de Análises Clínicas do Hospital Universitário Prof. Alberto Antunes.

Os pós foram solubilizados em metanol obtendo soluções com diferentes concentrações. Para as formulações CSPV 28% e CSPV 35% foram utilizadas: 695 µg/mL, 500 µg/mL, 250 µg/mL, 140 µg/mL, já para CSPV 50%, 733 µg/mL, 50 µg/mL, 250 µg/mL, 140 µg/mL. Os ensaios para avaliação da atividade antimicrobiana foram feitos de acordo com as Normas da NCCLS (Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests, 2003), e Portilho et al. (2013), com algumas adaptações.

Utilizou-se o método de difusão em disco e cepas *Pseudomonas aeruginosas* e *Stafilococcus aureus*. Como controle positivo utilizou-se os antibióticos Ciprofloxacina e Ampicilina, sendo para *Pseudomonas aeruginosas* e *Stafilococcus aureus*, respectivamente. Um segundo disco sem o antibiótico (contendo metanol) foi

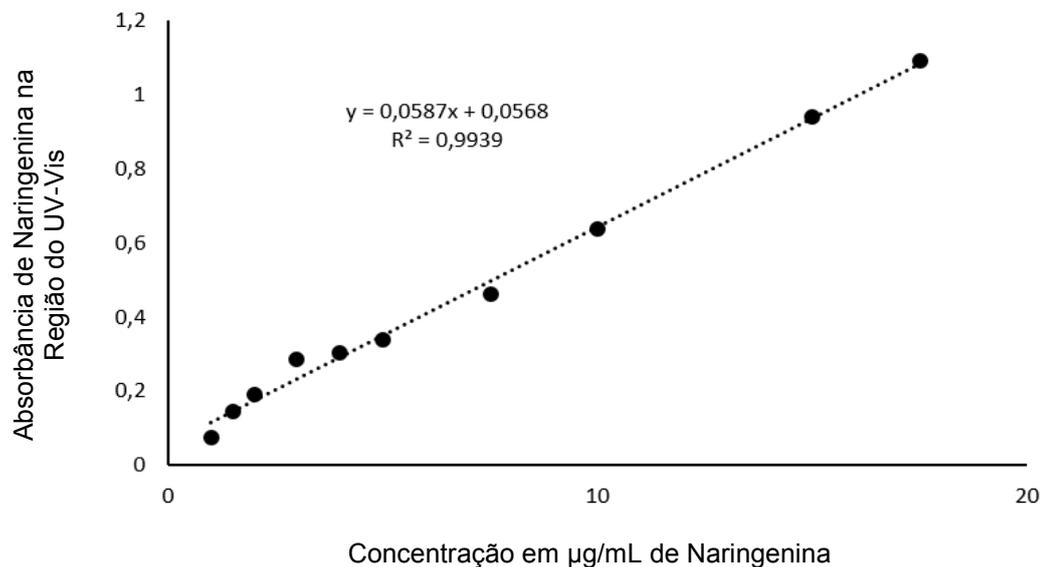
utilizado como controle negativo. Após o plaqueamento, as placas foram invertidas e incubadas a 35°C por 24 - 48h tendo seus halos de inibição visualizados posteriormente.

5 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 - Curva de Calibração

Para fins de quantificação de flavonoides totais liberados no meio de dissolução, foi construída uma curva de calibração usando naringenina como padrão. A partir da curva de calibração com naringenina nas concentrações de 1 µg/mL a 20 µg/mL. Feita a regressão linear obteve-se a equação da reta e o coeficiente de correlação como mostra a figura 5.

Figura 5 – Curva de calibração do Flavonóide Naringenina.



Fonte; Autor, (2017).

5.2 - Microencapsulados Obtidos em Spray-Dryer

Após a secagem o pó obtido apresentou coloração de acordo com a concentração de própolis contida nas formulações, variando entre uma coloração alaranjada, chegando a um tom vermelho escuro quando atingirmos a concentração de 50% como visto na figura 6.

Figura 6 – Formulações Obtidas no Processo de Secagem.



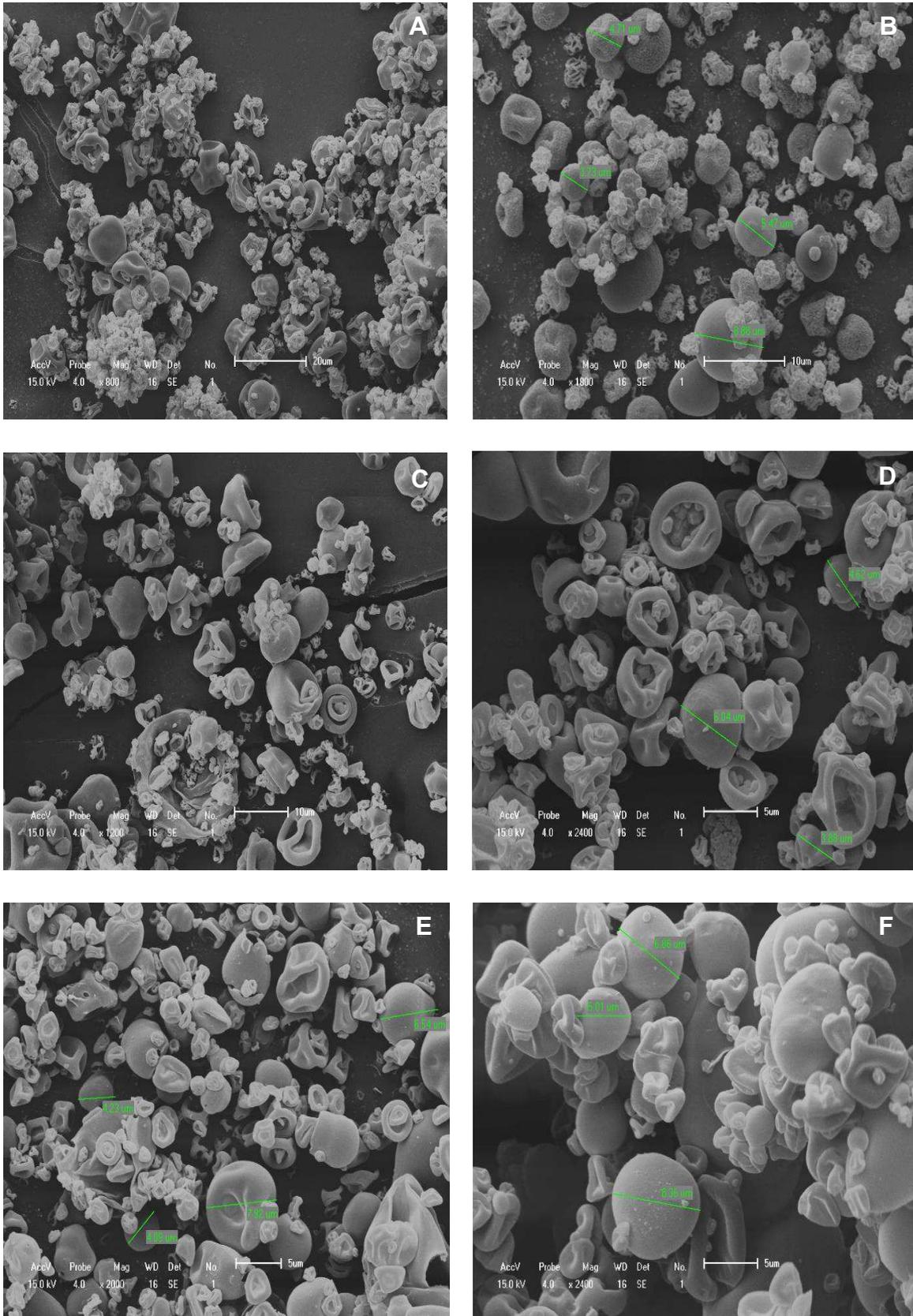
Fonte: Autor, (2017).

5.3 - Microscopia Eletrônica de Varredura

A técnica de MEV foi utilizada no intuito de avaliar a morfologia externa das micropartículas das formulações. Com a análise foi possível observar que a maioria das partículas se apresentaram esféricas, com paredes lisas e integras, sem aparente porosidade.

Na figura 7 temos ilustrada todas as formulações, sendo, B (CSPV - 10%), C (CSPV - 18%) e D (CSPV - 28%) de extrato de própolis. Estas apresentaram partículas de tamanhos semelhantes e dispersas, apresentando uniformidade de espalhamento nos diversos campos varridos pelo microscópio. Esta característica de dispersão indica ser um pó estável e de difícil agregação quando colocado em solução.

Figura 7 – Fotomicrografia das formulações: Caseína spray-dryer (A); CSPV 10% (B); CSPV 18% (C); CSPV 28% (D); CSPV 35% (E) e CSPV 50% (F)



Fonte: Autor, (2017).

