



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS – UFAL
FACULDADE DE NUTRIÇÃO – FANUT
MESTRADO EM NUTRIÇÃO



**OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE EXTRATOS GALÊNICOS E
EXTRATOS SECOS SPRAY-DRYER DA PRÓPOLIS VERMELHA DE
ALAGOAS**

VALTER ALVINO DA SILVA

VALTER ALVINO DA SILVA

**OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE EXTRATOS GALÊNICOS E
EXTRATOS SECOS SPRAY-DRYER DA PRÓPOLIS VERMELHA DE
ALAGOAS**

Dissertação apresentada à Faculdade de Nutrição da Universidade Federal de Alagoas como requisito à obtenção do título de Mestre em Nutrição.

Orientador: Prof. Dr. Ticiano Gomes do Nascimento

Co-orientador: Prof. Dr. Irinaldo Diniz Basílio Júnior

Maceió – 2011.

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central

Bibliotecário: Marcelino de Carvalho

S586o Silva, Valter Alvino da.
Obtenção e caracterização de extratos galênicos e extratos secos spray-dryer da própolis vermelha de Alagoas / Valter Alvino da Silva. – Maceió, 2019.
74 f. : il.

Orientador : Ticiano Gomes do Nascimento.
Co-orientador : Irinaldo Diniz Basílio Júnior.
Dissertação (Mestrado em Nutrição) – Universidade Federal de Alagoas Faculdade de Nutrição. Programa de Pós-Graduação em Nutrição. Maceió, 2011.

Bibliografia: f. 69-72.
Apêndice: f. 74.

1. Flavonoides. 2. Própolis. 3. Curativos oclusivos. 4. Dissolução. I.
Título.

CDU: 612.39:638.135



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
FACULDADE DE NUTRIÇÃO
MESTRADO EM NUTRIÇÃO

Campus A. C. Simões
BR 104, km 14, Tabuleiro dos Martins
Maceió-AL 57072-970
Fone/fax: 81 3214-1160



PARECER DA BANCA EXAMINADORA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO

**OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE EXTRATOS GALÊNICOS E
EXTRATOS SECOS SPRAY-DRYER DA PRÓPOLIS VERMELHA DE
ALAGOAS**

por

VALTER ALVINO DA SILVA

A Banca Examinadora, reunida aos 09 (nove) dias do mês de maio de

2011, considera o candidato APROVADO.

Prof. Dr. Ticiano Gomes do Nascimento
Faculdade de Enfermagem e Farmácia
Universidade Federal de Alagoas
(Orientador)

Prof. Dr. Maria Cristina Delgado
Faculdade de Nutrição
Universidade Federal de Alagoas
(Examinadora)

Prof. Dr. Zenaldo Rorfirio
Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde
Universidade Federal de Alagoas
Universidade Estadual de Ciências da Saúde de Alagoas
(Examinador)

DEDICATÓRIA

Dedicado a toda minha família que direta ou indiretamente contribuíram para o sucesso desse trabalho. Também dedicado a todos que tornaram-se parte da minha vida.

AGRADECIMENTOS

- Agradeço a Deus pela inspiração e sorte, pois me mostrou caminhos “em meio a tempestade”.
- Agradeço ao Alex por toda paciência, compreensão e incentivo, principalmente nos momentos mais difíceis.
- Agradeço ao meu orientador Prof. Dr. Ticiano Gomes do Nascimento por todo empenho e dedicação e também ao meu co-orientador Prof. Dr. Irinaldo Diniz Basílio Júnior. Sem vocês não seria possível a realização desse trabalho.
- Agradeço a minha irmã Zefinha que sempre cuidou de mim.
- Agradeço a todos que estiveram ao meu lado, parentes e amigos: Cida, Ana Lúcia, Inês Cristina e Dona Bernadete, José Cruz e Sandra Fernandes, Adriana Fernandes, Bruno Fernandes, Márcia Patriota, Marta Patriota, Anarleide e Everaldo Patriota, Ana Maria Moreira, Maria do Socorro, Jebson...
- Agradeço aos participantes da banca examinadora, afinal, vocês também são importantes na minha vida, em especial ao Prof. Dr. Porfírio, pela confiança e incentivo.
- Agradecimento especial à Prof^a. Dr^a. Camila Braga Dornelas pela colaboração.
- Agradeço, também, à equipe do CPML/UNCISAL e UFAL. Vocês contribuíram enormemente para o avanço da educação em nossa região.

RESUMO

Os produtos nutracêuticos a base de própolis vem ganhando mercado no mundo inteiro devido a sua excelente atividades antioxidante, antimicrobiana, cicatrizante, antiinflamatória, antineoplásica devido a presença de flavonóides e compostos fenólicos na sua composição. Para solucionar alguns gargalos tecnológicos da produção de produtos nutracêuticos a base de própolis, dificuldade de manipulação da matéria-prima com característica resinosa, bem como a necessidade de estabilizar o produto intermediário devido a sua fotoestabilidade. O presente trabalho teve como objetivo produzir extratos secos de própolis vermelha a partir de formulações contendo extrato de própolis e avaliar a qualidade dessas formulações através de ensaios de dissolução e atividade antimicrobiana. Os extratos secos A, B, C e D de própolis vermelha foram obtidos pela técnica de Spray-Dryer usando dióxido de silício coloidal, amido pré-gelatinizado e gelatina incolor. Os adjuvantes, glicolato de amido sódico e carboximetilcelulose sódica, também foram utilizados nas formulações. Os extratos secos nebulizados foram avaliados quanto ao teor de marcadores majoritários (flavonóides) da própolis vermelha usando CLAE-UV. Apenas os extratos secos A e D apresentaram teor de flavonóide próximo a 100%. Os extratos secos B e C apresentaram teor de flavonóides de 68% e 131%. Os extratos secos nebulizados A e D, foram submetidos aos ensaios de dissolução para avaliar o grau de solubilização dos marcadores da própolis em diferentes faixa de pH (1,0; 6,8 e 7,4) simulando as condições do trato gastrointestinal. Os marcadores presentes nos extratos secos de própolis vermelha apresentaram melhor solubilização em pH próximo a neutralidade com valores de dissolução maior que 75%. Na análise da atividade antimicrobiana a própolis vermelha apresentou uma excelente ação frente a *Pseudomonas aeruginosa* produtora de Metalobetalactamase. Os compostos associados a essa atividade mantiveram-se preservados, mesmo após o processamento de secagem o que torna essa técnica perfeitamente viável para a produção de nutracêuticos.

Palavras-chave: Própolis vermelha, flavonoides, extratos Spray-Dryer, método CLAE-UV, teste de dissolução.

ABSTRACT

The nutraceutical products based propolis has gained worldwide market due to its excellent antioxidant, antimicrobial, tissue healing, inflammatory, anticancer properties. The red propolis from the Alagoas, a province from northeastern of the Brazil, is proven antimicrobial, tissue regeneration and antioxidant activities. To solve some technological problems in the production of nutraceuticals based on propolis, poor handling of raw materials due to resinous characteristics and the need to stabilize the intermediate product due to its photostability, there was a need for development of analytical tool for quality control using HPLC method and dissolution method to demonstrate the releasing of dried extracts of red propolis. The dried extracts A, B, C and D of red propolis were obtained by the technique of spray-dryer using colloidal silicon dioxide, pregelatinized starch and gelatin. Adjuvants, sodium starch glycolate and sodium carboxymethyl cellulose, were also used in the formulations. The dry extracts were evaluated for nebulized content of major labels (flavonoids) from propolis using HPLC-UV. The Liquid Chromatographic (LC) method consisted of a mobile phase of methanol:formic acid in a gradient system, RP-column (C₁₈), temperature of oven (40°C) and UV detection at 281nm. Uniformity of content and dissolution method were used to assurance the quality of spray-dryer extract of red propolis. The HPLC method presented precision, accuracy and linearity for 4 majors from red propolis studied. Only the dried extracts A and D had flavonoid content close to 100%. The dried extracts B and C had flavonoid content of 68% and 131%. The nebulized dried extracts A and D were subjected to dissolution testing to assess the degree of solubilization of the markers of propolis in different pH range (1.0, 6.8 and 7.4) simulating the Gastrointestinal tract. The markers present in the dried extracts of propolis showed better solubility at pH around neutrality, with values of greater than 75% of dissolution after 120 minutes. There were influences of adjuvants in the dissolution velocity of the markers of propolis. The red propolis showed excellent activity against *Pseudomonas aeruginosa* Metalobetalactamase production. The compounds associated with this activity remained preserved even after the drying process. This technic can produce nutraceuticals.

Keywords: red propolis, flavonoids, spray-dryer extracts, LC-UV method, Dissolution test.

LISTA DE FIGURAS

Capítulo de revisão

Figura 1	Algumas classes de flavonóides encontrados em pólen, mel e própolis (MARCUCCI et al, 2010).....	10
Figura 2	Flavonóides encontrados no mel e alguns deles também na própolis (MARCUCCI et al, 2010).....	11
Figura 3	Exemplos de compostos fenólicos não incluídos no grupo dos flavonóides (MARCUCCI <i>et al</i> , 2010).....	12
Figura 4	Tipos de aspersores. A- Aspersor pneumático. B- Aspersor por disco giratório.....	20
Figura 5	Aparelho de dissolução com pá agitadora (dimensões em mm).....	25
Figura 6	Aparelho de dissolução com cesto de redes (dimensões em mm)...	26

LISTA DE FIGURAS

Artigo de resultados

- Figura 1** Espectros UV dos padrões autênticos dos flavonóides encontrados na própolis vermelha de Alagoas..... **48**
- Figura 2** (A) Perfil cromatográfico do extrato bruto de própolis vermelha na concentração de 1 mg/mL. (1) catequina, (2) epicatequina, (3) ácido caféico, (4) ácido p-coumárico, (5) ácido ferúlico, (6) rutina, (7) quercetina, (8) luteolina, (9) formononetina, (10) pinocembrina, (11) biochanina A e (12) crisina. (B) Perfil cromatográfico ampliado do extrato bruto de própolis vermelha. (1) catequina, (2) epicatequina, (3) ácido caféico, (4) ácido p-coumárico, (5) ácido ferúlico, (6) rutina, (7) quercetina, (8) luteolina..... **50**
- Figura 3** Flavonóides identificados na própolis vermelha de Alagoas, região de Marechal Deodoro..... **51**
- Figura 4** Cromatogramas das sub-frações clorofórmicas de própolis vermelha. Cromatogramas: (A) subfração 17/21, (B) 40/54, (C) 58/62 e (D) 87/95..... **55**
- Figura 5** Cromatogramas dos extratos de própolis vermelha em detector (λ_{max} . 281nm). (A) tintura de própolis na concentração de 200 μg / mL, (B) O ESPV A na concentração de 200 μg / mL e (C) ESPV B a uma concentração de 200 μg / mL..... **58**
- Figura 6** Fotomicroscopia de Varredura Eletrônica dos Extratos Secos A, B, C e D da própolis vermelha de Alagoas. Fotomicrografias A1, B1, C1 e D1 ampliação de 500 vezes(escala 50 μm); A2, B2, C2 e D2 ampliação de 1000 vezes(escala 10 μm) e A3, B3, C3 e D3 ampliação de 2000 vezes(escala 10 μm)..... **60**
- Figura 7** Curva de calibração de 5 marcadores majoritários da própolis vermelha..... **62**
- Figura 8** Perfis de dissolução de quatro componentes principais presentes no ESPV A e D, (gráficos 1, 2, 3 e 4). Os gráficos mostram as três condições testadas, a pH 1,0, pH 6,8 e pH 7,4..... **64**

LISTA DE TABELAS

Artigo de resultados

Tabela 1	Perfil de resistência da <i>Pseudomonas aeruginosa</i> multirresistente produtora de Metalobetalactamase.....	46
Tabela 2	Atividade antimicrobiana da fração clorofórmica de própolis vermelha.....	53
Tabela 3	Atividade antimicrobiana das sub-frações clorofórmicas de própolis vermelha.....	54
Tabela 4	Determinação do teor de 4 marcadores nos ESPV.....	57
Tabela 5	Atividade antimicrobiana do pó de própolis vermelha obtido a partir das formulações A, B, C, e D.....	61
Tabela 6	Precisão dos marcadores de própolis vermelha.....	63

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1 – Produto Natural.....	3
2.2 - Origem da própolis.....	3
2.3 - Fonte botânica da própolis.....	4
2.4 - Composição química da própolis.....	5
2.4.1 – Flavonóides.....	7
2.4.2 – Isoflavonóides.....	13
2.5 - Ensaio químicos e físico-químicos com a própolis.....	13
2.6 - Atividade biológica da própolis.....	13
2.7 - Emprego da própolis como alimento funcional.....	16
2.8 - Secagem de produtos alimentícios por Spray-Dryer.....	18
2.9 – Microencapsulação.....	21
2.10 Vantagens e desvantagens da secagem por spray-Dryer.....	22
2.11 - Ensaio de Dissolução.....	23
2.11.1 - Métodos de dissolução.....	24
2.12 – Referências.....	27
3. ARTIGO DE RESULTADOS.....	37
<i>OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE EXTRATOS GALÊNICOS E EXTRATOS SECOS SPRAY-DRYER DA PRÓPOLIS VERMELHA DE ALAGOAS</i>	
<i>EXTRACTION AND CHARACTERIZATION OF GALENIC EXTRACTS AND SPRAY-DYER EXTRACTS OF RED PRÓPOLIS FROM ALAGOAS</i>	
4. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	73
5. APÊNDICE.....	74

1. INTRODUÇÃO

A própolis é um produto natural que desde o início das civilizações vem sendo utilizado pela humanidade. É uma mistura complexa de substâncias que variam de acordo com flora da região, tornando-a de várias tonalidades diferentes e com isso surgiu a necessidade de classifica-la de acordo com cor apresentada. A região em que se coleta a própolis determina o tipo de substâncias bioativas e a quantidade dessas, assim, determinados tipos de própolis apresentam ação biológica superior em comparação a outros tipos (ALENCAR *et al.*, 2007).

A própolis vermelha do nordeste do Brasil vem ganhando destaque mundial por apresentar atividade biológica superior aos outros tipos de própolis (ALENCAR *et al.*, 2007). Ela possui uma excelente ação cicatrizante, antibacteriana, antifúngica entre outras ações biológicas e, em especial, antioxidante. Essas ações são correlacionadas ao alto teor de flavonoides presentes, os quais também desempenham um importante papel na saúde humana e muitos desses somente são encontrados na própolis vermelha dessa região. Embora muitas substâncias ainda não tenham sido identificadas, acredita-se que os flavonoides desempenham papel principal nas ações biológicas (FALCÃO *et al.*; 2010).