O ensaio de microscopia eletrônica de varredura foi utilizado para comprovar que as micropartículas dos chamados caseinatos de própolis vermelha obtidas por *Spray-Dryer* também chamadas de microesferas ou também chamados de microencapsulados. Os resultados mostram que as partículas em modelo bimodal a polimodal que apresentam tamanho entre 2 μm e 8 μm , esféricas, ausência de fissuras ou porosidades, lisas e uniformes indicando formação de filme contínuo na parede externa. Na formulação CSPV 50%, que possuía a maior concentração de extrato de própolis, não foi observada a presença de partículas de conformação de agregados (Figura 7F). Os caseinatos apresentaram-se em sua maioria turgidos com aspecto irregular e também partículas esféricas com tamanhos variados, mas ausência de fissuras na superfície.

Nas figuras 7E e 7F temos as formulações (CSPV - 35%) e (CSPV – 50%), respectivamente. Nestas as partículas apresentam tamanhos semelhantes as demais formulações, mas a CSPV – 50 % se mostrou como possuindo micropartículas mais esféricas e com poucas rachaduras em sua superfície. Na figura 7A temos apresentada a imagem de microscopia da proteína (caseína pura), submetida a técnica de spray drying.

Em todas as formulações foi possível observar micropartículas que apresentam cavidade e característica de partículas vazias (murchas). Ruffin (2006) aponta que estas partículas são formadas por forças de encolhimento desigual, que acontecem no momento da secagem das gotículas dispersas pelo aspersor. Acredita-se que este fato esteja diretamente ligado à viscosidade das soluções pulverizadas. Já a semelhança nos tamanhos das micropartículas se deve ao uso de um mesmo bico atomizador em todas as secagens, além da padronização dos parâmetros: temperatura de entrada (177 °C), temperatura de saída (115 °C), fluxo de bombeamento (0,46 L/h) e vazão de ar (3,02 L).

Com estes resultados é possível confirmar que as partículas com aspecto murcho e com cavidade na superfície, observadas nas diferentes formulações, trata-se da caseína que não encapsulou o extrato de própolis vermelha e se encontra dispersa nos pós obtidos. No entanto, também é possível através da figura 7A confirmar a ocorrência efetiva da microencapsulação do extrato bruto.

Todas as formulações demonstram partículas formadas e bem definidas, mas é observado que as formulações contendo maior concentração de própolis vermelha apresentaram um melhor perfil de encapsulação, já que ao ver as imagens das formulações CSPV – 10%, CSPV – 18% e CSPV – 28%, é possível identificar uma maior concentração de caseína na superfície das partículas, acreditando-se que a encapsulação não foi tão eficiente ou as concentrações de extrato não foram equivalentes para a quantidade de caseína utilizada na secagem.

5.4 - Tamanho de Partícula e Potencial Zeta

A tabela 2 mostra os valores de tamanho de partículas (obtido por espalhamento de luz eletroforético), potencial zeta (por espalhamento de luz dinâmico) e índice de polidispersão. Com os resultados temos nas diferentes formulações uma apresentação de partículas bimodal para as micropartículas contendo entre 10 % e 35% de própolis vermelha. Já para as micropartículas da formulação contendo 50%, temos uma única população de partículas, sendo denominada como unimodal.

Os valores dos tamanhos de partículas em escala nanométrica variam entre 138,2 nm e 5463 nm com índice de polidispersão entre 0,252 e 0,784, mostrando uma grande variabilidade na dispersão das nanopartículas. Observe que as formulações contendo 10% e 50% apresentaram menores índices de polidispersão, isso indica uma melhor distribuição do tamanho das partículas, confirmando por mais uma técnica uma melhor microencapsulação para a formulação CSPV 50%, já que esse valor se refere a uma maior uniformidade das partículas.

As formulações que apresentam duas populações de partículas mostraram diferenças de tamanhos bastante significativas entre as duas populações. Rodrigues (2004) diz que as partículas de menor tamanho podem estar representando o material que não formou complexo (matriz/ativo), já as partículas maiores podem ser oriundas de aglomerações de partículas menores. Isso mostra que as formulações apresentam uma população de partículas micrométricas (1186-5463 nm) e uma população sub-micrométrica com partículas entre 72-715 nm.

Tabela 2 – Tamanho de Partícula e Potencial Zeta

Composição	Tamanho de partícula (nm)	Índice de Polidispersão (PDI)	Potencial Zeta (mV)
Caseína Spray-Dryer	41,32 ± 19,54	0,411	-33,0 ± 1,767
Caseína Comercial	240 ± 13,70	0,352	-47,9 ± 2,470
CSPV-10%	178,6 ± 6,46 5263 ± 172,40	0,252	-33,4 ± 0,404
CSPV-18%	134,95 ± 4,88 1186 ± 54,0	0,649	-33,4 ± 0,493
CSPV-28%	138,2 ± 22,78 880,97 ± 16,30	0,392	-33,9 ± 0,346
CSPV-35%	54,63 ± 135,13 715,35 ± 57,91	0,784	-39,8 ± 0,252
CSPV-50%	4447 ± 723,58	0,363	-33,0 ± 1,858

*Os valores médios referem-se a média entre três determinações ± desvio padrão.

Fonte: Autor, (2017).

A caseína em suas duas apresentações no estudo, CSRG e CSSD apresentou tamanhos de 240,47 nm e 41,32 nm respectivamente. Esta redução de tamanho provavelmente está ligada a formação de grumos na proteína reagente tendo sido revertida durante o processo de secagem. Acredita-se que a evaporação de água contribui com a desagregação das partículas, formando partículas mais dispersas. Já em relação ao índice de polidispersão a CSRG possui maior número de partículas uniformes (menor valor de PDI) isso se justifica devido à técnica de spray drying gerar encapsulados com tamanhos diferentes de partículas.

O potencial zeta nas formulações variou de – 33,0 a – 41,9 mv apontando alta estabilidade do complexo formado. É observado que a formulação CSPV 10% apresentou valor de potencial semelhante a CSRG, o que pode ser indicio de uma ineficiência de encapsulação, pois a interação medida na análise corresponderia a exercida pela caseína.

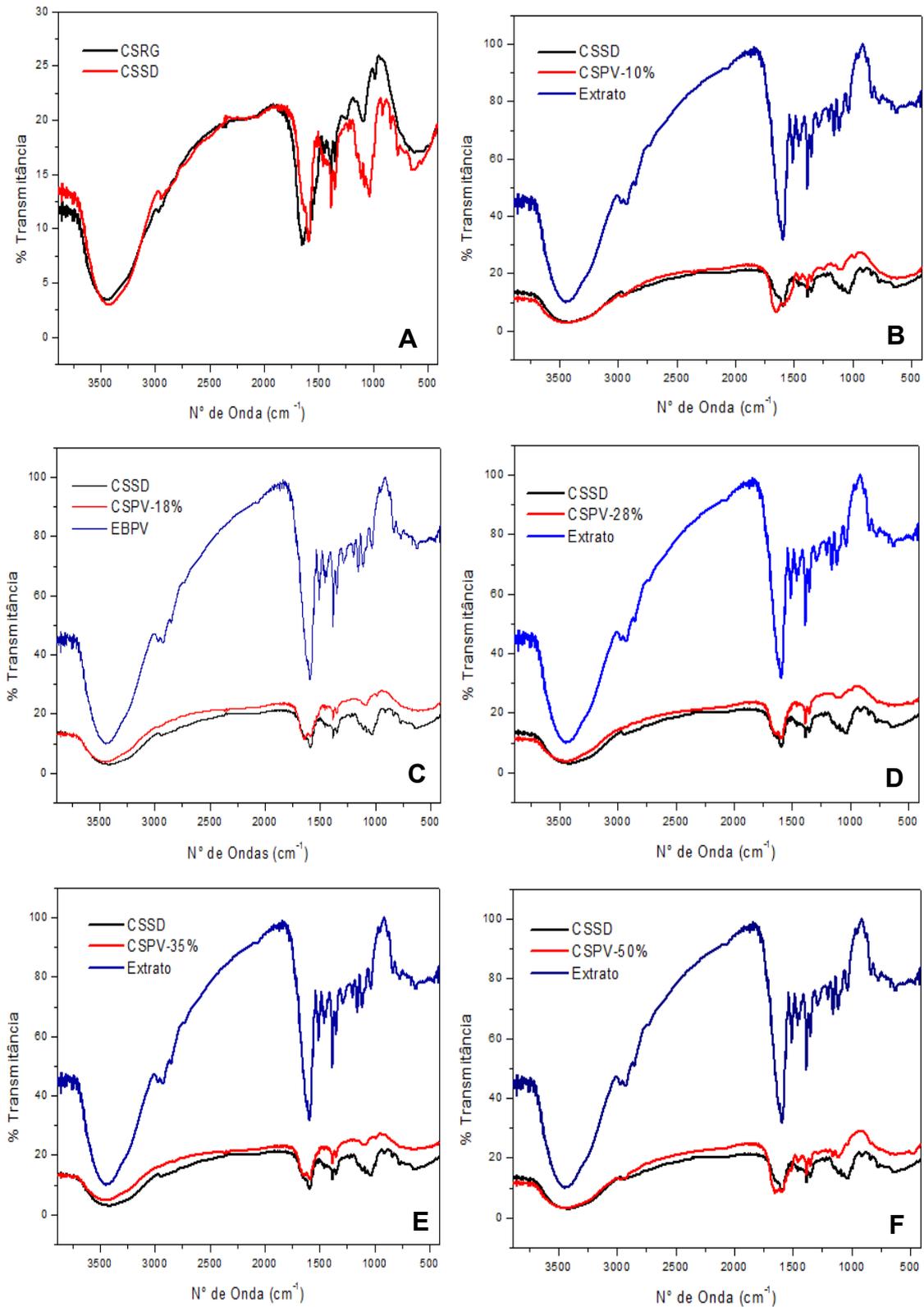
As demais micropartículas se comportaram com perfil de interação semelhante a CSSD. A CSPV 35% mostrou valor de potencial zeta de $-39,8$ mv, sendo o maior valor quando colocado em modulo. Com este resultado, CSPV 35% seria a mais estável entre as formulações, indicando um baixo poder de agregação. Mas, levando em consideração a maior concentração de ativo, a CSPV 50% apresentou valor de potencial zeta idêntico a proteína pura, indicando mais uma vez ser a melhor formulação frente as demais.