Os flavonóides possuem excelente ação antioxidante, minimizando a peroxidação lipídica e o efeito dos radicais livres, já que não formam subprodutos instáveis. A quercetina e luteolina demonstraram ter essa ação, além de antocianinas que são descritas como um dos principais flavonoides de ação antioxidante. As antocianinas são utilizadas em diversas áreas devido ao seu grande potencial terapêutico, incluindo a fabricação de vinhos. Além da ação antioxidante, outras ações são atribuídas aos flavonoides, como: antimicrobiana, cicatrizante, antiinflamatória, antineoplásica, imunomodulatória, etc (MARCUCCI *et al*, 2010).

O método de secagem utilizando Spray-Dryer é um método comum para desidratar produtos alimentícios. Utilizando essa técnica, Bruschi *et al.*; (2003) produziram micropartículas de própolis as quais foram analisadas utilizando microscopia eletrônica de varredura e cromatografia. A técnica mostrou-se eficiente quanto à formação de micropartículas utilizando como adjuvante a gelatina, além de

ser um método de baixo custo. A secagem também reduziu o sabor amargo e o cheiro característico da própolis.

Atualmente são identificados diversos produtos como sendo alimentos funcionais. Eles colaboram para melhorar o metabolismo e prevenir problemas de saúde, oferecendo uma melhor qualidade de vida. A própolis também é empregada na forma de alimentos funcionais, que se caracterizam por oferecer vários benefícios à saúde, além do valor nutritivo inerente à sua composição química, podendo desempenhar um papel potencialmente benéfico na redução do risco de doenças; e nutracêutico, que proporciona benefícios médicos e de saúde, incluindo a prevenção e/ou tratamento da doença através de nutrientes isolados ou outras preparações (MORAES & COLLA, 2006).

Visando padronizar técnicas que preservassem as propriedades biológicas da própolis vermelha, o presente trabalho desenvolveu técnicas de secagem estabelecendo marcadores biológicos com a finalidade de utilizá-la como um subsídio para produção de nutracêuticos. Com isso, a utilização de própolis vermelha na dieta humana poderá favorecer o reestabelecimento da saúde ou garantir a manutenção do pleno funcionamento dos sistemas biológicos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 – Produto Natural

Os produtos naturais fazem parte da vida do homem desde seus primórdios como fonte de alimentos, defesa e ataque, e como meio restaurador da saúde. Nos dias de hoje, representam uma das alternativas entre as diversas fontes de insumos necessários à existência da sociedade, tendo como principal vantagem o fato de ser uma fonte renovável e, em grande parte, controlável pelo homem. Os animais, as plantas e os microrganismos são uma fonte importante de produtos naturais biologicamente ativos (PETROVICK *et al.*, 2007).

2.2 - Origem da própolis

A própolis é um dos muitos produtos naturais que vem sendo utilizado durante séculos pela humanidade (VARGAS *et al.*, 2004). O uso de extratos de própolis na medicina popular data de 300 a.C. (DA SILVA *et al.*, 2006). Atualmente foi constatada a existência de aproximadamente noventa produtos a base de própolis (dentre eles cápsulas, condicionador, xampu, sabonete, batom, bala, chá, protetor solar, gel pós barba, creme, pomada, etc.) disponíveis no mercado brasileiro (LUSTOSA *et al.*, 2008).

A palavra própolis é derivada do grego *pro* (em defesa) e *polis* (cidade ou comunidade), ou seja, é uma substância que tem a finalidade de proteger a comunidade das abelhas (PEREIRA *et al.*, 2002). É uma mistura complexa, formada por material resinoso e balsâmico coletado pelas abelhas dos ramos, flores, pólen, brotos e exudatos de árvores; além desses, na colméia, as abelhas adicionam secreções salivares e enzimas. Possui coloração e consistência variada e é utilizada pelas abelhas para reparar os favos de mel, para fechar pequenas frestas, embalsamar insetos mortos, bem como proteger a colméia contra a invasão de microrganismos, promovendo um ambiente asséptico dentro da colméia (ALENCAR *et al.*, 2005; FERNANDES JÚNIOR *et al.*, 2006).

As abelhas da espécie *Apis mellifera* foram introduzidas no Brasil em 1893 pelo padre português Antônio Carneiro e são responsáveis pela elaboração do produto

natural chamado própolis (PEREIRA *et al.*, 2002). Em 1956 houve a introdução de abelhas africanas com o objetivo de melhorar a produção de mel, porém um escape acidental de abelhas rainha resultou em africanização das abelhas, devido à reprodução entre abelhas européias e africanas. Diante deste fato, hoje em dia, as abelhas presentes no Brasil são reconhecidas como abelhas africanizadas (PEREIRA *et al.*, 2002).

As abelhas coletam os materiais lipofílicos nas folhas e germes, látex, resinas, e os transformam em própolis na colméia após a mastigação e adição de enzimas salivares, produzidas no momento da coleta da matéria-prima, como também pela adição de cera (CASTALDO & CAPASSO, 2002). As abelhas elaboram a própolis na colméia, para as mais variadas funções: proteção contra insetos, microrganismos e agentes externos (frio), diminuição de aberturas de entrada e saída da colméia, mumificação de cadáveres de insetos (evita a decomposição e putrefação), reparo de frestas e rachaduras na colméia. Além do mais, a própolis é encontrada na colméia, soldando os favos estragados e conservando os favos móveis. Desta forma, a própolis promove um ambiente asséptico no interior da colméia para postura da abelha rainha, onde convive neste espaço restrito mais de setenta mil indivíduos (SUZUKI, 2000; FERNANDES JÚNIOR *et al.*, 2006; SIMÕES *et al.*, 2008).

2.3 - Fonte botânica da própolis

Recentemente, foi descoberto uma própolis vermelha em colméias localizadas no caule de arbustos de manguezais, ao longo da costa dos rios e mar dos estados de Alagoas, Paraíba, Pernambuco, Sergipe e Bahia, situados na região Nordeste do Brasil. Foi observado que as abelhas coletavam o exsudato vermelho da superfície dos buracos feito pelos insetos no tronco de *Dalbergia ecastophyllum* (L) Taub. (DONNELLY *et al.*, 1973; MATOS *et al.*, 1975), conhecida como “rabo-de-bugio”, sendo essa a origem botânica dessa nova própolis (DAUGSCH *et al.*, 2007).

Daugsch *et al.* (2007) revelaram através da cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (CLAE-FR) e da cromatografia em camada delgada de alta eficiência em fase reversa (CCDA-FR), o perfil cromatográfico de comparação qualitativa e quantitativa dos constituintes químicos da própolis e do exsudato resinoso de *D. ecastophyllum*, indicando que, o perfil cromatográfico da própolis é idêntico ao da

resina de *D. ecastophyllum*. Inúmeras espécies de plantas são encontradas no litoral nordestino produzindo um exsudato de cor avermelhado, a exemplo de *Anacardium occidentale* L. (“cajueiro”, *Anacardiaceae*), *Clusia* sp. (“cebola-da-restinga”, *Clusiaceae*), *Protium* sp. (“almécega, alméscar, breu vermelho”, *Burseraceae*), *Schinus terebinthifolius* (“aroeira vermelha”, *Anacardiaceae*), *Tapirira* sp. (“pau pombo, cupiúba”, *Anacardiaceae*) e *Vismia* (“lacre”, *Clusiaceae*) (LUZ *et al.*, 2009).

Estudos palinológicos conduzidos por Luz *et al.* (2009) demonstraram que várias plantas, como: mimosa (*M. acabrella*, *M. verrucosa* e *M. caesalpiniaefolia*, *Mimosaceae*), *Arecaceae* (tipo *Cocos nucifera*), *Cecropia* (*Cecropiaceae*), *Borreria* (*B. densiflora*, *B. latifolia* e *B. verticillata*, *Rubiaceae*), *Symphonia globulifera* (*Clusiaceae*), *Myrcia* (*Myrtaceae*), *Solanaceae*, *Tapirira*, *Pachira aquática* (*Bombacaceae*), *Cedrela* (*Meliaceae*), *Protium*, *Anacardium*, *Schinus*, *Rhizophora*, *Laguncularia*, , *Avicennia*, *Eucalyptus*, são fornecedoras de exsudatos resinosos para as abelhas, usado na produção de própolis vermelha na região Nordeste, onde se destacou principalmente o vegetal *Schinus terebinthifolius* (“aroeira-vermelha”), presente em todas as amostras procedentes dos três estados (Alagoas, Bahia e Paraíba).

2.4 - Composição química da própolis

A própolis apresenta uma composição química muito complexa e bastante variada, tanto qualitativamente quanto quantitativamente, estando relacionada com a ecologia da flora de cada região e com o período de coleta da resina pelas abelhas. Além disso, existem outros fatores que podem interferir na composição química da própolis, como a genética das abelhas e até mesmo as metodologias e técnicas de extração empregadas (LUSTOSA *et al.*, 2008).

A composição química da própolis inclui flavonóides (como a quercetina, crisina, galangina, pinocembrina, kaempferol), ácidos fenólicos (derivados prenilados do ácido *p*-cumárico, ácido cinâmico, artepelin C), ácidos aromáticos e ésteres, aldeídos (como a vanilina e isovanilina) e cetonas (acetofenonas), terpenóides e fenilpropanóides (como os ácidos caféico e clorogênico), esteróides, vitaminas (A, B1, B2, B3, B6, C e E), aminoácidos, polissacarídeos, hidrocarbonetos, ácidos graxos e uma gama de outros compostos. É constituída também por elementos inorgânicos como o cálcio, níquel, alumínio, cobre, manganês, ferro, cromo, vanádio, silício, zinco e

estrôncio além de vários outros compostos em pequenas quantidades. (PEREIRA *et al.*, 2002; SALATINO *et al.*, 2005; FUNARI & FERRO, 2006; SOUSA *et al.*, 2007; LUSTOSA *et al.*, 2008).

De todos esses grupos de compostos, certamente o que vem chamando mais atenção dos pesquisadores é o dos flavonóides. A eles, bem como aos ácidos fenólicos, são atribuídas as propriedades antibacteriana, antiviral e antioxidante (HU *et al.*, 2005; HAYACIBARA *et al.*, 2005; LIMA, 2006; VOLPI & BERGONZINI, 2006).

A análise da composição química da própolis comparada com possível fonte vegetal é o melhor indicador da origem botânica. Determinar a origem geográfica e, especialmente, a origem botânica unida à fenologia da planta, faz-se necessário no controle de qualidade e até mesmo na padronização das amostras de própolis para utilização humana (ALENCAR *et al.*, 2005).

A própolis brasileira têm se tornado objeto de grande interesse por parte dos cientistas, pois tem mostrado diferenças significantes na composição química em relação à própolis de outras regiões (TRUSHEVA *et al.*, 2006). Devido a grande diversidade de própolis no Brasil, são classificadas em 12 tipos a partir de várias características: localização geográfica, perfil físico- químico e planta de origem. Sendo cinco grupos na região Sul, um no Sudeste e seis na região Nordeste do Brasil (PARK *et al.*, 2002). Nas regiões cujo clima é temperado como na América do Norte, Europa, norte da África e oeste da Ásia, a fonte predominante de própolis é o exsudato do botão de álamo (*Populus* sp). Entretanto, em regiões de clima tropical como na América do Sul a espécie vegetal do gênero *Populus* não é nativa, existindo uma grande diversidade vegetal para retirada da resina. Pinheiros, carvalhos, salgueiros, acácias são exemplos de outras espécies vegetais que as abelhas utilizam como fontes de própolis (ALENCAR *et al.*, 2005; LUSTOSA *et al.*, 2008).

Entre os tipos encontrados no Brasil, a própolis vermelha, recentemente encontrada ao longo do mar e costas de rios no nordeste brasileiro, a qual foi classificada como própolis do grupo 13, destaca-se por apresentar atividade biológica superior. Possui uma composição química bastante complexa e variada, estando intimamente relacionada com a ecologia da flora de cada região visitada pelas abelhas, o que a torna um produto único devido à variedade de espécies de plantas encontradas na região (DAUGSCH *et al.*, 2007; CABRAL *et al.*, 2009).

Trusheva *et al.* (2006) identificaram os compostos: anetol, eugenol, isoeugenol, metileugenol, álcool triterpênico (α -amyrin, β -amyrin, cicloartenol e lupeol), isoflavonóides (isosativan e medicarpin) e elemicina na própolis vermelha brasileira. Silva *et al.* (2007) encontraram ácido felúrico, quercetina, crisina e medicarpin em amostras de própolis de Alagoas. Foi quantificado por Dausgch *et al.* (2007) através da cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa, vários compostos extraídos da resina de *D. ecastophyllum* (*Leguminosae*) e da própolis vermelha, dentre eles, estão a daidzeína, dalbergina, liquiritigenina, rutina, isoliquiritigenina, biochamina A, formononetina, luteolina, pinocembrina e pinobanksina.

Pereira *et al.* (2002) identificaram duas séries de triterpenol ésteres de ácidos graxos (TTEAG) no extrato hexânico através da espectrometria de massas; a primeira, trata-se de uma série homóloga de ésteres de "a" e "b" amirina com uma cadeia de ácido graxo com 6 a 22 átomos de carbono, enquanto que , a segunda é uma outra série homóloga composta de ésteres de taraxasterol com uma cadeia de ácido graxo com 10 a 19 átomos de carbono, sendo a primeira vez, demonstrado e caracterizado ésteres graxos de triterpenóides pentacíclicos em amostras de própolis vermelha.

2.4.1 - Flavonóides

Os flavonóides absorvem radiação eletromagnética na faixa do ultravioleta (UV) e do visível e dessa maneira apresentam um papel de defesa das plantas frente à radiação UV da luz solar. Além disso, eles podem representar uma barreira química de defesa contra microrganismos (bactérias, fungos e vírus), insetos e outros animais herbívoros. Mas os flavonóides atuam também em relacionamentos harmônicos entre plantas e insetos, atraindo e orientando esses animais até o néctar, contribuindo enormemente para a polinização (TOMÁS-BARBERÁN *et al.*, 1994). Esses compostos também desempenham um importante papel na saúde humana como alimentos funcionais. Dado que não podem ser sintetizados pelo nosso organismo, sendo representativos da parte não energética da dieta humana, são obtidos através da ingestão de alimentos ou através de suplementos nutritivos, sendo frutas, verduras, cerveja, vinho, chá verde e soja as fontes de flavonoides (MARTÍNEZ-FLORES *et al.*, 2002).

Os flavonóides têm ação antioxidante, minimizando a peroxidação lipídica e o efeito dos radicais livres visto que estes podem ocasionar doenças de grande importância na atualidade, como a arteriosclerose, as enfermidades coronárias e determinados tipos de câncer. Foi demonstrado que indivíduos que ingerem maiores quantidades de flavonóides, os quais são encontrados em alimentos de origem vegetal (verduras, frutas, chá, mel etc.) apresentam uma diminuição considerável do risco de morte por acidentes cardiovasculares (infarto do miocárdio, trombose, derrame etc...) (KINSELLA *et al.*, 1993). Residiria nisso uma das virtudes da dieta vegetariana, ou pelo menos, numa dieta com uma marcante proporção de produtos vegetais. Os flavonóides acham-se presentes também em quantidades relativamente altas no vinho tinto. Atribui-se a isso o chamado "paradoxo francês", pelo qual os franceses, apesar de ingerirem uma dieta "menos saudável", pois consomem mais gordura animal, sofrem de uma incidência muito menor daqueles males do que os norteamericanos. Acredita-se que o consumo substancialmente maior de vinho pelos franceses seja a razão por esse resultado paradoxal (PINTO 2011).

Os flavonóides englobam classes de pigmentos naturais encontrados com frequência nos vegetais. Muitos estudos têm sido conduzidos com os flavonóides, e as flavonas, tais como a quercetina e luteolina, têm mostrado efeitos como antioxidantes na prevenção de câncer e também como inibidores na formação de placas ateroscleróticas. Cai *et al.* (1999) demonstraram os efeitos da quercetina e luteolina na remoção dos radicais superóxidos, na inibição da formação de radicais livres, principalmente O_2 e na inibição da oxidação lipídica induzida por $FeCl_2$ no fígado de ratos.

Mascolo *et al.* (1998) relataram testes com os flavonóides quercetina, kaempferol e taninos, nos quais eles apresentaram atividade antiinflamatória, atuaram como inibidores de enzimas lisossômicas e foram responsáveis por aumentar a filtração transciliar de água e proteínas, reduzindo o número e o diâmetro de poros capilares e promovendo o retorno do fluxo sanguíneo para o coração.

Estima-se que os humanos ingerem menos de 100mg/dia destes compostos na dieta. Os flavonóides presentes em alimentos são absorvidos mesmo com a presença de um grupo glicosil. Já se sabe que a quercetina glicosilada, a mais difundida nos alimentos, pode ser absorvida em maior escala que a quercetina aglicona. A hidrólise

dos flavonóides no intestino delgado é efetuada por microrganismos, não sendo enzimática (KATAN & HOLLMAN, 1999).

Estruturalmente, os flavonóides constituem substâncias aromáticas com 15 átomos de carbono (C15) no seu esqueleto básico, sendo compostos fenólicos, que possuem nessa estrutura anéis aromáticos C6-C3-C6. O esqueleto C15 dos flavonóides é biogeneticamente derivado do fenilpropano (C6-C3) e três unidades de acetato (C6). Portanto, flavonóides são derivados de benzo-gama-pirona de origem vegetal (YOKOZAWA *et al.*, 1997).

Estes compostos podem ser definidos como uma classe de metabólitos secundários de plantas, que derivam da condensação de uma molécula de ácido cinâmico com 3 grupos de malonil-CoA (YLMAZ & TOLEDO, 2004). Os principais tipos de flavonóides que incluem na dieta humana são Flavanois, Flavonois, Flavonas, Flavononas, Antocianidinas e Isoflavonoides, mas também temos as classes das auronas, auronol, chalconas, dihidrochalconas, neoflavonoides, flavanas e Dihidroflavonois,

A Fig. 1 apresenta algumas classes de flavonóides que podem estar presentes em produtos apícolas. A Fig. 2 mostra estruturas de flavonóides comumente encontrados em própolis: o campferol, a quercetina, a isorramnetina e a galangina são flavonóis; a apigenina, a luteolina, a crisina e a tectocrisina são exemplos de flavonas; a pinocembrina é uma flavanona e a pinobancsina é um diidroflavonol. A Fig. 3 mostra exemplos de compostos fenólicos, vários deles comuns nos produtos apícolas, como os ácido gálico, p-cumárico, cafeico, ferúlico e siríngico.

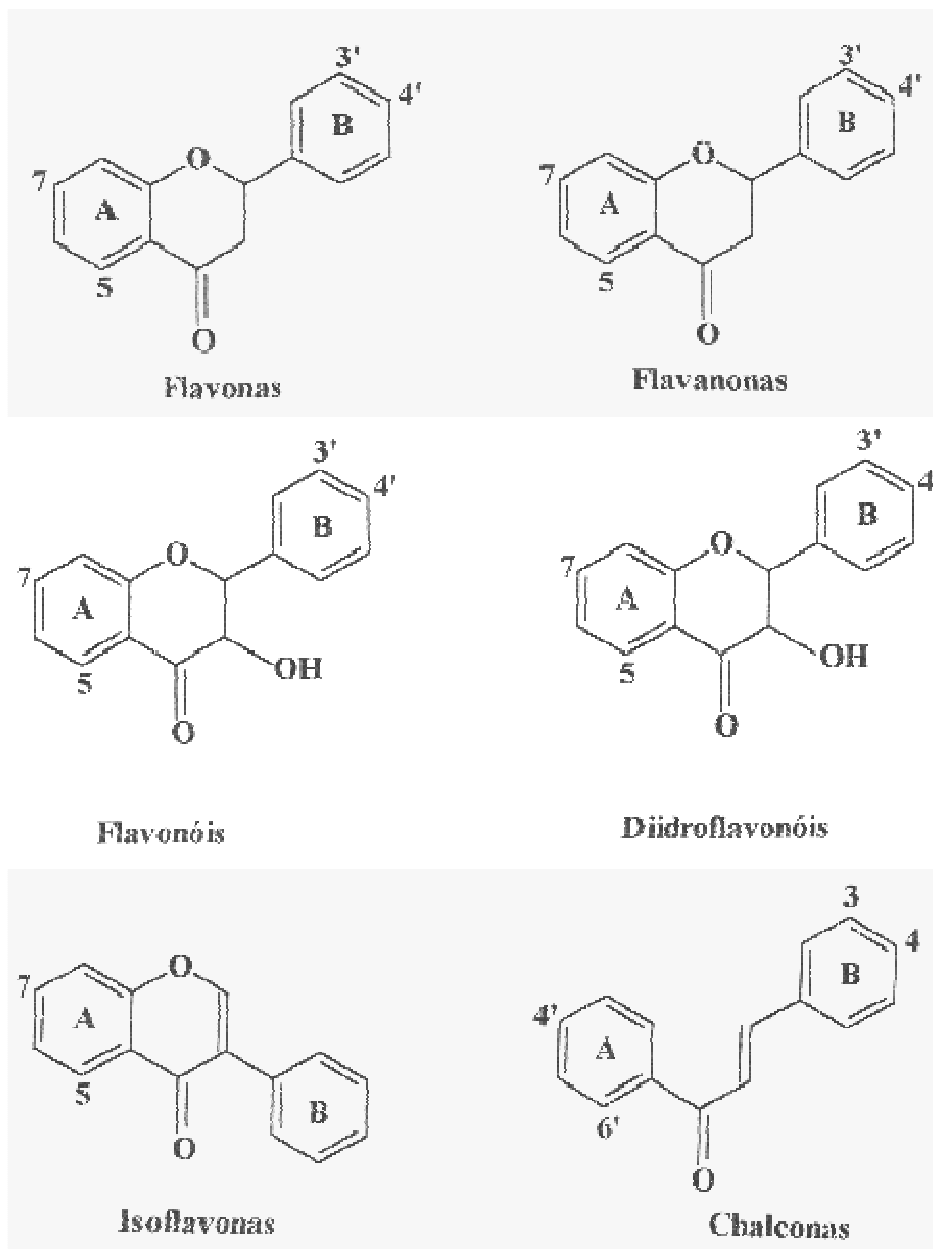


Figura 1. Algumas classes de flavonóides encontrados em pólen, mel e própolis (MARCUCCI *et al*, 2010).

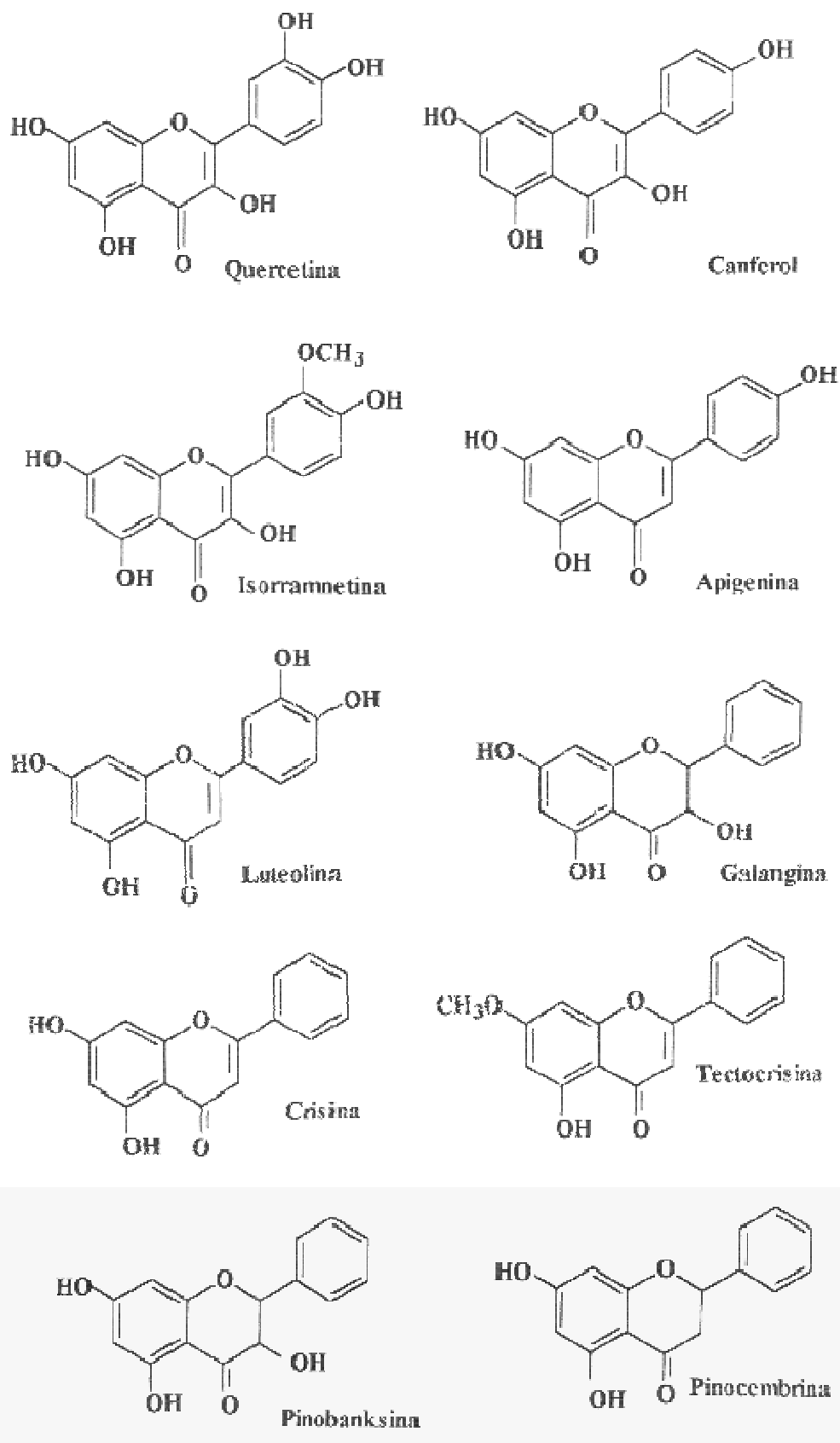


Figura 2. Flavonóides encontrados no mel e alguns deles também na própolis (MARCUCCI *et al*, 2010).

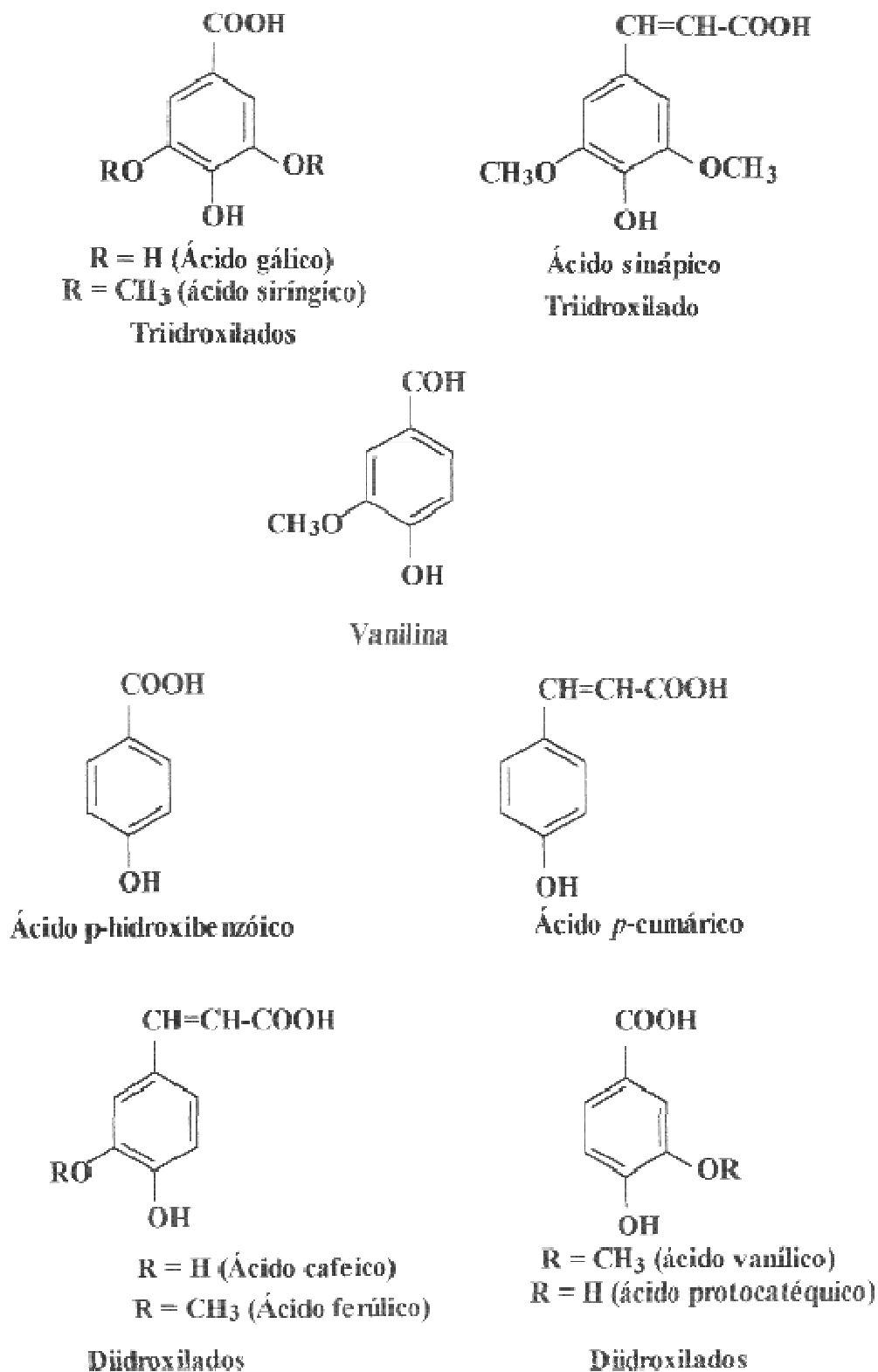


Figura 3. Exemplos de compostos fenólicos não incluídos no grupo dos flavonóides (MARCUCCI *et al*, 2010).