5.5 - Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

As proteínas, na região do infravermelho apresentam espectro que estão diretamente ligados a estrutura dos aminoácidos que as constituem. A estrutura básica das proteínas possui um grupamento carboxila (COOH), um grupamento amina (NH_2) e um radical que determina a identidade de cada um dos vinte aminoácidos (CAMPBELL, 2001).

A figura 8 mostra os espectros de FTIR de extrato hidroalcoólico de própolis vermelha, caseína e complexo formados (caseína-própolis-aerosil). Na figura 8A temos a caseína submetida a técnica de spray drying e a caseína que não foi submetida ao processo. Nesta é observado, nos dois espectros obtidos, uma banda larga entre $3686 - 2998 \text{ cm}^{-1}$, provavelmente atribuída a água fisicamente adsorvida. É visto também outra banda larga em 1649 cm^{-1} , possivelmente atribuída à deformação angular do grupo O-H da molécula de H_2O , incorporada durante o processo de secagem.

Figura 8 - Espectros de FTIR para Caseína (A), Extrato Bruto de Própolis Vermelha e Formulações CSPV 10% (B); CSPV 18% (C); CSPV 28% (D), CSPV 35% (E) e CSPV 50% (F).



Fonte: Autor, (2017).

No espectro do extrato bruto, que é representado em todas as imagens contendo as formulações temos em 3448 cm^{-1} uma banda larga que é característica do estiramento O-H, componente típico de compostos fenólicos. As absorções na região 2971 cm^{-1} , 2916 cm^{-1} e 2851 cm^{-1} são vibrações características de ligação C-H de grupamentos alifáticos (CH_2 , CH_3), picos fracos nesta região indicam a presença de carbono primário, secundários e terciários.

Vibrações entre 1647 cm^{-1} – 1449 cm^{-1} , correspondem aos alongamentos C=C de anel aromático, a banda 1025 cm^{-1} é atribuída ao estiramento de ligação éter aromático C-O (presente em flavonoides). As bandas entre 841 cm^{-1} – 611 cm^{-1} correspondem às deformações angulares fora do plano de C-H.

Na figura 8 (B – F) temos representados os espectros da proteína CSSD, CSPV 10%, CSPV 18%, CSPV 28%, CSPV 35%, CSPV 50% e extrato bruto. Com estes resultados podemos observar que as formulações obtidas apresentam bandas de absorções, que são características da caseína (CSSD), os picos presentes nos espectros são de intensidades semelhantes e aparecem na mesma região do infravermelho.

Em todas as formulações são encontradas bandas entre 1457 cm^{-1} – 1351 cm^{-1} , se observarmos essa mesma região no espectro da proteína CSSD vamos encontrar uma banda larga com dois picos definidos, veja que quando incorporado o extrato bruto surge de forma mais definida um terceiro pico em 1456 cm^{-1} , este fato pode ser entendido como uma interação entre o extrato e a matriz proteica.

Uma outra banda importante, apresentada pela espectroscopia na região do IV é a presente na região 1585 cm^{-1} e em 1600 cm^{-1} do espectro do extrato e da caseína spray-dryer, respectivamente. Esta banda no extrato é característica de alongamento C=C de anel aromático, nas proteínas, bandas médias a fortes, nesta região, é correspondente à deformação angular simétrica no plano de aminas, grupamento básico na estrutura de proteínas. Para a caseína spray-dryer esta banda é única, já nas formulações ela apresenta dois picos, sendo de intensidades diferentes conforme mudamos a concentração de própolis vermelha. Veja que na CSPV 50%, formulação contendo concentração equivalente de extrato bruto e caseína, os picos apresentam mesmo valor de transmitância, o que nos confirma mais uma vez a incorporação do extrato na matriz (formação de complexo).

Na região em torno de 630 cm^{-1} o pico presente no espectro da caseína spray-dryer não é visto no espectro das formulações, este dá lugar a uma banda larga e de mesma intensidade em todas as formulações, exceto na CSPV 50% (figura 8F) que mostra pequenos picos entre 614 cm^{-1} – 464 cm^{-1} . Essa é uma região típica de compostos aromáticos e as bandas presentes nesta região estão atribuídas aos compostos contidos no extrato bruto de própolis vermelha.

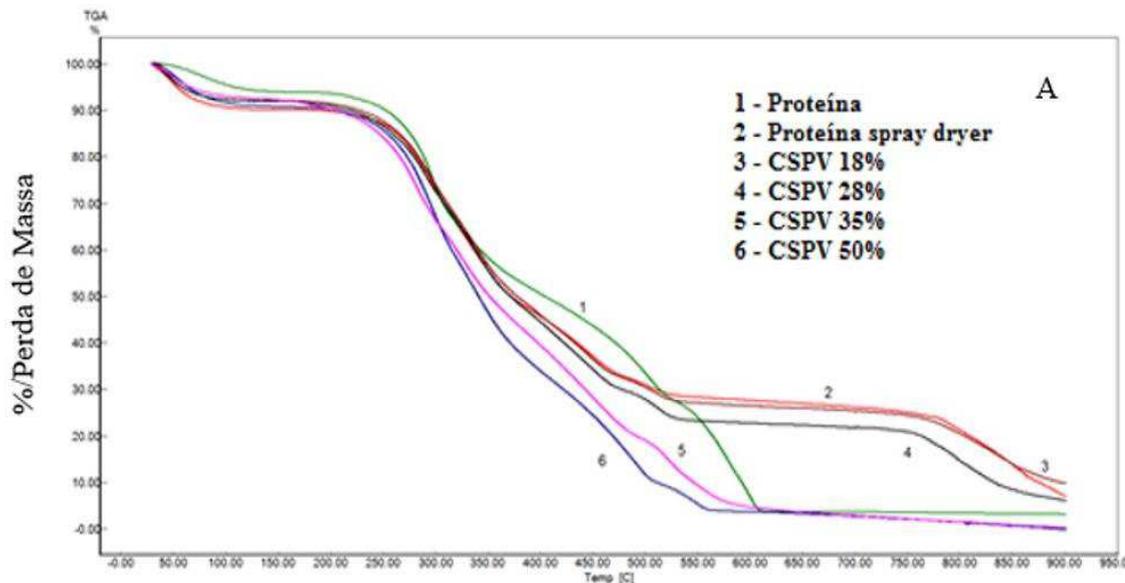
As composições de caseinatos de própolis vermelha (CSPV10%, CSPV18%, CSPV28%, CSPV35% e CSPV50%) apresentaram os mesmos estiramentos e deformações axiais e angulares característicos do agente encapsulante (caseína sódica). A caracterização na região do espectro de infravermelho dos microencapsulados de caseinato de própolis vermelha mostraram bandas de absorção em 3455 cm^{-1} , 1661 cm^{-1} , 1530 cm^{-1} , 1250 cm^{-1} , 1089 cm^{-1} e 547 cm^{-1} , que são semelhantes as encontradas na mesma região dos espectros do agente encapsulante demonstrando a encapsulação do extrato de própolis vermelha.

5.6 - Termogravimétrica (TG) e Análise Térmica Diferencial (DTA)

Buscando a caracterização das micropartículas obtidas em spray-dryer foram realizadas análises térmicas TG e DTA. As figuras 9 e 10 mostram o perfil de degradação e estabilidade térmica das formulações.

Na figura 9 (TG) é observado que a caseína reagente (não submetida a spray-drying) apresenta sua primeira perda de massa em uma temperatura um pouco maior que as demais formulações, tendo um primeiro evento em aproximadamente $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ e se estende até a temperatura de $100\text{ }^{\circ}\text{C}$, também é acompanhado de uma perda menor (3%), quando compara com a proteína spray-dryer e as formulações contendo extrato de própolis vermelha, que apontam início de perda em $50\text{ }^{\circ}\text{C}$, tendo seu pico máximo em $110\text{ }^{\circ}\text{C}$, ponto que representa uma redução de 10% de sua massa, estando essa primeira redução de massa relacionada a saída de água superficial ou de umidade adquirida.

Figura 9 – Curvas Termogravimétricas (TG) das Formulações (CSPV 18%; CSPV 28%; CSPV 35%; CSPV 50%), CSSD e CSRG.



Fonte: Autor, (2017).

Uma segunda perda de massa é vista quando as amostras são submetidas a temperaturas acima de 200 °C, neste intervalo é visto que a caseína reagente mantém ainda um perfil de perda de massa menor que as formulações. Neste mesmo intervalo podemos constatar também que as formulações CSPV 18% apresenta perfil de decomposição idêntico a proteína spray-dryer. CSPV 28% apresenta perfil de decomposição muito semelhante a caseína spray dryer. Mostrando ter uma decomposição mais lenta em comparação com as formulações CSPV 35% e CSPV 50%.

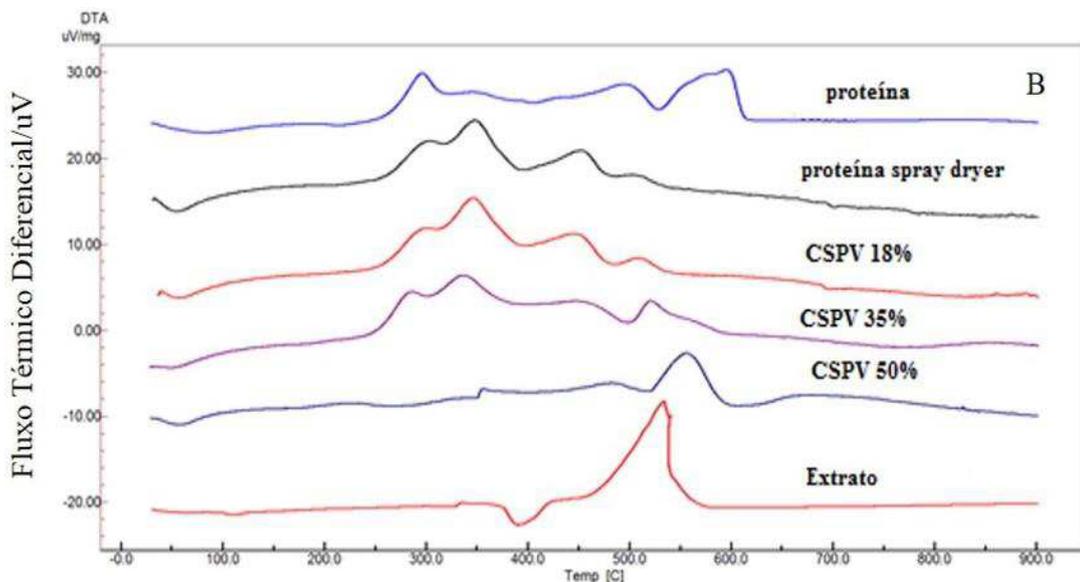
Isso pode ser visualizado quando a análise atinge 550 °C, observe que as micropartículas contendo 35% e 50% de própolis inicia sua decomposição total e ao mesmo tempo em que os demais microencapsulados ainda possuem 10% de massa para sofrer degradação.

Com estes resultados é possível afirmar que o aumento na concentração de própolis acelera a degradação térmica das micropartículas, e que mesmo sendo submetida a altas temperaturas durante o processo de secagem em spray-dryer a caseína apresentou perfil térmico estável, desnaturando em temperaturas mais elevadas quando comparada com a proteína reagente.

O processo de desnaturação de proteínas consiste na ruptura das ligações envolvidas na formação de suas estruturas, secundárias e terciárias, estas ligações ocorrem por meio de ligações de hidrogênio. Quando desnaturadas as proteínas apresentam-se desenroladas e se tornam menos solúveis e mais reativas. Salientando que esta desnaturação não influencia seu processo de digestibilidade (MARTINS, 2014).

Estes eventos térmicos, mostrados nas curvas de TG, podem também ser confirmados por DTA (figuras 10). Nesta encontra-se contido os eventos térmicos de decomposição do extrato bruto de própolis vermelha e os eventos de desnaturação da caseína, estes dados são importantes para confirmar por meio de outra técnica a estabilidade dos complexos formados.

Figura 10 – Curvas de DTA das Formulações das Formulações (CSPV 18%; CSPV 28%; CSPV 35%; CSPV 50%), CSSD, CSRG e Extrato Bruto de Própolis Vermelha.



Fonte: Autor, (2017).

O extrato de própolis vermelha apresentou transição de fase em 100°C, bem como transições de fase entre 300 e 450 °C (pico endotérmico de decomposição) e entre 450 e 600 °C (pico exotérmico de decomposição). As curvas DTA das composições CSPV apontam entre 50 °C – 100 °C uma leve variação de fluxo de calor

endotérmico para (CSSD), (CSPV 18%), (CSPV 35%), este evento é referente a volatilização de água e é confirmada também na análise por TG. Entre 210 e 600°C observa-se eventos simultâneos de decomposição e correspondente à decomposição desta proteína láctea e menos intenso na formulação CSPV 50%.

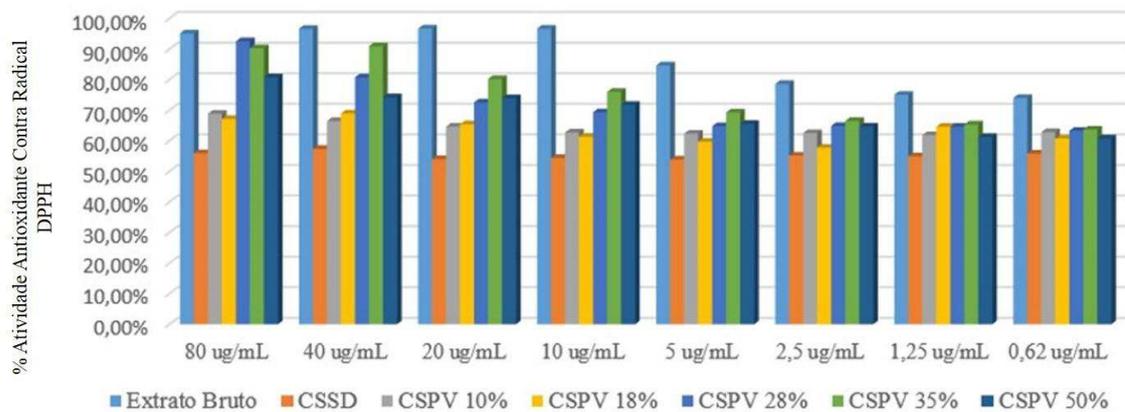
Em torno de 290 °C temos a apresentação de evento exotérmico para a proteína (CSSD), (CSRG) e o mesmo é visto na formulação CSPV 18% podendo ainda ser visto na formulação CSPV 35%. Como estas possuem uma maior concentração de caseína, acredita-se que este evento esteja ligado a decomposição de proteína, já que este pico não se encontra nas curvas da micropartícula CSPV 50% e na do extrato de própolis vermelha.

Com estes resultados constatamos que há interação entre a própolis vermelha e a proteína principalmente nas composições CSPV 18% e CSPV 35%, havendo, portanto, a formação de um complexo nestes microencapsulados. Um outro ponto importante, que configura essa interação é o desaparecimento, ou redução da intensidade do pico exotérmico característico do extrato bruto de própolis vermelha em aproximadamente 540 °C, veja que na mesma temperatura a caseína responde com um fluxo de absorção (endotérmico) o que demonstra processo de encapsulação do extrato pela proteína. Porém, quando consideramos a CSPV 50% isoladamente, o pico exotérmico é retardado, sugerindo uma menor encapsulação e, portanto, uma menor formação de complexo da caseína com o extrato nesta composição. Os dados mostraram perfis calorimétricos semelhantes entre o agente encapsulante de revestimento (caseína sódica) e extrato ativo de própolis vermelha sugerindo que os caseinatos apresentaram compatibilidade térmica e estabilidade térmica (Figura 13).

5.7 - Atividade Antioxidante

A metodologia aplicada para avaliar a capacidade antioxidante foi validada por Nascimento e colaboradores (2016), e com esta foi possível determinar em termos percentuais a interação dos compostos fenólicos com o reagente DPPH os resultados estão representados no gráfico (Figura 11).