2.4.2 - Isoflavonóides

Os isoflavonóides são hormônios não-esteróides chamados de fitormônios, por apresentar uma estrutura e funcionalidade similar ao estradiol e produzir efeito estrogênico. Biogeneticamente, os isoflavonóides são formados, como os demais flavonóides, via chalconas. Em vegetais, uma grande parte isoflavonóides comporta-se como fitoalexinas-substâncias produzidas pela planta em resposta a uma infecção por um agente patogênico. (HUNTHEY & ERNST, 2004). A isoflavona é encontrada facilmente nos vegetais e leguminosas, principalmente na soja, e apresenta duas principais substâncias: genisteína e daidzeína. Estas, quando ingeridas, sofrem ação enzimática na parede intestinal por intermédio de bactérias que as transformam de inativas (gliconas) em ativas (agliconas), possibilitando a sua absorção intestinal (SETCHELL, 1998).

2.5 - Ensaio químicos e físico-químicos com a própolis

A própolis apresenta ponto de fusão variável, entre 60 a 70 °C, podendo atingir em alguns casos até 100 °C. É uma substância dura, quebradiça quando fria (abaixo de 15 °C) e que se torna dúctil e flexível quando aquecida (acima de 30 °C). A coloração depende da vegetação existente no local de extração pelas abelhas operárias, do tipo e do tempo de coleta. Assim, a tonalidade pode variar entre marrom claro e escuro, marrom avermelhado, esverdeado e amarelado. O odor é característico, podendo variar de uma amostra para outra (MARCUCCI, 1996; SALATINO *et al.*, 2005; SIMÕES *et al.*, 2008).

2.6 - Atividade biológica da própolis

As propriedades biológicas da própolis estão ligadas diretamente a sua composição química. Em regiões cujo clima é temperado, como por exemplo na Europa, é observado uma menor variação da composição química, onde seus principais compostos bioativos são os flavonóides (flavonóis, flavonas e flavononas), sendo a crisina (5,7-diidroxiflavona) o primeiro flavonóides isolado da fonte vegetal *Populus nigra* Var. *pyramidalis* (PEREIRA *et al.*, 2002).

As atividades antibacteriana e antifúngica têm sido as mais extensivamente estudadas e são atribuídas principalmente à flavonona pinocembrina, ao flavonol galagina e ao éster feniletil do ácido caféico, com um mecanismo de ação baseado provavelmente na inibição do RNA-polimerase bacteriano (UZEL *et al.*, 2005). Fernandes Júnior *et al.* (2006) investigaram a ação antimicrobiana dos extratos alcoólicos de própolis obtidos de três regiões do Brasil (Botucatu-SP, Mossoró-RN e Urubici-SC), frente aos seguintes microrganismos: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Enterococcus* sp, *Pseudomonas aeruginosa*, e *Candida albicans*, e concluíram que independente do local de coleta, as bactérias Gram-positivas apresentaram-se mais sensíveis ao EAP (extrato alcoólico de própolis). Este fato tem sido relatado com frequência na literatura (FERNANDES JÚNIOR *et al.*, 2006). Outros componentes como os flavonóides, o ácido caféico, ácido benzóico, ácido cinâmico, provavelmente agem na membrana ou parede celular do microrganismo, causando danos funcionais e estruturais (SCAZZOCCHIO *et al.*, 2005). Própolis também tem demonstrado excelentes atividades fungistática e fungicida frente a leveduras (LONGHINI *et al.*, 2007).

Segundo Dausgch *et al.* (2007) as amostras de própolis vermelha brasileira da região Nordeste, apresentaram atividade antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), em concentrações próximas a 2,5 µg/ml. Alencar *et al.* (2007) demonstraram que o extrato etanólico e a fração clorofórmica da própolis brasileira, apresentaram uma potente atividade antimicrobiana frente aos microrganismos: *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e *Streptococcus mutans* (UA 159). O *S. aureus* é uma das bactérias patogênicas mais importantes, uma vez que atua como agente de várias infecções, variando desde aquelas localizadas, geralmente superficiais, até algumas disseminadas, com elevada gravidade. Causam abscessos em vários órgãos, endocardites, gastroenterites (intoxicação alimentar) e síndrome do choque tóxico, pneumonia hospitalar, infecções de feridas cirúrgicas e sepse (LUZ, 2009).

Foi descoberto que as substâncias, isoliquiritigenina inibe o crescimento do câncer prostático, a liquiritigenina e isoliquiritigenina inibem a enzima xantina oxidase. A inibição da xantina oxidase foi sugerida para uso no tratamento de hepatites e tumores cerebrais, porque aumentam o nível de xantina oxidase sérica (DASGCH *et al.*, 2007).

A atividade antioxidante merece especial interesse, pois a própolis poderia ser aplicada topicamente com sucesso para prevenir e tratar a pele danificada

(MARQUELE *et al.*, 2006). O alto teor de flavonóides está diretamente ligado ao poder antioxidante, onde verificou-se que a fração clorofórmica apresentou maior atividade (CABRAL *et al.*, 2009). Além dessas atividades ainda possui ação hipotensiva, anti-HIV, antiviral, antitumoral, adstringente, hepatoprotetora, anestésica, imunomodulatória, etc (SIMOES *et al.*, 2008; TEIXEIRA *et al.*, 2008).

A atividade antiinflamatória está relacionada à presença de flavonóides, em especial a galangina. Esta substância apresenta atividade inibitória contra a ciclooxigenase (COX) e lipooxigenase. Também é capaz de inibir a síntese das prostaglandinas, ativar a glândula timo, auxiliando o sistema imune pela promoção da atividade fagocítica e estimulando a imunidade celular (KOSALEC *et al.*, 2005; LUSTOSA *et al.*, 2008). Em estudo comparado da propriedade cicatrizante de um creme de própolis com um de sulfadiazina de prata, foi demonstrado que os ferimentos tratados com própolis apresentaram menos inflamação e mais rápida cicatrização do que aqueles tratados com sulfadiazina de prata (GREGORY *et al.*, 2002).

Os compostos fenólicos, especialmente os flavonóides, agem como antioxidantes não somente pela sua habilidade em doar hidrogênio ou elétrons, mas também por causa de seus radicais intermediários estáveis, que impedem a oxidação de vários ingredientes do alimento, particularmente de ácidos graxos e de óleos (CUVELIER *et al.*, 1992 ; MAILLARD *et al.* 1996).

Os compostos fenólicos estão amplamente distribuídos no reino vegetal. São definidos como substâncias que possuem um anel aromático com um ou mais substituintes hidroxílicos, incluindo seus grupos funcionais (HERNÁNDEZ & PRIETO GONZÁLES, 1999). A determinação de compostos fenólicos é de grande importância devido à relação destes compostos com as qualidades sensoriais dos alimentos, como cor, sabor e aroma (KIM *et al.* 2005). Entre as frutas, a uva é uma das maiores fontes de compostos fenólicos. Os principais são os flavonóides (antocianinas, flavanóis e flavonóis), os estilbenos (resveratrol), os ácidos fenólicos (derivados dos ácidos cinâmicos e benzóicos) e uma larga variedade de taninos (FRANCIS, 2000). Os glicosídeos de flavonóis e as antocianinas estão entre os compostos fenólicos mais determinados e estudados nas uvas, por sua destacada atividade antioxidante e por suas propriedades anti-inflamatórias e anticancerígenas (NEGRO *et al.* 2003; AMICO *et al.* 2004).

2.7 - Emprego da própolis como alimento funcional

A portaria n°. 398 de 30/04/99, da Secretaria de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde do Brasil define alimentos funcionais como: “Alimentos Funcionais são todos os alimentos ou ingredientes que, além das funções nutricionais básicas, quando consumidos como parte da dieta usual, produzam efeitos metabólicos e/ou fisiológicos e/ou efeitos benéficos à saúde, devendo ser seguros para consumo, sem supervisão médica”.

A própolis também é empregada na forma de alimentos funcionais, que se caracterizam por oferecer vários benefícios à saúde, além do valor nutritivo inerente à sua composição química, podendo desempenhar um papel potencialmente benéfico na redução do risco de doenças; e nutracêutico, que proporciona benefícios médicos e de saúde, incluindo a prevenção e/ou tratamento da doença através de nutrientes isolados ou outras preparações (MORAES & COLLA, 2006). Na metade dos anos 80 a própolis tornou-se um importante produto na medicina alternativa e complementar com o trabalho pioneiro de Ernesto Ulrich Breyer, demonstrando em seu livro, “Abelhas e saúde”, as propriedades terapêuticas da própolis e sua utilização como antibiótico natural, como exemplo a própolis e o mel são usados para o tratamento de infecções das vias aéreas em muitos países (LIMA, 2006; TAVARES *et al.*, 2006). A própolis adicionada à ração de bovinos mostrou reduzir os níveis de cortisol sérico, refletindo na redução do estresse animal (FARIA *et al.*, 2011).

Hoje em dia a própolis vermelha é utilizada em diversas preparações farmacêuticas e o Japão é o principal importador com preferência pela própolis brasileira (SALATINO *et al.*, 2005). No Brasil, o Ministério da Saúde, através da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), regulamentou os Alimentos Funcionais através das seguintes resoluções: ANVISA/MS 16/99; ANVISA/MS 17/99; ANVISA/MS 19/99, cuja essência é:

a) Resolução da ANVISA/MS 16/99 - trata de Procedimentos para Registro de Alimentos e ou Novos Ingredientes, cuja característica é de não necessitar de um Padrão de Identidade e Qualidade (PIQ) para registrar um alimento, além de permitir o registro de novos produtos sem histórico de consumo no país e também novas formas de comercialização para produtos já consumidos (BRASIL, 1999a);

b) Resolução da ANVISA/MS 17/99 - Aprova o Regulamento Técnico que estabelece as Diretrizes Básicas para Avaliação de Risco e Segurança de Alimentos que prova, baseado em estudos e evidências científicas, se o produto é seguro sob o ponto de risco à saúde ou não (BRASIL, 1999b);

c) Resolução ANVISA/MS 18/99 - Aprova o Regulamento Técnico que estabelece as Diretrizes Básicas para a Análise e Comprovação de Propriedades Funcionais e/ou de Saúde, alegadas em rotulagem de alimentos (BRASIL, 1999c);

d) Resolução ANVISA/MS 19/99 - Aprova o Regulamento Técnico de Procedimentos para Registro de Alimentos com Alegação de Propriedades Funcionais e ou de Saúde em sua Rotulagem (BRASIL, 1999d).

As diretrizes para a utilização da alegação de propriedades funcionais e ou de saúde, segundo a ANVISA são:

a) A alegação de propriedades funcionais e ou de saúde é permitida em caráter opcional;

b) O alimento ou ingrediente que alegar propriedades funcionais ou de saúde pode, além de funções nutricionais básicas, quando se tratar de nutriente, produzir efeitos metabólicos e ou fisiológicos e ou efeitos benéficos à saúde, devendo ser seguro para consumo sem supervisão médica;

c) São permitidas alegações de função ou conteúdo para nutrientes e não nutrientes, podendo ser aceitas aquelas que descrevem o papel fisiológico do nutriente ou não nutriente no crescimento, desenvolvimento e funções normais do organismo, mediante demonstração da eficácia. Para os nutrientes com funções plenamente reconhecidas pela comunidade científica não será necessária a demonstração de eficácia ou análise da mesma para alegação funcional na rotulagem (item 3.3 da Resolução ANVISA nº 18);

d) No caso de uma nova propriedade funcional, há necessidade de comprovação científica da alegação de propriedades funcionais e ou de saúde e da segurança de uso, segundo as Diretrizes Básicas para avaliação de Risco e Segurança dos alimentos;

e) as alegações podem fazer referências à manutenção geral da saúde, ao papel fisiológico dos nutrientes e não nutrientes e à redução de risco de doenças. Não são permitidas alegações de saúde que façam referência à cura ou prevenção de doenças (BRASIL, 1999c; BRASIL, 1999d).

O registro de um alimento funcional só pode ser realizado após comprovada a alegação de propriedades funcionais ou de saúde com base no consumo previsto ou recomendado pelo fabricante, na finalidade, condições de uso e valor nutricional, quando for o caso ou na evidência(s) científica(s): composição química ou caracterização molecular, quando for o caso, e ou formulação do produto; ensaios bioquímicos; ensaios nutricionais e ou fisiológicos e ou toxicológicos em animais de experimentação; estudos epidemiológicos; ensaios clínicos; evidências abrangentes da literatura científica, organismos internacionais de saúde e legislação internacionalmente reconhecidas sob propriedades e características do produto e comprovação de uso tradicional, observado na população, sem associação de danos à saúde (Brasil, 1999c; Brasil 1999d).

2.8 - Secagem de produtos alimentícios por Spray-Dryer

A secagem é uma das técnicas tradicionais de conservação de alimentos mais utilizadas. Consiste na redução da disponibilidade de água para o desenvolvimento de microrganismos e para reações bioquímicas deteriorativas. Apresenta a vantagem de ser simples e permitir a obtenção de produtos com maior vida de prateleira. Além disso o processo envolve custos e volumes menores de acondicionamento, armazenagem e transporte. Em alguns casos, a desidratação apresenta a vantagem adicional de colocar ao alcance do consumidor uma maior variedade de produtos alimentícios (PARK *et al.*, 2002b).

Secagem por nebulização é a transformação de líquidos de baixa ou alta viscosidade, mesmo aqueles que são quase pastosos, em produto seco e pulverizado em uma única operação. O líquido ou pasta são atomizados usando-se um sistema centrífugo ou de alta pressão, onde as gotículas atomizadas imediatamente entram em contato com um fluxo de ar quente. A rápida evaporação permite manter baixa a temperatura do produto. A transferência de calor e de massa são realizadas pelo contato direto entre o gás quente e as gotículas dispersas. As partículas finas são

separadas do gás em ciclones externos ou em mangas coletoras. Quando apenas se deseja a fração grossa do produto acabado, os finos podem ser recuperados em lavadores; o líquido do lavador é concentrado e retorna ao secador (LINOYA *et al.*, 1991; VAN'T LAND, 1991).

A tecnologia *spray-drying* é muito utilizada em diversos segmentos industriais, incluindo o farmacêutico e o alimentício. Ela oferece inúmeras vantagens que incluem a produção de partículas de qualidade consistente, a facilidade em relação ao uso contínuo, a aplicabilidade da técnica em materiais termossensíveis e termorresistentes, a capacidade de processar diversos tipos de matérias-primas e a flexibilidade para a definição de um projeto com base na formulação. Para fazer uso dessas vantagens, existem diversos aspectos que devem ser considerados. Dentre eles estão a avaliação da formulação e dos parâmetros de processo, o tipo específico de partícula a ser produzida e as propriedades do material utilizado (WENDEL & CELIK, 1998).