Figura 11 – Gráfico com Percentagens de Atividade Antioxidante de Formulações Contendo Extrato Bioativo.



Fonte: Autor, (2017).

A primeira coluna vista em cada sequência de dados mostradas no gráfico corresponde a capacidade de sequestro do radical livre (DPPH) pelo extrato bruto de própolis vermelha, colaborando com os dados de Nascimento et al. (2016), com valor de atividade acima de 96%, valor semelhante ao obtido em nosso estudo para atividade de extrato etanólico de própolis vermelha (96,72% - 74,01%).

Com a aplicação do método de DPPH foi observado que todas as formulações apresentaram atividade, inclusive a caseína spray dryer (CSSD) que apresentou valores de atividade entre 57,38% a 53,88%. Acredita-se que esta pouca atividade esteja relacionada a presença de grupos fenólicos presentes em alguns aminoácidos da caseína e mesmo após processo de secagem por spray-dryer manteve certa atividade antioxidante o que também demonstra a sua importância na alimentação.

Nota-se que mesmo possuindo uma menor concentração de extrato ativo, quando comparada a CSPV 50%, a formulação CSPV 35% mostra maiores valores de atividade antioxidante, variando entre 80,94% - 63,67%. Esta maior atividade encontra-se diretamente ligada à capacidade de liberação do ativo em meio aquoso, confirmando que esta formulação possui características desejáveis que a faz ser dita como melhor para uma futura fórmula farmacêutica ou um nutracêutico de liberação imediata. Uma outra hipótese para esta maior atividade seria a possibilidade de uma não incorporação do ativo junto a matriz encapsulante ficando o ativo na superfície da

proteína, no entanto esta hipótese é descartada quando observamos os dados FTIR-ATR já que os dados são semelhantes entre a formulação CSPV 35% e CSPV SD.

Como já era esperado a formulação CSPV 50% também apresentou boa atividade frente ao DPPH com percentagens de capacidade antioxidante que variaram de 80,79% a 60,83%, mostrando ser uma formulação em potencial, para futura aplicação com esta finalidade.

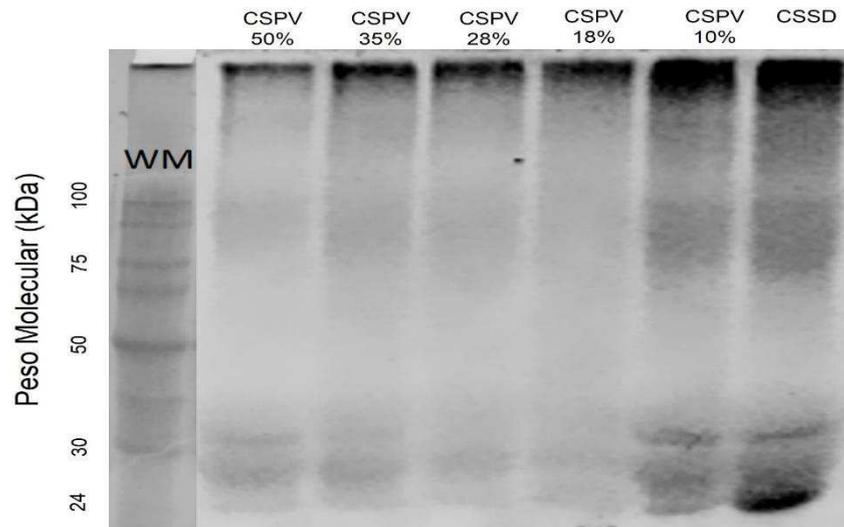
As demais formulações mostram atividade semelhantes entre si CSPV 10% (68,89% a 61,86%), CSPV 18% (68,96% a 57,75%) e CSPV 28% (92,56 a 63,30%) este maior valor de atividade em CSPV 28% pode estar ligada a uma maior incorporação do ativo dentro da matriz encapsulante, além de uma maior adsorção de flavonoides na sua superfície da proteína semelhante ao extrato bruto, demonstrado no perfil de dissolução (figura 13), ficando o mesmo na superfície e conseqüentemente foi liberado com facilidade para o meio aquoso mostrando uma alta atividade antioxidante.

5.8 – Eletroforese

A técnica de eletroforese foi aplicada com o intuito de avaliar o comportamento da caseína após o processo de secagem, no qual ocorre a microencapsulação (interação da proteína com o extrato de própolis vermelha). Para isso a proteína CSSD e as formulações foram aplicadas no gel sob condições desnaturantes para uma melhor separação em bandas. A técnica aplicada é denominada SDS-PAGE e tem como princípio a separação por tamanho da molécula.

A figura 12 mostra o gel revelado, que mostra as bandas características da caseína micelar, as bandas apresentadas entre 30 e 24 kDa correspondem as isoformas de caseína α_2 , κ , β e α_1 que possuem peso molecular de 23, 24, 25 e 30 KDa, respectivamente. (SGARBIERI, 2005).

Figura 12 – Gel de Eletroforese em Poliacrilamida



Fonte: Autor, (2017).

O gel de eletroforese mostrou que as isoformas de caseína (α_1 , κ , β) mostrando que a encapsulação dos flavonoides da própolis mantiveram as suas integridades físicas das isoformas de caseína sem processo de desnaturação. O mecanismo mais aceito é a formação de complexos quelantes dos flavonoides com os aminoácidos presentes na caseína em porções hidrofóbicas da estrutura molecular da caseína. O não aparecimento da banda em 23 KDa pode explicar a interação dos flavonoides na porção da isoforma α_2 da caseína sódica.

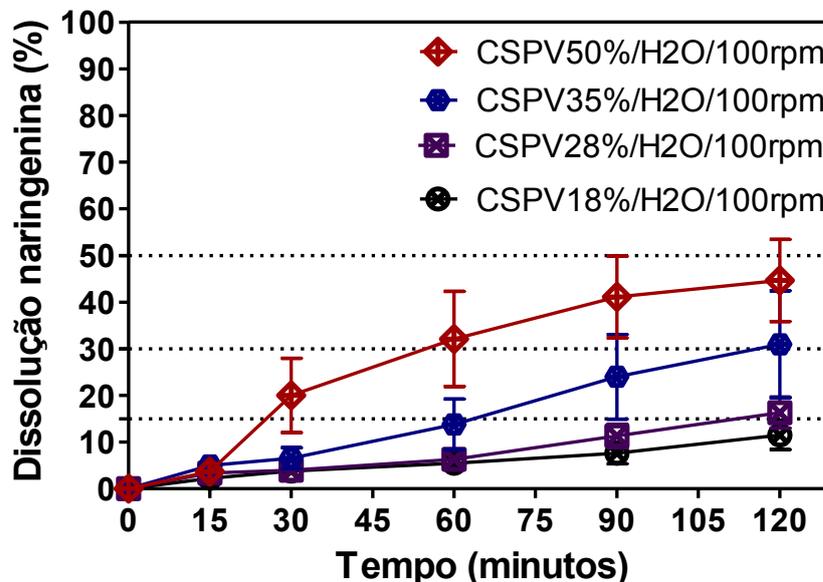
5.9 - Dissolução

Realizados os experimentos para determinação do perfil de dissolução dos caseinatos foram gerados os gráficos com os respectivos tempos de liberação verso concentração liberada de flavonoides totais, quantificado em função da concentração de naringenina obtida por curva de calibração (Figura 5).

5.9.1- Ensaio em água para dissolução de CSPV 18%, CSPV 28%, CSPV 35% e CSPV 50% sob agitação de 100 rpm e sem desintegrante na formulação.

Como já foi referido anteriormente o estudo de perfil de dissolução se deu utilizando dois meios e duas velocidades de agitação. Na figura 13 temos o perfil de dissolução para CSPV 18%, CSPV 28%, CSPV 35% e CSPV 50% em água e agitação de 100 rpm e sem a presença de desintegrante explosol na formulação.

Figura 13 – Perfil de dissolução para CSPV 18%, CSPV 28%, CSPV 35% e CSPV 50%, em água e agitação de 100 rpm e sem a presença de desintegrante na formulação.



Fonte: Autor, (2017).

Nesta primeira situação CSPV 18% e CSPV 28% se comportaram de forma semelhante nos primeiros 60 minutos de experimento seguido de uma sutil variação para CSPV 28%, que em 90 minutos chega a atingir 10 % de liberação, tendo seu máximo (15%) em 120 minutos.

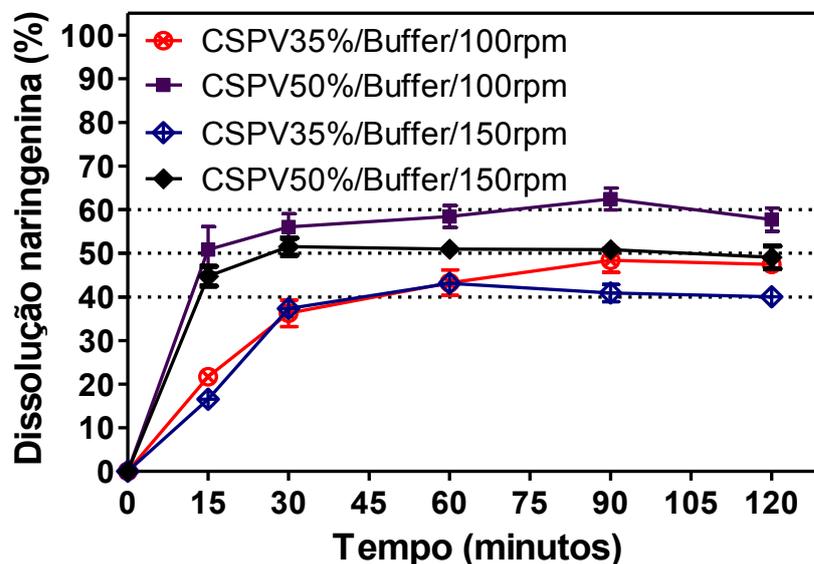
As demais composições, CSPV 35% e CSPV 50%, já mostram comportamento mais distinto entre elas, CSPV 35% tem sua dissolução máxima em 120 minutos (30 %). A formulação CSPV 50% mostrou um melhor perfil de liberação. Em 30 minutos

de dissolução tem liberado no meio 20% de flavonoides, seguindo com uma linearidade, atingindo sua liberação máxima (48%), em 120 minutos.

5.9.2 - Ensaio em tampão fosfato pH 7,4 para dissolução de CSPV 35% e CSPV 50% sob agitação de 100 e 150 rpm

A figura 14 representa os perfis de dissolução em tampão fosfato comparando a aplicação das diferentes agitações. Quando avaliada a CSPV 50% com agitação de 100 rpm, na primeira coleta, realizada com 15 minutos, já é possível observar que esta liberou 50% de seus flavonoides no meio, quando o ensaio chega a 60 minutos é atingida sua liberação máxima de 60%, que se mantém constante até o fim da dissolução em 120 minutos.

Figura 14 - Perfil de dissolução para CSPV 35% e CSPV 50%, em tampão fosfato, pH 7,4 e agitação de 100 e 150 rpm e sem desintegrante na formulação.



Fonte: Autor, (2017).

Quando submetida a agitação de 150 rpm em sua primeira coleta é observada uma diminuição acentuada na liberação dos flavonoides para o meio de dissolução, liberou apenas 15% de seu conteúdo em 15 minutos. No segundo ponto de coleta (30

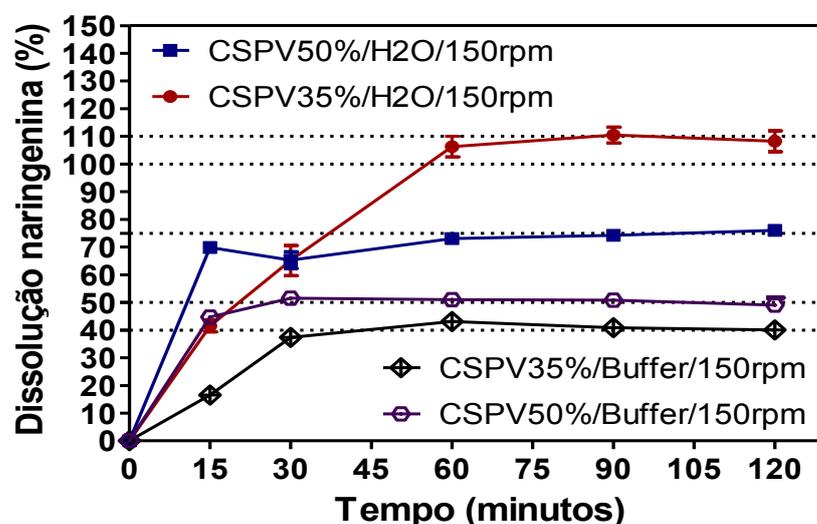
minutos) é atingida a liberação de 40% de seus flavonoides, concentração máxima que é mantida até o tempo final de 120 minutos.

Para CSPV 35% sob agitação de 100rpm a coleta inicial, 15 minutos, mostra absorvância equivalente a 20% de flavonoide no meio de dissolução e em 30 minutos esta concentração chega a 40%, se mantendo constante até a coleta em 120 minutos, sendo, portanto, sua liberação máxima em tampão. Esta mesma formulação, quando submetida a uma agitação de 150 rpm na primeira coleta mostra ter liberado para o meio de dissolução cerca de 20% de seu conteúdo ativo dobrando essa concentração em 30 minutos, quando alcançado 90 minutos de ensaio alcança sua liberação máxima e mostra concentração final de 50% de flavonoides totais no meio.

Na figura 15 mostra o perfil de dissolução dos caseinatos CSPV 35% e CSPV 50% comparando os resultados dos dois meios propostos quando as cápsulas são agitadas a 150 rpm e com a presença de desintegrante explosol.

A formulação CSPV 35% mostra uma liberação superior a 100%, mostrando que a velocidade da agitação influenciou na liberação dos flavonoides contidos nas micropartículas, já que em tampão fosfato sob esta mesma rotação a formulação tem uma liberação máxima de apenas 50%.

Figura 15 - Perfil de dissolução para CSPV 35% e CSPV 50%, em água e tampão fosfato pH 7,4, agitação de 150 rpm e presença de desintegrante na formulação.



Fonte: Autor, (2017).

Comportamento semelhante acontece na formulação CSPV 50% que liberou 75% de flavonoides no tempo de 120 minutos quando a água é utilizada como meio de dissolução, confirmando mais uma vez que no meio de tampão fosfato as micropartículas apresentam um perfil de liberação mais controlado, apresentando pouco solúvel neste solvente.

Um ponto importante observado neste estudo é que a proteína em sua forma micelar quando associada a própolis vermelha por meio da técnica de secagem por atomização, forma um complexo solúvel em meio aquoso. Conferindo solubilidade a própolis vermelha em meio aquoso. Mostrando também que em tampão fosfato a caseína atua controlando a liberação dos flavonoides para o meio.

5.10 - Microbiologia

Os resultados para os testes de sensibilidade dos microencapsulados frente as cepas de *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* mostram que as formulações apresentaram halos de inibição para as duas cepas avaliadas, destacando maior atividade de inibição para *Staphylococcus aureus*, que apresentou inibição com halos variando de 19 a 24 mm. Já o microrganismo *Pseudomonas aeruginosa* mostrou-se mais resistente as formulações, com halos menores, que variaram de 8 a 21 mm (Tabela 3 e figura 16).

De acordo com os resultados contidos na tabela 3 e figura 16 a formulação CSPV 28% mostrou halos maiores para *Staphylococcus aureus*, sendo 20 mm na concentração de 140 µg/mL (menor concentração) chegando a 24 mm na concentração de 695 µg/mL (maior concentração). O fato para esta formulação apresentar o maior halo de inibição pode estar relacionado a baixa eficiência de encapsulação, ficando assim uma maior concentração de extrato de própolis na superfície do microencapsulado.

Tabela 3 – Teste de sensibilidade de difusão em disco das formulações CSPV 28%, 35% e 50% frente a cepas de *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*

Amostra	Concentração (µg/poço)	Halos de Inibição (mm)	
		<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>
CSPV 28%	695	24	15
	500	22	19
	250	21	19
	140	20	8
CSPV 35%	695	20	21
	500	19	15
	250	21	14
	140	20	14
CSPV 50%	733	20	15
	500	19	14
	250	21	14
	140	19	14

Fonte: Autor, (2017).