O uso principal dos secadores a pulverização é na secagem comum de soluções e de suspensões aquosas. São também usados nas operações combinadas de secagem e de tratamento térmico. A alimentação é usualmente uma solução líquida, uma suspensão ou uma pasta que pode ser pulverizada. O produto a ser seco passa por bicos de tamanhos que podem variar, influenciando no tamanho das partículas obtidas e a parte líquida é transformada num *spray* atomizado. O pó é carregado numa corrente de ar, que o transporta em contato com o *spray* (PERRY & CHILTON, 1980). O formato da maior parte das partículas atomizadas é esférico, que garante fluxo como o de fluidos. Isto auxilia no processo de manuseio e envase, por exemplo, e também na diminuição de custos. As partículas possuem, ainda, homogeneidade na composição e a distribuição no tamanho das partículas é muito próxima, minimizando a obtenção de partículas muito finas, o que é muito importante para o produto obtido.

Para a secagem de extratos, a seleção e o uso adequado de adjuvantes no processo de *spray drying* é uma fase de fundamental importância, visto que determina a estabilidade e a qualidade dos mesmos, podendo inclusive afetar as características de biodisponibilidade. A influência do teor de sólidos no material de partida é refletida no tamanho de partícula e na densidade do produto final. De acordo com Cao *et al.* (2000), o aumento no conteúdo de sólidos, eleva a viscosidade, resultando em pós com maior densidade. Além disso, quanto menor o conteúdo de sólidos em uma suspensão,

maior o espaço oco interno da partícula (*ballooning*), porém as paredes tornam-se menos espessas.

Outro fator importante a ser considerado, é a viscosidade da formulação, pois esta interfere na formação de gotas esféricas. Deste modo, menos energia ou menor pressão são aplicadas quando a viscosidade for baixa. Por outro lado, a viscosidade elevada da formulação impede a formação adequada das gotas durante a aspersão, propiciando aumento no tamanho de partícula, devido à formação de gotículas maiores durante a etapa de aspersão (Figura 4) (SOARES, 2002).

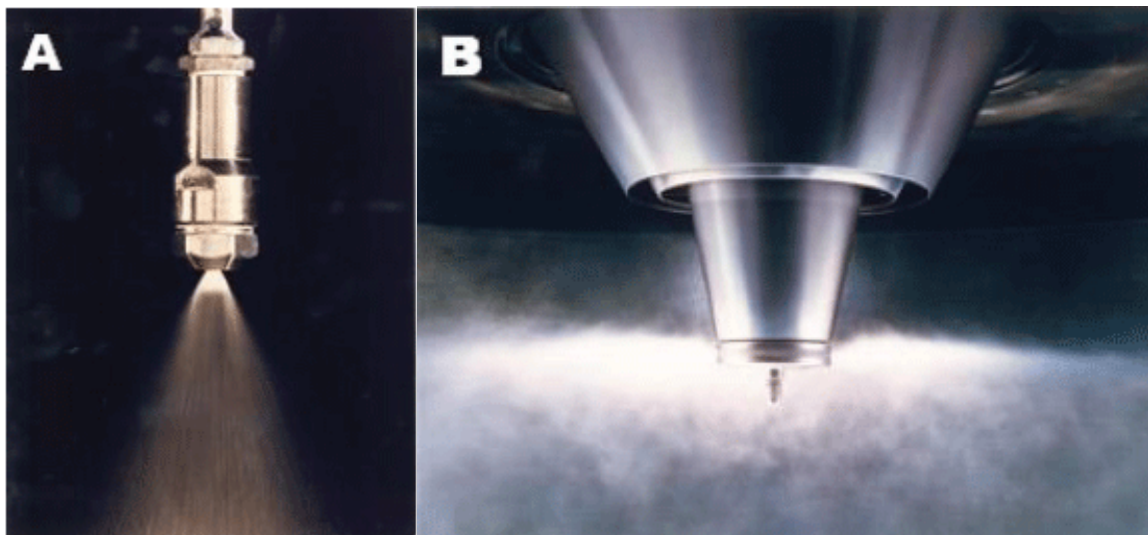


Figura 4. Tipos de aspersores. **A-** Aspersor pneumático. **B-** Aspersor por disco giratório (AULTON, 2002).

Deve-se considerar que o processo de *spray drying* exerce influência não somente sobre as características tecnológicas, físicas e químicas dos produtos obtidos, podendo também interferir na sua atividade biológica. A influência dos parâmetros temperatura de entrada e concentração de dióxido de silício coloidal (Aerosil 200) sobre as características de produtos secos por aspersão foi investigada por Vasconcelos *et al* (2005). Tais produtos foram produzidos a partir de extratos etanólicos de *Schinus terebinthifolius* Raddi, utilizada popularmente devido às atividades antimicrobiana, cicatrizante e antiinflamatória. Os resultados do estudo revelaram que o rendimento do processo aumentou nas concentrações mais altas de Aerosil. Na concentração de 30% obtiveram os menores valores para a umidade residual, independentemente da

temperatura de entrada. A higroscopicidade e a umidade residual dos produtos foram inversamente proporcionais ao aumento da temperatura de entrada e à concentração do adjuvante. Com base nas respostas avaliadas, as condições operacionais mais adequadas foram 30% de adjuvante, a uma temperatura de 140 °C, obtendo rendimento acima de 80%.

Produtos secos por aspersão a partir de solução extrativa aquosa de *Ilex paraguariensis* St. Hill. foram produzidos e avaliados em estudo realizado por Da Silva (2007). O emprego de Aerosil® 200 na concentração de 30 % propiciou melhores características tecnológicas e maior estabilidade frente à luz quando comparado a extratos secos com o mesmo adjuvante na concentração de 15%. Extratos fluídos de *Symphytum officinale* L. foram submetidos à secagem por aspersão utilizando como adjuvante de secagem hietolose (hidróxi-etilcelulose) na concentração de 1,5%. Análises dos perfis térmicos e cromatográficos de extratos liofilizados e secos por aspersão comprovaram que a secagem não acarretou nenhuma degradação ao produto (SILVA JÚNIOR *et al.*, 2006).

Na indústria alimentícia a técnica também é utilizada para secagem de polpas de frutas (açai, abacaxi, melancia) devido à boa qualidade conferida ao pó resultante e às facilidades de transporte e armazenamento, além da maior estabilidade físico-química. Para tal finalidade, geralmente é utilizada a maltodextrina como adjuvante de secagem (ABADIO *et al.*, 2004; QUEK *et al.*, 2007; TONON *et al.*, 2008).

2.9 - Microencapsulação

O processo de *spray drying* não se limita somente à secagem de extratos fluídos, se estende também à microencapsulação de nanopartículas produzidas a partir de extratos de plantas. A microencapsulação é uma técnica relativamente recente, que tem a função de proteger o material encapsulado de fatores que possam vir a causar a sua deterioração, tais como oxigênio, luz ou umidade. Ela favorece o aumento da vida útil, da manutenção do *flavor* (sabor + aroma) e da cor, além de reduzir a volatilidade, a higroscopicidade e a reatividade, aumentando a estabilidade do produto em condições adversas. A técnica de microencapsulação mais utilizada na indústria de alimentos é a de secagem por atomização (*spray drying*), por ser considerada um processo

econômico e flexível, realizado em um equipamento de fácil acesso e que resulta em partículas de boa qualidade (GHARSALLAOUI, 2007).

Microcápsulas contendo nanopartículas de *Salvia miltiorrhiza* Bunge, com diâmetro médio de 133,5 nm, foram produzidas por *spray dryer* utilizando diferentes proporções de gelatina e carmelose sódica. A otimização dos parâmetros de secagem foi verificada e a condição mais adequada foi temperatura de entrada de 80 °C, fluxo de 4 mL/min e fluxo de gás de 357 L/h (SU *et al.*, 2008). Alguns autores têm usado a microencapsulação para proteger compostos sensíveis como vitamina C, em frutas como camu-camu (DIB TAXI *et al.*, 2003) e para aumentar a estabilidade do produto, como no caso do suco de acerola em pó (RIGHETTO & NETTO, 2005).

A teoria de retenção do material ativo explica que este volatiliza pouco durante a secagem, se o material de parede forma rapidamente um filme semipermeável em torno das gotículas das emulsões atomizadas, de modo a permitir a difusividade da água enquanto retém o material ativo (FERNÁNDEZ *et al.*, 2002). Se este filme semipermeável forma microcápsulas isentas de qualquer deformação superficial, maior será a efetividade do material de parede na retenção do material ativo, então, a avaliação dos componentes do material de parede depende da concentração da mistura e dos parâmetros do processo que influenciam na formação da estrutura superficial das microcápsulas, pois, um material de parede é adequado quando o produto final é constituído de microcápsulas íntegras, isto é, o material ativo ficará completamente envolvido e protegido do ambiente pelo material de parede. Como citam Rosenberg & Young (1993) a funcionalidade das microcápsulas é criticamente dependente da sua estrutura superficial.

2.10 Vantagens e desvantagens da secagem por Spray-Dryer

O processo de secagem apresenta diversas vantagens, tais como (SHAW, 1997; AULTON, 2002):

- controle da uniformidade e do tamanho das partículas do produto pela manipulação das variáveis do processo;
- processo contínuo, podendo ser alteradas condições de operação sem a necessidade de interrupção;

- rapidez e rendimento. A evaporação ocorre em frações de segundos, em virtude da formação de inúmeras gotículas que proporcionam uma grande área superficial para trocas térmicas e transferência de massa;
- baixa agressividade ao produto, o que a faz apropriada para produtos termossensíveis devido ao curto tempo de contato com a fonte de calor, podendo assim, ser empregada com sucesso na produção de produtos intermediários para fitomedicamentos;
- as partículas resultantes apresentam forma esférica uniforme e uma rápida dissolução, devido à grande área específica;
- os custos do processo são baixos.

Alguns sistemas podem operar em modo de circuito-fechado com um gás inerte para reduzir a oxidação do produto (AULTON, 2002).

Como desvantagem, podemos citar que o equipamento apresenta grandes dimensões, necessitando de instalações físicas adequadas; além disso, o custo inicial é alto, pois necessita de investimento em instalações. Porém, o valor do produto final pode justificar o ônus inicial.

2.11 - Ensaio de Dissolução

A dissolução pode ser definida, num sentido restrito, como o processo pelo qual uma substância sólida entra no solvente para formar uma solução. No entanto, no sentido amplo da palavra, é mais do que a simples medida da taxa de solubilidade, podendo ser mais corretamente descrita como um ensaio físico para prever a liberação para uma determinada área numa determinada quantidade e no tempo correto. Esta definição é mais consentânea com a aplicação dos ensaios de dissolução aos estudos biofarmacêuticos e farmacocinéticos. Fundamentalmente, este processo é controlado pela afinidade entre a substância sólida e o solvente e pelo modo como o sistema farmacêutico o libera. No entanto, podem ser incorporadas substâncias no seio da forma farmacêutica, que permitem alterar a solubilidade do fármaco no meio (PREECHAGOON *et al.*, 2000).

O estudo do processo de dissolução *in vitro*, empregando-se o *teste de dissolução* e *perfil de dissolução* tem sido utilizado como parâmetro crítico para determinar o desempenho e definir a qualidade da forma farmacêutica, servindo também como indicador preditivo da velocidade de absorção. A possibilidade de correlacionar os dados *in vivo* e *in vitro* é de valor inestimável para definir a qualidade biofarmacêutica de um medicamento, sendo útil no desenvolvimento de formulações, controle de qualidade e determinação de equivalentes farmacêuticos (ARANCIBIA,1991).

A interpretação quantitativa dos valores obtidos nos ensaios de dissolução é facilitada pela utilização de uma equação genérica, que traduz matematicamente a curva de dissolução em função de alguns parâmetros relacionados com a forma farmacêutica. Em alguns casos, essa equação pode ser deduzida através de uma análise teórica do processo, como numa cinética de ordem zero. Na maioria dos casos, porém, não existe um fundamento teórico, sendo usada uma equação empírica mais adequada. O tipo de fármaco, a sua forma polimórfica, cristalinidade, tamanho de partícula, solubilidade e quantidade incorporada na forma farmacêutica podem influenciar a cinética de liberação (COSTA & LOBO, 2001).

O cesto de rede e a pá agitadora são equipamentos simples, robustos, adequadamente definidos e padronizados e utilizados em todo o mundo, sendo conseqüentemente fundamentados numa vasta experimentação, razão pela qual são recomendados nos compêndios oficiais como primeira escolha para os ensaios de dissolução *in vitro* de formulações de liberação imediata ou modificada (FARINHA *et al.*, 1997).

2.11.1 - Métodos de dissolução

a) Sistema com pá agitadora

O aparelho com pá agitadora é constituído por (Figura 5) (INFARMED, 1997).

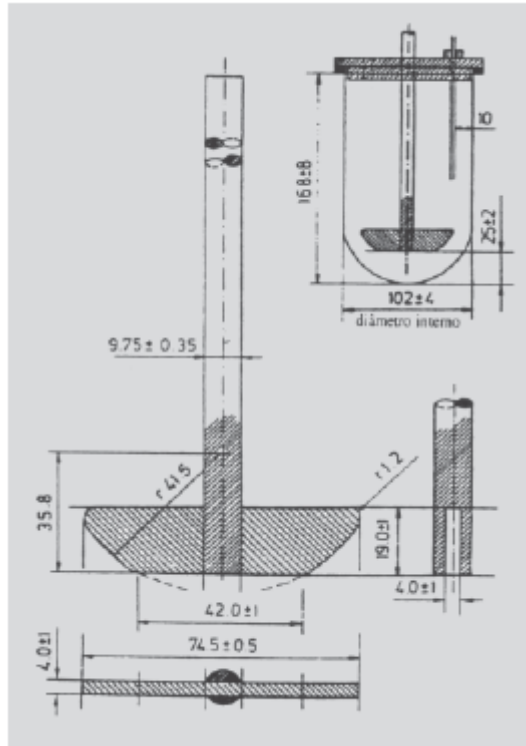


Figura 5. Aparelho de dissolução com pá agitadora (dimensões em mm).

- um recipiente cilíndrico de fundo hemisférico, de vidro borossilício ou outro material apropriado, munido de uma tampa, que evita a evaporação e que tem um orifício central destinado à passagem da haste do agitador, e vários outros, que permitem a introdução de um termômetro e dispositivos para coleta de amostras;
- um agitador constituído por uma haste vertical, que na extremidade inferior tem fixada uma pá, cuja forma corresponde a uma porção de círculo delimitada por dois planos paralelos. A haste deve ser montada de tal modo que o eixo não se afaste mais de 2 mm do recipiente e a parte inferior da pá se situe a uma distância de 25 mm (± 2 mm) do fundo do recipiente. A parte superior da haste do agitador liga-se a um motor munido de um regulador de velocidade. A rotação do agitador deve ser uniforme, sem oscilações apreciáveis;
- um banho termostaticado, que permite manter a temperatura do líquido de dissolução a 37 °C ($\pm 0,5$ °C) durante todo o ensaio.

b) Sistema com cesto de rede

O aparelho com cesto de rede é constituído por (Figura 6) (INFARMED, 1997).