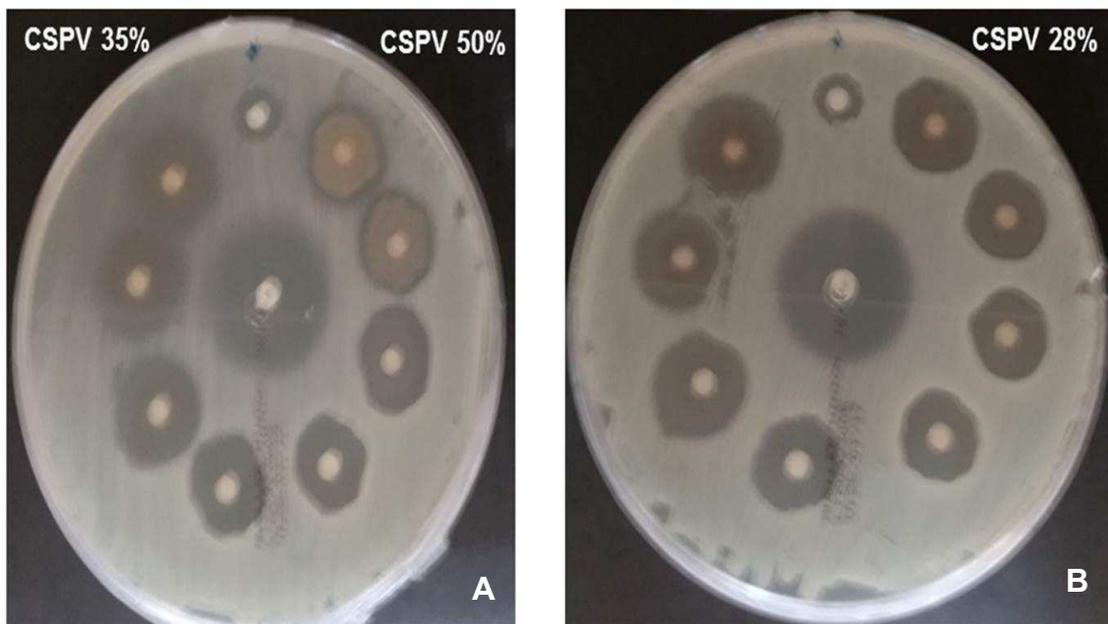
Quando medidos os halos formados por CSPV 35% e CSPV 50% estes apresentam valores próximos nas duas formulações, com halos entre 19 mm e 21 mm. Assim como em CSPV 28% mostraram maior sensibilidade para *Staphylococcus aureus* (Tabela 3 e figura 16).

Esses resultados corroboram com os resultados encontrados por Fernandes-Júnior et al. (2006), Portilho et al. (2013) e Cabral et al. (2009), esses autores testaram extratos de própolis de diferentes regiões do país, em microrganismos Gram-positivos e negativos, dentre eles *S. aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*, constatando uma maior sensibilidade dos microrganismos Gram-positivos aos extratos.

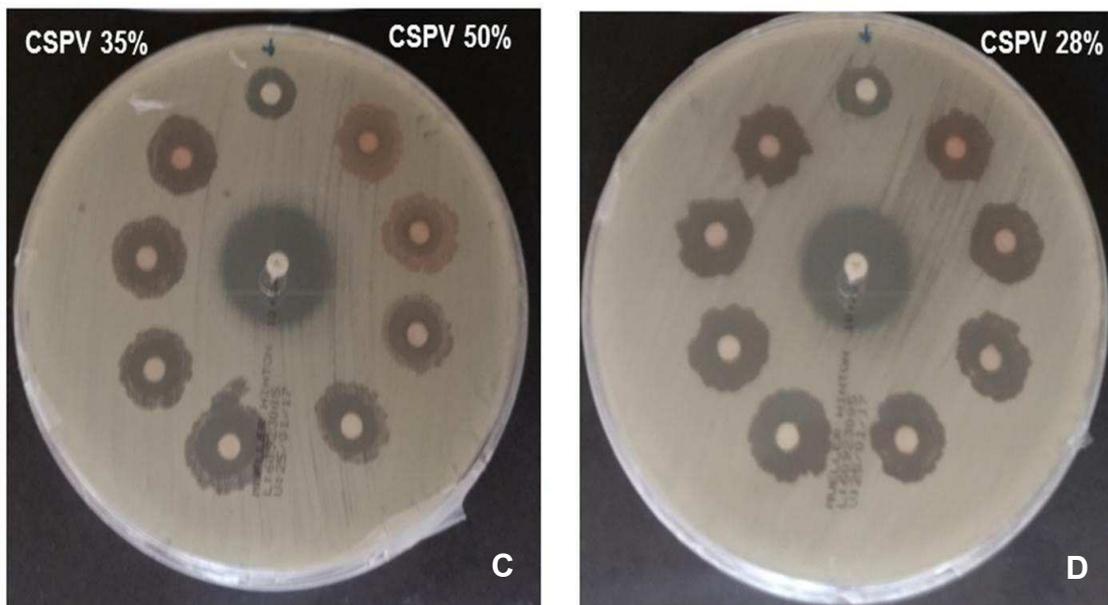
Os resultados demonstram que os caseinatos de própolis vermelha demonstram atividade antimicrobiana e podem ser aplicados em terapias antibioticoterapias naturais de amplo espectro para bactérias gram-positivas e negativas, especialmente *S aureus* e *pseudomonas aeruginosa*.

Figura 16 – Atividade antimicrobiana por difusão em disco em placa de petri das composições CSPV-28%, CSPV-35% e CSPV-50% em diferentes concentrações frente as cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. Ao centro nas figuras A e B mostram o controle positivo (antibiótico ampicilina) ao centro da placa C e D o controle positivo é o antibiótico ciprofloxacino

Staphylococcus aureus



Pseudomonas aeruginosa



6 - CONCLUSÃO

- Por meio de diferentes técnicas foi possível comprovar a ocorrência da microencapsulação do extrato de própolis vermelha na matriz proteica;
- O pó obtido possui propriedades reológicas adequadas e com reprodutibilidade para produção em escala industrial;
- O complexo formado se mostrou solúvel em meio aquoso;
- As formulações apresentam liberação controlada em meio tampão fosfato pH 7,4;
- Os microencapsulados apresentaram atividades antioxidante e antimicrobiana semelhante ao extrato puro;
- Foi obtido produto nutracêutico com propriedades funcionais e características adequadas para incorporação em produtos alimentícios.

REFERÊNCIAS

ACKERMAN, T. Fast Chromatographic study propolis crudes. **Food Chemistry**. v. 42. p. 135-138. Israel, 1991.

AJAIKUMAEKUMAR, K. B. et al. The inhibition of gastric mucosal injury by *Punicagranatum* L. (pomegranate) methanolic extract. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 96, n. 1 - 2, n. 171 – 176, jan. 2005.

ASCHERI, D. P. R.; et al. Microencapsulação de óleo essencial de laranja: seleção de material de parede. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 23, p. 1-6, 2003.

AULTON, M. E. **Delineamento de formas farmacêuticas**. 2ª ed. Porto Alegre: Artemed, 2005.

BOCHAR, M. et al Development and characterization of a novel drug nanocarrier for oral delivery, based on self-assembled β -casein micelles. **Journal of Controlled Release**. v. 160, n. 2, p. 164 – 171, jun. 2012.

BRASILEIRO, J. S. I. **Microencapsulação de compostos bioativos: inovação em diferentes áreas**. 2011. Dissertação (Mestrado Integrada em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Fernando Pessoa, Porto, 2011.

BRUICE, P. Y. **Química Orgânica**. 4ª ed. São Paulo: Pearson Prentice Hall, 2006.

BRUSCHI, M. L. et al. Gelatin microparticles containing propolis obtained by spray drying technique: preparation and characterization. **International Journal of Pharmaceutics**. V. 264, n. 1-2, p. 45-55, out.2003.

CASTALDO, S.; CAPASSO, F. Propolis, na old remedy used in modern medicine. **Fitoterapia**. V. 73, n. 1, p. 51-56, nov. 2002.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Fundamentos de Cromatografia**. Campinas-SP: Editora Unicampi, 2006.

COUTO, R. H. N.; COUTO, L. A. APICULTURA: manejos e produtos. 3 ed. Jaboticabal: FUNEP, 2006. Cap. 5, p. 108-127.

DAUGSCH, A. et al. Brazilian red própolis – chemical composition and botanical origin. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**. V. 5, p. 435-441, jul. 2007.

DIAZ-CARBALLO, D. et al. The contribution of plukenetion A to the anti-tumoral activity of cuban própolis. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**. v. 16, n. 22, p. 9635 – 9643, nov. 2008.

DIAZ-CARBALLO, D. et al. The contribution of plukenetione A to the anti-tumoral activity of cuban própolis. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**. V. 16, n. 22, p. 9635-9643, nov. 2008.

ELZOGHBY, A.O.; EL-FOTOH, W. S. A.; elgindy, n. a. Casein-based formulations as promising controlled release drug delivery systems. **Journal of Controlled Release**. V. 153, p. 206 – 216, 2011.

ESTEVEES, B. N. **Influência do processo de secagem por pulverização mecânica (spray dryer) no tamanho de partícula e densidade aparente do café solúvel**. 2006. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006. Orientador: Cláudio Roberto F. Pacheco.

ESTEVINHO, B. N. Microencapsulation with chitosan by spray drying for industry application – A review. **Trends in Food Science & Technology**. v. 31, n. 2, p. 138-155, jun. 2013.

FARMACOPEIA BRASILEIRA (FARM.BRAS.) 5ª ed. Brasília: Editora Fiocruz, 2010.

FERNANDES-JÚNIOR, A. et al. Atividade antimicrobiana de própolis de *Apis mellifera* obtidas em três regiões do Brasil. **Ciência Rural**, v.36, n.1, jan-fev, 2006.

FORTUNA, L. A. P.; **Estudo da estabilidade da micela de caseína em leite estável e instável não ácido**. 2015. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Universidade de Caxias do Sul, Caxias do Sul, 2015. Orientador: Sergio Echeverrigaray.

FOX, P. F.; BRODKORB, A. The casein micelle: historical aspects, current concepts and significance. **International Dairy Journal**. v. 18, n. 7, p. 677 – 684, jul. 2008.

GARCIA, C. S. C. et al. Avaliação do potencial biológico da própolis vermelha brasileira em células hep-2. XIX Encontro de Jovens Pesquisadores - Novembro de 201. Universidade de Caxias do Sul.

GOULA, A.M. Spray drying of tomato pulp in dehumidified air: I. The effect on product recovery. **Journal of Food Engineering**. v. 66, p. 25 – 34, out. 2005.

HALLIWELL, B. et al. The characterization of antioxidants. **Food and Chemical Toxicology**. v. 33, n. 7, p. 601 – 617, jul. 1995.

HARAGUCHI, F. K.; ABREU, W. C.; PAULA, H. Proteínas do soro do leite: composição, propriedades nutricionais, aplicações no esporte e benefícios para a saúde humana. **Revista Brasileira de Nutrição**. v. 19, n. 4, p. 488, jul./ago. 2006.

HUTER, R. J. **Zeta Potencial in Colloid Science: principles and application**. Londor: Academic Press, 1981.

IONASHIRO, M. **Giolito: Fundamentos da Termogravimetria, Análise Térmica Diferencial, Calorimetria Exploratória Diferencial**. Araraquara-SP. Giz Editorial, 2004.

KAHN, H. Microscopia eletrônica de varredura e microanálise química. **Microscopia Eletronica de Varedurra**. Disponível em:

http://www.angelfire.com/crazy3/qfl2308/1_multipart_xF8FF_4_MEV_PMI-2201.pdf. Acesso em: 12 jul. 2016.

KARAKAYA, S. Bioavailability of phenolic compounds. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**. v. 44, n. 6, p. 453 – 464, ago. 2010.

LUTOSA, S. R. et al. Própolis: atualização sobre a química e a farmacologia. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 18, n. 3, p. 447 – 454, jun. - set. 2008.

MALISK, A. M. Microscopia Eletrônica de Varredura. **Material Didático de Microscopia Eletrônica de Varredura e Microanálise**, Departamento de Engenharia Mecânica da Universidade Federal de Santa Catarina, 2000. Disponível em: http://www.usp.br/nanobiodev/wp-content/uploads/MEV_Apostila.pdf. Acesso em: 18 de abr. 2016.

MARCOLONG, R. **Dissolução de medicamentos: fundamentos, aplicações, aspectos regulares e perspectivas na área farmacêutica**. 2003. Dissertação (Mestrado em Farmácia e Medicamentos) – Universidade de São Paulo, São Paulo-SP, 2003. Orientadora: Silvia Storpirtis.

MARTINS, D. F. F. **Estudo intergrado de potencial fitorremediador da *Eichhornia crassipes* em ambiente naturais e sua utilização para obtenção de extratos proteicos**. 2014. Tese (Doutorado em Química) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2014. Orientador: Maria de Fátima Vitória.

MENDONÇA, I. C. G. et al. Brazilian red propolis: phytochemical screening, antioxidante activity and effect against câncer cells. **Complementary and Alternative Medicine**. Out. 2015.

MIRHOSSEINI, H. et al. Effect of Arabic gum, xanthan gum and orange oil contents on ζ -potential, conductivity, stability, size index and pH of orange beverage emulsion. **Colloids and Surfaces**. V. 315, n. 1 – 2, p. 47 – 56, fev. 2008.

MIYAKE, T. Métodos de extração e fracionamento de extratos vegetais. Disponível em:
http://www.academia.edu/14722953/Thaila_Miyake_M%C3%89TODOS_DE_EXTRA%C3%87%C3%83O_E_FRACIONAMENTO_DE_EXTRATOS_VEGETAIS. Acesso em: 07 maio 2016.

MOREIRA, G. E. G. **Obtenção e caracterização de extrato microencapsulado de resíduo agroindustrial de acerola**. 2007. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2007. Orientadora: Maria de Fátima Dantas de Medeiros.

NAITO, Y. et al. Antiinflammatory effect of topically applied própolis extract in carrageena-induced rat hind paw edema. **Phytotherapy Research**. V. 21, n. 5, p. 452-456, maio 2007.

NASCIMENTO, T. G. et al. Polymeric nanoparticles of brasilian red propolis extract: preparation, characterization, antioxidante and leishmanicidal activity. **Nanoscale Research Letters**. Jun. 2016.

NCCLS. *Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard— Eighth Edition*. NCCLS document M2-A8 [ISBN 1-56238-485-6]. NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2003.

NETO, C. C. **Análise Orgânica: Métodos e Procedimentos Para a Caracterização de Organoquímios**. Editora UFRJ, 2004.

NINFALI, P. et al. Antioxidant capacity of vegetables, spices and dressings relevant to nutrition. **British Journal of Nutrition**. v. 93, n, 2, p. 257 – 266, fev. 2005.

NORI, M. P.; et al. Microencapsulation of propolis extract by complex coacervation. **Food Science and Technology**.v. 44 p. 429-435. São Paulo, 2011.

OLIVEIRA, D. S.; TIMM, C. D. Instabilidade da caseína em leite sem acidez adquirida. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**. V. 102, n. 561 – 562, p. 17 – 22, jan. – jun. 2007.

ONEDA, F.; RÉ, M. I. The effect of formulation variables on the dissolution and physical properties of spray-dried microspheres containing organic salt. **Powder Technology**. v. 130, n. 1 – 3, p. 377 – 384, Fev. 2003.

PENALVA, R. et al. Casein nanoparticles as carriers for the oral delivery of folic acid. **Food Hydrocolloids**. V. 44, p. 399 – 406, out. 2014.

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, Pub.1, Abril 2013. *Quim. Nova*, Vol. 32, No. 6, 1523-1527, 2009.

PROUDLOVE, R. K. **Os alimentos em debate uma visão equilibrada**. Varela: São Paulo, 1996.

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

RAZMI, M. et al. Beta-casein and its complexes with chitosan as nanovehicle for delivery of a platinum anticancer drug. **Colloids na Surfaces B: Biointerfaces**. V. 112, p. 362 – 367, dez. 2013.

RIGHI, A. A. et al. Brazilian red própolis: unreported substances, antioxidante, and antimicrobial activities. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. V. 91, n. 13, p. 2363-2370, out. 2011.

SGARBIERI, V. C. **Proteínas em Alimentos Protéicos: Propriedades – Degradações – Modificações**. São Paulo-SP: Livraria Varela LTDA, 1996.

SGARBIERI, V. C. Review: structural and physicochemical properties of milk proteins. **Brazilian Journal of Food Technology**. V. 8, n. 1, p. 43 – 56, jan. – mar. 2005.

SHAHIDI, F.; ALASAVAR, C.; LIYANA-PATHIRANA, C. M. Antioxidant phytochemicals in hazelnut kernel (*corylus avellana* L) and hazelnut byproducts. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 55, n. 4, p. 1212 – 1220, jan. 2007.

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

SILVA, B. M. et al. Quince (*Cydonia oblonga* Miller) fruit (pulp, peel and seed) and jam: antioxidante activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 52, n. 15, p. 4705 – 4712, jul. 2004.

SILVA, B. B. et al. Chemical composition and botanical origin of red propolis, a new type of Brazilian propolis. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**. v. 5, n. 3, p. 313-316, jun. 2007.

SILVA, O. G. **Hidroxiapatita Mesoporosa Pura e Modificada Organicamente com Grupos Nitrogenados – Síntese, Caracterização e Uso como Carreadora de Fármacos**. 2010. Tese (Doutorado em Química) – Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2010. Orientador: Maria Gardênnia da Fonseca.

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

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

SOUZA, L. C. **Interação entre caseína micelar e nanoblendas de polidiacetileno/copolímeros triblocos (EO)_n – (PO)_m – (EO)_n**. 2014. Dissertação

(Mestrado em tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais. 2014. Orientador: Ana Clarissa dos Santos Pires.

SWATI, M. et al. Review on spray drying technology. **International Journal of Pharmaceutical, Chemical and Biological Sciences**. v. 4, n. 2, p. 219-225, 2014.

TRUSHEVA, B. et al. Bioactive constituents of brazilian red própolis. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**. V. 3, p. 249-254, jun. 2006.

WILSON, K.; WALKER, J. **Principles and Techniques of Biochemistry and Molecular Biology**. 7^a ed. Cambridge University Press, 2010.

YOSHII, H. et al. Flavor release from spray-dryer maltodextrin/gum arabic or soy matrices as a function of storage relative humidity. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**. v. 2, n. 1, p. 51-61, mar. 2001.