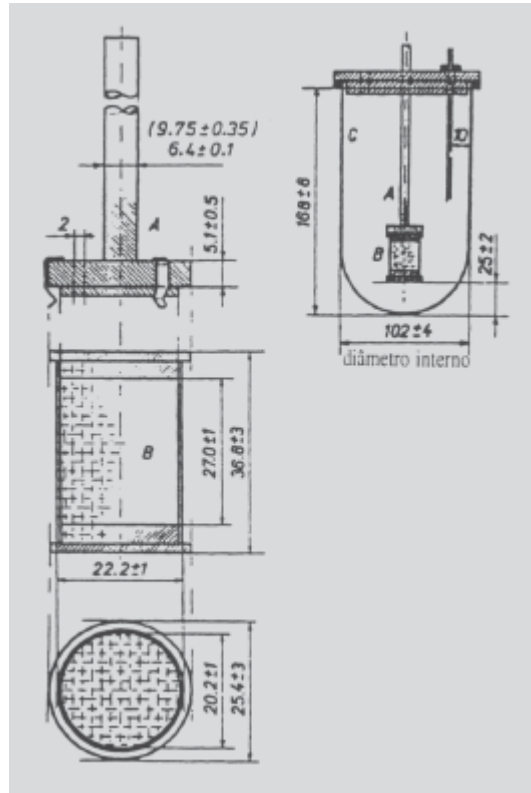


Figura 6. Aparelho de dissolução com cesto de redes (dimensões em mm).

- um recipiente idêntico ao descrito para o aparelho com pá agitadora;
- um agitador de aço inoxidável constituído por uma haste vertical, que na extremidade inferior tem fixado um cesto cilíndrico. Este cesto é formado por duas partes de aço inoxidável. A parte superior consiste em uma placa com um orifício de 2 mm soldada à haste do agitador. A parte inferior, cilíndrica, é constituída por uma rede de aço inoxidável; salvo indicação em contrário, os fios têm 0,254 mm de diâmetro e a abertura das malhas quadradas é de 0,381 mm. Esta parte inferior, que é fixa, destina-se a receber a amostra em ensaio. A distância entre o cesto e o fundo do recipiente deve ser de 25 mm (± 2 mm). A parte superior da haste do agitador liga-se a um motor munido de regulador de velocidade;

- um banho termostático, que permite manter a temperatura do meio de dissolução a 37 °C ($\pm 0,5$ °C) durante todo o ensaio.

2.12 - Referências

ABADIO, F.D.B.; DOMINGUES, A.M.; BORGES, S.V.; OLIVEIRA, V.M. Physical properties of powdered pineapple (*Ananas comosus*) juice - effect of malt dextrin concentration and atomization speed. *J Food Eng* 64: 285-287, 2004.

ALENCAR, S. M.; AGUIAR, C. L.; PAREDES-GUZMAN, J.; PARK, Y. K. Composição química de *Baccharis dracunculifolia*, fonte botânica das própolis dos estados de São Paulo e Minas Gerais. *Ciencia Rural*, Santa Maria, v. 35, n. 4, 909-915, 2005.

ALENCAR, S. M.; OLDONI, T. L. C.; CASTRO, M. L.; CABRAL, I. S. R.; COSTANETO, C. M.; CURY, J. A.; ROSALEN, P. L.; IKEGAKI, M. Chemical composition and biological activity of a new type of Brazilian propolis: Red propolis. *Journal of Ethnopharmacology* 113, 278-283, 2007.

AMICO, V.; NAPOLI, E. M.; RENDA, A.; RUBERTO, G.; SPATAFORA, C.; TRINGALI, C. Constituents of grape pomace from the Sicilian cultivar 'Nerello Mascalese'. *Food Chemistry*, 88(4): 599-607, 2004.

ARANCIBIA, A. Calidad biofarmacéutica estudios *in vitro* e *in vivo*. *Acta Farmaceutica Bonaerense*, La Plata 10: 123-133, 1991.

AULTON, M.E. *Pharmaceutics: The Science of Dosage Form Design*. 2 ed. Edinburg: Churchill Livingstone, p. 388-390, 2002.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. *Resolução n. 16*, de 30 de abril de 1999. Aprova o Regulamento Técnico de Procedimentos para Registro de Alimentos e ou Novos Ingredientes. Brasília, 1999a.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. *Resolução n. 17*, de 30 de abril de 1999. Aprova o Regulamento Técnico que Estabelece as Diretrizes Básicas para Avaliação de Risco e Segurança dos Alimentos. Brasília, 1999b.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. *Resolução n. 18*, de 30 de abril de 1999. Aprova o Regulamento Técnico que Estabelece as Diretrizes Básicas para Análise e Comprovação de Propriedades Funcionais e ou de Saúde Alegadas em Rotulagem de Alimentos. Brasília, 1999c.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. *Resolução n. 19*, de 30 de abril de 1999. Aprova o Regulamento Técnico de Procedimentos para Registro de Alimento com Alegação de Propriedades Funcionais e ou de Saúde em sua Rotulagem. Brasília, 1999d.

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

CABRAL, I. S. R.; OLDONI, T. L. C.; PRADO, A.; BEZERRA, R. M. N.; ALENCAR S. M.; KEGAKI, M.; ROSALEN, P. L. Composição fenólica, atividade antibacteriana e antioxidante da própolis vermelha brasileira. *Química Nova* 32(6): 1523-1527, 2009.

CAI, Q.; RANHN, R.O.; ZHANG, R. Dietary flavonoids, quercetin, luteolin and genistein reduce oxidative DNA damage and lipid peroxidation and quench free radicals. *Cancer Letters*; 119:99-107, 1999.

CAO, X.Q.; VASSEN, R.; SCHWARTZ, S.; JUNGEN, W.; TIETZ, F.; STÖEVER, D. Spray-drying of ceramics for plasma-spray coating. *J Eur Ceram Soc* 20: 2433-2439, 2000.

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

COSTA, P., LOBO, J. M. S. Modeling and comparison of dissolution profiles. *Eur. J. Pharm. Sci.*, Amsterdam, v. 13, n. 2, p. 123-133, 2001.

CUVELIER, M. E.; RICHARD, H.; BERSET, C. Comparison of the antioxidant activity of some acid phenols: structure-activity relationship. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 59: 324-325, 1992.

Da SILVA, F.A. *Avaliação tecnológica e atividade antioxidante de produtos secos por spray-drying de Ilex paraguariensis A. St. Hill. - Aquifoliaceae (erva-mate)*. Porto Alegre,

243p. Tese de doutorado, Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, UFRGS, 2007.

DA SILVA, J. F. M.; SOUZA, M. C.; MATTA, S. R.; ANDRADE, M. R.; VIDAL, F. V. N. Correlation analysis between phenolic levels of Brazilian propolis extracts and their antimicrobial and antioxidant activities. *Food Chemistry* 99(3): 431-435, 2006.

DAUGSCH, A.; MORAES, C. S.; FORT P.; PARK, Y. K. Brazilian Red Propolis-Chemical Composition and Botanical Origin. *Evidence-Based Complementary Alternative Medicine* 5(4):435-441, 2007.

DIB TAXI C.M.; De MENEZES, H.C.; SANTOS, A.B.; GROSSO, C.R. Study of the microencapsulation of camu-camu (*Myrciaria dubia*) juice. *Journal of Microencapsulation*, v. 20, n. 4, p. 443-448, 2003.

DONNELLY, D.M.X.; KEENAN, P.J.; PRENDERGAST, J.P. Isoflavonoids of *Dalbergia ecastophyllum*. *Phytochemistry*, 12: 1157-61, 1973.

FALCÃO, S.I.; VILAS-BOAS, M.; ESTEVINHO, L.M.; BARROS, C.; DOMINGUES, M.R.M.; CARDOSO, S.M. Phenolic characterization of Northeast Portuguese propolis: usual and unusual compounds. *Anal Bioanal Chem*, 396:887-897, 2010.

FARIA, L.A.N.; BARBOSA, O.R.; ZEOULA, L.M.; AGUIAR, S.C.; PRADO, R.M. BERTOLINI, D.A. Produto à base de própolis (LLOS) na dieta de bovinos inteiros confinados: comportamento animal e respostas sanguíneas. *Acta Scientiarum Animal Sciences* 33(1): 79-85, 2011.

FARINHA, A.; PAIS, J. P.; BICA, A. O ensaio de dissolução *in vitro* na avaliação da qualidade biofarmacêutica. *LEF -Boletim*, Lisboa, v. 4, n. 15, p. 1-7, 1997.

FERNANDES JUNIOR, A.; LOPES, M. M. R.; MONTEIRO, A. C. M.; VIEIRA, E. P. Atividade antimicrobiana de própolis de *Apis mellifera* obtidas em três regiões do Brasil. *Ciencia Rural*, Santa Maria, v. 36, n. 1, 294-297, 2006.

FERNÁNDEZ, J. Y.; MONTOYA, J. A. S.; MARTÍNEZ, L. C.; HERNÁNDEZ, J. J.; ROBLES, M. M.; RAMÍREZ, E. G. R. Aplicaciones biotecnológicas de la microencapsulación. *Avance y Perspectiva*, México, v. 21, p. 313-319, 2002.

FRANCIS, F. J. Anthocyanins and betalains: composition and applications. *Cereal Foods World*, 45: 208-213, 2000.

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

FUNARI, C. S.; FERRO, V. O. Análise de própolis. *Cienc Tecnol Aliment*, 26:171-178, 2006.

GHARSALLAOUI, A.; ROUDAUT, G.; CHAMBIN, O.; VOILLEY, A.; SAUREL, R.. Applications of spray drying in microencapsulation of food ingredients: An overview. *Food Research International*, v. 40, n. 9, p. 1107-1121, 2007.

GREGORY, S. R.; PICCOLO, N.; PICCOLO, M. T.; PICCOLO, M. S.; HEGGERS, J. P. Comparison of propolis skin cream to silver sulfadiazine: a naturopathic alternative to antibiotics in treatment of minor burns. *The Journal of Alternative and Complementary Medicine* 8(1): 77-83, 2002.

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

HERNÁNDEZ, A. M.; PRIETO GONZÁLES, E.A. Plantas que contienen polifenoles. *Revista Cubana de Investigaciones Biomedica*, 18(1): 12-14,1999.

HU, F.; HEPBURN, H. R.; LI, Y.; CHEN, M.; RADLOFF, SE.; DAYA, S. Effects of ethanol and water extracts of propolis (bee glue) on acute inflammatory animal models. *Journal of Ethnopharmacology* 100(3): 276-283, 2005.

HUNTHEY, L.A, ERNST, E. Soy for the treatment of perimenopausal symptoms-a systematic review. *Maturitas* 47:1-9, 2004.

KATAN, M.B.; HOLLMAN, P.C.H. Dietary flavonoids: intake, health effects and bioavailability. *Food Chem Toxicol*, 37:927-42, 1999.

KIM, D. O.; HEO, H. J.; KIM, Y. J.; YANG, H.S.; LEE, C.Y. Sweet and sour cherry phenolics and their protective effects on neuronal cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(26): 9921–9927, 2005.

KINSELLA, J.E.; FRANKEL E, GERMAN B, KANNER J. Possible mechanisms for the protective role of antioxidants in wine and plant foods, *Food Technology*, April, 85-89, 1993.

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

LIMA, M. G. A produção de própolis no Brasil. São João da Boa Vista: São Sebastião Editora e Gráfica, 2006.

LINOYA, K.; GOTOH, K.; HIGASHITANI, K. *Powder technology handbook*. New York: Wiley, 794 p. 1991.

LONGHINI, R.; RAKSA, S. M.; OLIVEIRA, A. C. P.; SVIDZINSKI, T. I. E.; FRANCO, S. L. Obtenção de extratos de própolis sob diferentes condições e avaliação de sua atividade antifúngica. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 17(3): 388-395, 2007.

LUSTOSA, S. R.; GALINDO, A. B.; NUNES, L. C. C.; RANDAU, K. P.; NETO, P. J. R. Própolis: atualizações sobre a química e a farmacologia. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 18(3): 447-454, 2008.

LUZ, I. S. Molecular characterization of toxins in *Staphylococcus aureus* isolated from milk and "coalho" cheese in cities from the Agreste region of Pernambuco. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 51(3): 177-177, 2009.

MAILLARD, M. N.; SOUM, M. H.; BOIVIA, P.; BERSET, C. Antioxidant activity of barley and malt: relationship with phenolic content. *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie*, 29(3): 238-244, 1996.

MARCUCCI, M. C. Propriedades biológicas e terapêuticas dos constituintes químicos da própolis. *Química Nova*, São Paulo, SP, 19(5): 529-536, 1996.

MARCUCCI, M.C.; WOISKY, R.G.; SALATINO, A. Uso do cloreto de alumínio na quantificação de flavonóides em amostras de própolis. Disponível em: <www.roberg.com.br/PaginaTrabalhoCientifico06.htm>. Acesso em: 20 de outubro de 2010.

MARQUELE, F. D.; OLIVEIRA, A. R. M.; BONATO, P.S.; LARA, M. G.; FONSECA, M. J. V. Propolis extract release evaluation from topical formulations by chemiluminescence and HPLC. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 41(2): 461-468, 2006.

MARTÍNEZ-FLÓREZ, S.; GONZÁLEZ-GALLEGO, J.; CULEBRAS, J.M.; TUÑÓN, M.J. Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutr Hosp*, 17 (6): 271-278, 2002.

MASCOLO, N.; BORRELLI, F.; CAPASSO, R.; CAPASSO, F.; CARLO, G.G.; IZZO, A.A. Natural Products and cardiovascular disturbances. *Phytother Res*, 12:121-23, 1998.

MATOS, F.J.A.; GOTTLIEB, O.R.; ANDRADE, C.H.S. Flavonoids from *D. ecastophyllum*. *Phytochemistry*, 14: 825–826, 1975.

MORAES, F. P.; COLLA L. M. Alimentos funcionais e nutracêuticos: definições, Legislação e benefícios à saúde. *Revista Eletrônica de Farmácia* 3 (2), 99-112, 2006.

NEGRO, C.; TOMMASI, L.; MICELI, A. Phenolic compounds and antioxidant activity from red grape marc extracts. *Bioresource Technology*, 87(1): 41-44, 2003.

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

PARK, K.J.; BIN, A.; BROD, F.P.R. Drying of pear 'd'Anjou' with and without osmotic dehydration. *Journal of Food Engineering*, v.56, p.97-103, 2002b.

PARK, Y. K.; ALENCAR, S. M.; SCAMPARINE, A. R. P.; AGUAR, C. L. Própolis produzida no sul do Brasil, Argentina e Uruguai: evidências fitoquímicas de sua origem vegetal. *Ciência Rural* 32(6): 6, 997-1003, 2002.

PARK, Y. K.; IKEGAKIM M.; ABREU, J. A. S.; ALCICI, N. M. F.; *Ciência e Tecnologia de Alimentos*,18:313. 1998

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

PERRY, R. H.; CHILTON, C. H. *Manual de Engenharia Química*. 5.ed. Rio de Janeiro:Guanabara Dois, n.p. 1980.

PETROVICK, P. R.; SIMOES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A. Farmacognosia da planta ao medicamento, 6ª edição, ed.

PINTO, M.F.C. Revista portal de Divulgação, n.6, Jan. 2011

PREECHAGOON, D., UDOMPRATEEP, A., MANWIWATTANAGUL, G. Improved dissolution rate of poorly soluble drug by incorporation of buffers. *Drug Dev. Ind. Pharm.*, New York, v. 26, n. 8, p. 891-894, 2000.

QUEK, S.Y.; CHOK, N.K.; SWEDLUND, P. The physicochemical properties of spray-dried watermelon powders. *Chem Eng Process* 46: 386-392, 2007.

RIGHETTO, A. M.; NETTO, F. M. Effect of encapsulating materials on water sorption, glass transition and stability of juice from immature acerola. *International Journal of Food Properties*, v. 8, n. 2, p. 337-346, 2005.

ROSENBERG, M.; YOUNG, S. L. Whey proteins as microencapsulating agents. Microencapsulation of anhydrous milkfat-structure evaluation. *Food Structure*, Chicago, v. 12, n. 1, p. 31-41, 1993.

SALATINO, A.; TEIXEIRA, E. W.; NEGRI, G.; MESSAGE, D. Origin and chemical variation of Brazilian propolis. *Evidence-Based Complementary Alternative Medicine* 2(1): 33-38, 2005.

SCAZZOCCHIO, F.; D'AURIAK, F. D.; ALESSANDRINI, D.; PANTANELLA, F. Multifactorial aspects of antimicrobial activity of propolis. *Microbiological Research* 4: 327-333, 2005.

SETCHELL, K.D.R. Phytoestrogens: the biochemistry, physiology, and implications for human health of soy isoflavones. *Am J Clin Nutr* 68:1333S-46S, 1998.

SHAW, F.V. Spray drying as an alternative granulation technique. In: Parikj DM. *Handbook of Pharmaceutical Granulation Technology*. Nova York: Marcel Dekker, p. 75-96, 1997.

SILVA JÚNIOR, J.O.C.; VIEIRA, J.L.F.; BARBOSA, W.L.R.; PEREIRA, N.L. Caracterização físico-química do extrato fluido e seco por nebulização de *Symphytum officinale* L. *Rev Bras Farmacogn* 16(Supl.): 671-677, 2006.

SIMÕES, C. C.; ARAUJO, D. B.; ARAUJO, R. P. C. Estudo *in vitro* e *ex vivo* da ação de diferentes concentrações de extratos de própolis frente aos microrganismos presentes na saliva de humanos. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 18(1): 84-89, 2008.

SIMÕES, C. C.; ARAUJO, D. B.; ARAUJO, R. P. C. Estudo *in vivo* e *ex vivo* da ação de diferentes concentrações de extratos de própolis frente aos microrganismos presentes na saliva de humanos. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 18(1): 84-89, 2008.

SOARES, L.A.L. *Obtenção de comprimidos contendo alto teor de produto seco por aspersão de Maytenus ilicifolia Mart. ex Reissek - Celastraceae. Desenvolvimento tecnológico de produtos intermediários e final*. Porto Alegre, 285p. Tese de doutorado, Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, UFRGS, 2002.

SOUSA, J. P. B.; FURTADO, N. A. J. C.; JORGE, R.; SOARES, A. E. E.; BASTOS, J. K. Perfis físico-químico e cromatográfico de amostras de própolis produzidas nas microrregiões de Franca (SP) e Passos (MG), Brasil. *Rev Bras Farmacogn* 17: 85-93, 2007.

SU, Y.L.; FU, Y.; ZHANG, J.Y.; WANG, W.M.; WANG, H.; WANG, Y.C.; ZHANG, Q.J. Microencapsulation of radix *Salvia miltiorrhiza* nanoparticles by spray-drying. *Powder Technol* 184: 114-121, 2008.

SUZUKI, I. A própolis de solução aquosa – Disponível- site palestra APACAME 26 de julho de 2000): [wttp://www.apacame.org.br/mensagemdoce/58/palestra.htm](http://www.apacame.org.br/mensagemdoce/58/palestra.htm), Consultado em 10 de outubro de 2009.

TAVARES, J. P.; MARTINS, I. L.; VIEIRA, A. S.; LIMA, F. A. V.; BEZERRA, F. A. F.; MORAES, M. O.; MORAES, M. E. A. Estudo de toxicologia clínica de um fototerápico a

base de associações de plantas, mel e própolis. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 16(3): 350-356, 2006.

TEIXEIRA, E. W.; MESSAGE, D.; NEGRI, G.; SALATINO, A.; STRINGHETA, P. C. Seasonal variation, chemical composition and antioxidant activity of Brazilian propolis samples. *Evidence-Based Complementary Alternative Medicine* 1-9, 2008.

TOMÁS-BARBERÁN, F.A.; FERRERES, F.; VALBUENA, A.O.; MAESO, M.C.F. Estudio sobre el contenido en flavonoides de las mieles de La Alcarria: su aplicación a la caracterización geográfico-botánica, CSIC, Consejería de Agricultura y Medio Ambiente de La Junta de Comunidades de Castilla-La Mancha, 9-12, 1994.

TONON, R.V.; BRABET, C. HUBINGER, M.D. Influence of process conditions on the physicochemical properties of açai (*Euterpe oleraceae* Mart.) powder produced by spray drying. *J Food Eng* 88: 411-418, 2008.

TRUSHEVA, B.; POPOVA, M.; BANKOVA, V.; SIMOVA, S.; MARCUCCI, M. C.; MIORIN, P. L.; PASIN, F. R.; TSVETKOVA, I. Bioactive constituents of Brazilian red propolis. *Evidence-Based Complementary Alternative Medicine* 3(2): 249-254, 2006.

UFRGS, Porto Alegre, 2007.

UZEL, A.; SORKUN, K.; ÖNÇAG, Ö.; ÇOGULO, D.; GENÇAY, Ö.; SALIH, B. Chemical compositions and antimicrobial activities of four different Anatolian propolis samples. *Microbiological Research* 160(2): 189-195, 2005.

VAN'T LAND, C. M. *Industrial drying equipment. Selection and application*. New York: Marcel Dekker, 362 p. 1991.

VARGAS, A. C.; LOGUERCIO, A. P.; WITT, N. M.; DA COSTA, M. M.; SÁ E SILVA, M.; VIANA, L. R. Atividade antimicrobiana "in vitro" de extrato alcoólico de própolis. *Ciência Rural* 34(1): 159-163, 2004.

VASCONCELOS, E.A.F.; MEDEIROS, M.G.F.; RAFFIN, F.N.; MOURA, T.F.A.L. Influência da temperatura de secagem e da concentração de Aerosil® 200 nas características dos extratos secos por aspersão da *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae). *Rev Bras Farmacogn* 15: 243-249, 2005.

VOLPI, N.; BERGONZINI, G. Analysis of flavonoids from propolis by on-line HPLC-electrospray mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 42(3): 354-361, 2006.

WENDEL, S.; CELIK, M. Uma visão geral sobre o uso da tecnologia de spray-drying. *Pharm. Technol.* 2(2): 129-134, 1998.

YOKOZAWA, T.; DONG, E.; LIU, Z.W. & SHIMIZU, M. Antioxidant activity of flavones and flavonols in vitro. *Phytotherapy Research*, 11:446-450, 1997.

YLMAZ , Y. & TOLEDO R. T. *Trends in Food Science and Technology*, 15, 422-433, 2004.

3. ARTIGO DE RESULTADOS

OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE EXTRATOS GALÊNICOS E EXTRATOS SECOS SPRAY-DRYER DA PRÓPOLIS VERMELHA DE ALAGOAS

EXTRACTION AND CHARACTERIZATION OF GALENIC EXTRACTS AND SPRAY-DRYER EXTRACTS OF RED PRÓPOLIS FROM ALAGOAS

RESUMO

Os produtos naturais, nos dias de hoje, representam uma das alternativas entre as diversas fontes de insumos necessários à existência da sociedade, tendo como principal vantagem o fato de ser uma fonte renovável e, em grande parte, controlável pelo homem. A própolis é um dos muitos produtos que vem sendo utilizado durante séculos pela humanidade. Apresenta composição química muito complexa e bastante variada estando relacionada com a ecologia da flora de cada região. A própolis vermelha do nordeste do Brasil ganha destaque por ter ação biológica superior a outros tipos de própolis. Visando contribuir com a discussão, a presente dissertação apresenta um artigo original intitulado *OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE EXTRATOS GALÊNICOS E EXTRATOS SECOS SPRAY-DRYER DA PRÓPOLIS VERMELHA DE ALAGOAS* que discute a melhor formulação para secagem de própolis vermelha utilizando marcadores biológicos identificados através de técnicas cromatográficas e também análises da atividade antimicrobiana. Dos extratos secos de própolis vermelha (ESPV) desenvolvidos aquele obtido pelo método de emulsificação apresentou melhor rendimento do que o obtido pelo método de dispersão. Os ESPV apresentaram características tecnológicas uniforme, liso e micropartículas não-aglomeradas com forma esférica quando analisadas em microscopia eletrônica de varredura (MEV). Um método preciso de HPLC foi desenvolvido para determinação de flavonóides no ESPV, tintura, extrato seco e cápsulas de própolis vermelha. Formononetina foi determinada como um marcador principal para a própolis vermelha para os estudos de dissolução. O método de dissolução demonstrou ser uma ferramenta útil no desenvolvimento de pós a base de substâncias orgânicas. Na análise da atividade antimicrobiana a própolis vermelha apresentou uma excelente ação frente a *Pseudomonas aeruginosa* produtora de Metalobetalactamase. Os compostos associados a essa atividade mantiveram-se preservados, mesmo após o processamento de secagem o que torna essa técnica perfeitamente viável para a produção de micropartículas com bioatividade. Levando-se em consideração esses aspectos entende-se que o pó de própolis vermelha obtido pela técnica Spray-Dryer não apresentou alteração quanto às características inicialmente observadas no extrato e pode ser prontamente utilizado como nutracêutico, inclusive em forma de cápsulas.

Palavras-chave: Própolis vermelha, flavonoides, extratos Spray-Dryer, método CLAE-UV, teste de dissolução.

ABSTRACT

Natural products, today, represent one of the alternatives among the various sources of inputs necessary for the existence of society, the main advantage is the fact of being a renewable source, and largely controllable by man. Propolis is one of the many products that has been used for centuries by mankind and it presents a very complex chemical composition that is quite varied and is linked to the ecology of the flora of each region. The propolis from northeastern Brazil is highlighted by having biological activity than other types of propolis. To contribute to the discussion, this paper show an original article entitled *EXTRACTION AND CHARACTERIZATION OF GALENIC EXTRACTS AND SPRAY-DYER EXTRACTS OF RED PRÓPOLIS FROM ALAGOAS* that argues the best formulation for drying red propolis using biological markers by techniques chromatographic analysis and also antimicrobial activity. Of the Spray-Dryer red propolis (SDRP) developed that obtained by emulsification method showed better performance than that obtained by the method of dispersal. The technological characteristics SDRP showed uniform, smooth and non-agglomerated microparticles with spherical shape when viewed in scanning electron microscopy (SEM). A precise method was developed for the HPLC determination of the flavonoids in SDRP, dye, dry extract and capsules of propolis. Formononetin was determined as the main marker for propolis in the dissolution studies. The dissolution test proved a useful tool in the development of post-based organic substances. The red propolis showed excellent activity against *Pseudomonas aeruginosa* Metalobetalactamase production. The compounds associated with this activity remained preserved even after the drying process. Taking into consideration these aspects means that the powder propolis obtained by spray-dryer technique did not change on the characteristics initially observed in the extract and can be readily used as a nutraceutical, even in capsule form.

Key words: Red propolis, flavonoids, Spray-Dryer extracts, method CLAE-UV, dissolution test.

1 – Introdução

A própolis vermelha do nordeste do Brasil vem ganhando destaque mundial por apresentar atividade biológica superior aos outros tipos de própolis. Ela possui uma excelente ação cicatrizante, antibacteriana, antifúngica entre outras ações biológicas e, em especial, antioxidante. Essas ações são correlacionadas ao alto teor de flavonoides presentes, os quais também desempenham um importante papel na saúde humana e muitos desses somente são encontrados na própolis vermelha dessa região (ALENCAR *et al.*, 2007).

Muito utilizada na colméia como substância de defesa bacteriostática contra bactérias e fungos, insetos, mumificação de insetos e como isolante térmica, revestindo e envernizando, a colméia a própolis tem sido continuamente usada para fins medicinais desde as civilizações antigas (BANSKOTA *et al.*, 2001; BOYANOVA *et al.*, 2003; PARK *et al.*, 2005, CASTALDO & CAPASSO, 2002). O uso popular cada vez crescente de própolis e seus derivados com ação antioxidante, antimicrobiana, anti-inflamatória, antiviral, antineoplásica e imunomodulatória vêm demonstrando o grande poder terapêutico da própolis em substituição aos medicamentos sintéticos convencionais (MORENO *et al.*, 2000; LUSTOSA *et al.*, 2008). A composição química da própolis é determinada, principalmente, pelas características fitogeográficas existentes ao redor da colméia (KUMAZAWA *et al.*, 2004) e também de forma sazonal (SFORCIN *et al.*, 2000) e/ou por diferentes raças de abelhas (SILICI & KUTLUCA, 2005). Park *et al.* (2005), relataram um importante pesquisa sobre a classificação dos tipos de própolis produzidas no Brasil. Neste estudo, o autor conclui que existem 13 grupos de própolis, sendo a própolis vermelha classificada como a 13ª proveniente da espécie vegetal *Dalbergia ecastophyllum*.

Os constituintes químicos do mel e da própolis vêm sendo identificados no mundo inteiro. Os flavonóides, ácidos fenólicos e diterpenos são as principais substâncias encontradas e utilizadas para rastrear a qualidade e, em alguns casos, para demonstrar a autenticidade da própolis de algumas regiões geográficas (VOLP & BERGONZINI, 2006; PIETTA *et al.*; 2007). Dentre os flavonóides e ácidos fenólicos mais comumente utilizados como marcadores podemos citar: Quercetina, canferol, naringenina, crisina, pinocebrina, galangina (flavonóides); ácido gálico, ácido caféico, ácido p-coumárico, ácido ferúlico, ácido cinâmicos e derivados (ácido fenólicos), clerodanos (diterpenóides) (ROSALEN *et al.*; 2007; TOMÁS-BARBERÁN *et al.*, 1997;

YAO *et al.*, 2004; YAO *et al.*, 2005; BANKOVA *et al.*, 1983; WESTON *et al.*, 2004; ANDRADE *et al.*, 1997; PICCINELLI *et al.*, 2005; MATSUNO *et al.*, 1997; MITAMURA *et al.*, 1996). Outros marcadores são específicos para a própolis verde brasileira como a isosakuranetina, bakarina, drupanina e Artepilina-C. Artepilina C vem demonstrando excelente atividade anti-tumoral. Flavonóides como formonetina, dalbergina, isoliquiritigenina, liquiritigenina, pinocembrina e Biochanina A foram identificados na própolis vermelha de Alagoas (PARK *et al.*, 2005).

Com o avanço das técnicas analíticas, o isolamento e análise dos constituintes do mel e própolis vêm se modernizando cada vez mais, desde a técnica mais simples por cromatografia em coluna (YAO *et al.*, 2004; YAO *et al.*, 2005; WESTON *et al.*, 2004), bem como por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) acoplada a detectores de UV, arranjo de diodo (DAD) (TOMÁS-BARBERÁN *et al.*, 1997; BANKOVA *et al.*, 1983). As análises dos constituintes flavonóides e compostos fenólicos também vêm se modernizando desde o uso de reações químicas específicas (métodos colorimétricos com Cloreto de Alumínio e Folin-Ciocalteu), espectrofotometria do UV, eletroforese capilar (ANDRADE *et al.*, 1997), além da CLAE-DAD (TOMÁS-BARBERÁN *et al.*, 1997), CLAE-EM (PIETTA *et al.*, 2007; VOLPI *et al.*, 2006) e CLAE-RMN (WATSON *et al.*, 2006) e cromatografia gasosa acoplada espectrometria de massa (ROSALEN *et al.*, 2007).

O desenvolvimento de novos produtos medicamentosos de origem vegetal e/ou animal requer o uso de técnicas analíticas para caracterizar as substâncias bioativas presentes na matéria prima em discussão. A espectrofotometria do ultravioleta, análise térmica (MACEDO *et al.*, 2002a; MACEDO *et al.*, 2001a; MACEDO *et al.*, 2001b; MACEDO & NASCIMENTO, 2000; MACEDO *et al.*, 2002b; ARAGÃO *et al.*, 2001), cromatografia líquida de alta eficiência (NASCIMENTO *et al.*, 2005; CONCEIÇÃO *et al.*, 2005), nebulizadores (spray-dryer) e sistema de dissolução serão as principais ferramentas analíticas de desenvolvimento e monitoramento da qualidade de matérias-primas, produtos intermediários e/ou futuros produtos a base de própolis vermelha (NASCIMENTO *et al.*, 2010)]. Sistemas de nebulização (spray-dryer) serão ferramentas analíticas que reduzirão enormemente o tempo de obtenção de extratos a partir da própolis vermelha garantindo um produto intermediário mais estável, além de ser útil na fase de isolamento dos biomarcadores da própolis vermelha. O desenvolvimento de novas tecnologias de extração e separação é de fundamental importância para

operacionalização da rastreabilidade seletiva dos marcadores químicos de forma quantitativa e demonstrar a autenticidade da própolis vermelha do Estado de Alagoas. Por isso, a cromatografia líquida de alta eficiência é a principal escolha para obtenção de resultados com precisão e exatidão. Técnicas de extração em fase sólida serão desenvolvidas como técnicas de controle de qualidade para estabelecer metodologias analíticas de extração e clean-up, previamente aos estudos da cromatografia líquida de alta eficiência. As técnicas Cromatográficas vêm se tornando muito popular nos últimos anos devido a redução dos custos na aquisição dos equipamentos, além da agilidade na obtenção dos resultados analíticos para identificação e quantificação de fármacos e demais constituintes em alimentos, impurezas, nos estudos de estabilidade e também para determinar a quantidade de marcadores e substâncias bioativas em amostras vegetais e fitoterápicos. O sistema de dissolução vem se transformando numa das técnicas essenciais para a indústria farmacêutica na qualificação dos fornecedores, análise da qualidade de matérias-primas, desenvolvimento de formulações, avaliação da qualidade lote-a-lote, obtenção de medicamentos com qualidade e por ser uma ferramenta que na maioria dos casos simula velocidade e grau de absorção através das correlações *in vivo in vitro* (MARQUELE *et al.*, 2006; SOUZA *et al.*, 2007). Assim, o presente trabalho teve como objetivo obter e caracterizar extratos galênicos e extratos secos Spray-Dryer de própolis vermelha através de ensaios cromatográficos, microscopia de varredura eletrônica, ensaios de dissolução e atividade antimicrobiana de forma a avaliar a qualidade dessas formulações.

2 – Material e métodos

2.1 – Reagentes

Os flavonóides chrysin, a catequina, a pinocembrina, a formononetina e a biochanina A e o ácido gálico, ácido ferúlico, ácido p-cumárico (Sigma-Aldrich) foram adquiridos como padrões analíticos. A quercetina, luteolina, epicatequina, rutina, foram os flavonóides padrões secundários.

Etanol, lauril sulfato de sódio, dihidrogenofosfato de potássio, fosfato dipotássico foram utilizados como reagentes de grau analítico para o processo de

extração, para a preparação dos extratos Spray Dryer e método de dissolução. Para análise por HPLC, metanol HPLC e ácido fórmico foram adquiridos (JT Baker, Mallinckrodt, México) e água de qualidade Mili-Q foi utilizada.

Foi utilizado gelatina (Royal ®, Brasil), amido pré-gelatinizado e dióxido de silício coloidal com grau farmacêutico.

2.2 – Coleta do Material

A própolis vermelha (material *in natura*) foi coletada no Município de Marechal Deodoro e doada pela apícola Ilha do Porto, localizado no Município de Maceió. Foi utilizada uma amostra aleatória para a preparação dos extratos de própolis.

2.3 – Preparação do Extrato Bruto de Própolis

Uma amostra de 100g de própolis foi submetida a processo de extração por maceração em álcool 80°GL (1000 mL) por período de 48 horas. O processo de extração foi repetido por 4 vezes até o completo esgotamento do material. O material foi concentrado em rotaevaporador (Fisatom , Curitiba, Paraná, Brasil), acoplado a uma bomba de vácuo (Tecnal, São Paulo, Brasil) usando uma velocidade de rotação de 80 rpm, temperatura do banho Maria 50°C e pressão de 700 mmHg. O extrato bruto (68g) obtido foi solubilizado em sistema de solvente etanol:água destilada (70:30, v/v) e submetido a processo de particionamento com hexano, clorofórmio e acetato de etila. O extrato clorofórmico (50g) obtido em maior quantidade foi concentrado em rotaevaporador e utilizado para obtenção dos extratos secos de própolis vermelha (ESPV).

2.4 – Preparação dos Extratos Secos de Própolis Vermelha

Para a preparação dos ESPV foram utilizados amido pregelatinizado, gelatina e dióxido de silício coloidal como adjuvantes no processo de secagem. O ESPV A apresentou uma composição de: 10g do extrato clorofórmico, 10 g de amido pré-gelatinizado, 10g de gelatina e 2 g de dióxido de silício coloidal. O ESPV B apresentou

a seguinte composição: 10g do extrato clorofórmico, 10 g de amido pré-gelatinizado. O ESPV C continha a seguinte composição: 10g do extrato clorofórmico, 10 g de gelatina. O ESPV D apresentou uma composição de: 10g do extrato clorofórmico, 2.5 g de amido pré-gelatinizado, 7.5g de gelatina e 0.2g de dióxido de silício coloidal.

Uma quantidade de 10g do extrato clorofórmico de própolis vermelha foi solubilizado em 200 mL do sistema de solvente etanol:água (60:40, v/v). Os adjuvantes foram preparados em outro recipiente com uma quantidade de 100mL de água com uma auxílio de uma agitador. Em seguida, o extrato clorofórmico foi incorporado ao sistema disperso contendo os adjuvantes e submetidos a secagem por Spray-Dryer sob agitação constante.

2.5 – Condições de Secagem do Spray-Dryer

Os extratos secos de própolis vermelha, (ESPV A, ESPV B, ESPV C e ESPV D), foram submetidos ao processo de secagem em Spray-Dryer, (LABMAQ, modelo MSD 1.0), usando agulha injetora de 1 mm. O Spray-Dryer apresentou as seguintes condições de secagem: temperatura de entrada 160°C, temperatura de saída 130°C, fluxo de bombeamento 0.3 L/h. e vazão de ar 4.50 Litros.

Após secagem, os pós obtidos (ESPV) foram pesados para determinação do rendimento, em que a quantidade obtida foi dividida pela quantidade inicialmente adicionada multiplicado por 100 para obter-se os valores de rendimento em percentagem.

2.6 - Microscopia Eletrônica de Varredura dos Extratos Secos de própolis vermelha

A morfologia das micropartículas contendo os extratos Spray-Dryer de própolis vermelha foram avaliados com um microscópio eletrônico de varredura (MEV). Os pós foram fixados a uma fita adesiva dupla-face, revestido com ouro 40 mA, sob vácuo e analisados com um microscópio eletrônico de varredura (JEOL JSM-6460,Tóquio, Japão).O MEV foi operado a 15 kV com aumentos de 100, 200, 500, 1000, 2000 e 5000 vezes.

2.7 – Determinação dos marcadores da própolis vermelha

Os marcadores da própolis vermelha foram quantificados usando a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Extrato de própolis vermelha (2.5g) foi usado para preparar uma solução estoque de 50 mg/mL. Diluições sucessivas foram realizadas para obter as concentrações de 10, 20, 40, 80, 100, 200 e 500µg/mL. Uma quantidade correspondente a 20mg de extrato clorofórmico nos ESPV (A, B, C e D) foi transferido para balão de 100 mL e completado volume com sistema de solvente metanol:água osmose reverssa (1:1, v/v) para obter concentração de 200 µg/mL. Solubilização em banho ultrasônico por 30 minutos, seguido de agitação magnética por período de 30 minutos foi realizado para completa solubilização dos marcadores no ESPV.

O sistema de CLAE consistia de uma bomba LC-10AD, um forno CTO-10AD, um detector de UV SPD-10AD, um módulo controlador CMB-10AD acoplado a um microcomputador através de um software da Shimadzu LC-solution. Para aquisição dos dados. A fase móvel consistia de um sistema gradiente (ácido fórmico:metanol). O Solvente A contendo ácido fórmico (1:19, ácido fórmico:água, v/v) e o solvente B metanol grau HPLC (J.T. Baker, México). A separação foi alcançada numa coluna Shimpak C18 column (250mm×4.6mm i.d.; 5µm) equipado com uma coluna Phenomenex C18 (4.0mm×3.0mm i.d.) mantida numa temperatura de 40°C. A taxa de fluxo foi mantida em 0.80 mL/min e o detector UV ajustado para 281 nm. Um sistema gradiente foi programado da seguinte forma: 30% de B no intervalo entre 0 e 7 minutos; 40% de B em 15 minutos; 45% em 30 minutos; 60% de B em 40 minutos; 80% de B em 50 minutos; 90% de B em 60 minutos; redução para 30% de B em 65 minutos e manteve-se nesta condição isocrática até o tempo de 70 minutos. As amostras foram introduzidas usando o injetor de rheodyne com volume de 20µL.

2.8 – Perfil de Dissolução dos Extratos Secos de Própolis Vermelha

Uma quantidade correspondente a 90mg de ESPV (A e D) foi introduzidos em cápsulas de gelatina dura para avaliar a quantidade dissolvida em meio de dissolução (900 mL) durante o período de 120 minutos. Uma concentração teórica de 100 µg/mL do extrato representou 100% de dissolução.

Os ESPV A e ESPV D foram submetidos a perfil de dissolução num dissolutor Erweka, modelo DT 8000, usando temperatura de 37°C, velocidade de rotação de 100 rpm e volume do meio de dissolução 900mL. Os ESPV A e D foram submetidos a diferentes condições de pH 1.0 (0.1 N HCl), pH 6.8 (tampão fosfato equimolar + laurilsulfato de sódio 0,01%) e pH 7.4 (tampão fosfato + laurilsulfato de sódio 0,01%). Uma amostra de 15 mL do meio de dissolução era coletada (com reposição) nos tempos de 30, 60 e 120 minutos, filtrada em papel de filtro com tamanho de poro de 14 µm. Uma alíquota de 100µL foi previamente filtrada em membrana filtrante de 0,45µm durante a injeção da amostra no CLAE.

2.9 – Atividade antimicrobiana da própolis vermelha.

Para avaliar a atividade antimicrobiana foram utilizadas as seguintes cepas bacterianas: BAC 1 - *Staphylococcus aureus* ATCC 25923; BAC 2 – *Enterococcus faecalis* ATCC 29212; BAC 3- *Escherichia coli* ATCC 25922; BAC 4 – *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853; BAC 5 – *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente produtora de Metalobetalactamase. O perfil de resistência da BAC 5 está descrito na Tabela 1.

Tabela 1. Perfil de resistência da *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente produtora de Metalobetalactamase.

Antimicrobiano	Perfil de sensibilidade
Ciprofloxacino	R
Meropenen	R
Gentamicina	R
Imipenen	R
Ertapenen	R
Amicacina	R
Piperacilina/Tazobactan	R
Ampicilina/Sulbactan	R

S- Sensível R – Resistente

Foi determinada a Concentração Inibitória Mínima (CIM) para a fração clorofórmica. Os microrganismos foram inoculados em caldo BHI e incubados a 37 °C/24h, a fim de se obter uma turvação equivalente a 0,5 de McFarland. O inóculo microbiano foi semeado, na superfície das placas de Agar Mueller Hinton contendo

concentrações diferentes de extrato de própolis solubilizado. Em seguida as placas foram incubadas em estufa bacteriológica por 24 horas em temperatura de 36,5° C. A avaliação da atividade antimicrobiana foi realizada observando-se a formação de crescimento bacteriano sobre a placa e a CIM foi considerada a maior concentração onde não houve crescimento bacteriano.

Em seguida foram preparadas sub-frações a partir da fração clorofórmica e com elas foram analisadas as CIM. Os pós de própolis também foram submetidos às análises para averiguar se houve perda da atividade biológica após o processamento seguindo a mesma metodologia

3 – Resultados e Discussão

3.1 - Extratos de própolis vermelha.

A - Caracterização dos extratos de própolis vermelha.

I - Por UV-visível

Espectrofotometria na região UV-VIS do espectro eletromagnético é uma das técnicas analíticas mais empregadas, em função de robustez, custo relativamente baixo e grande número de aplicações (ROCHA & TEXEIRA, 2004). A própolis vermelha foi analisada usando espectrofotometria de UV-visível. Todas as amostras demonstraram dois comprimentos de onda principal de 212nm e 281 nm. Os padrões catequina, epicatequina e pinocembrina (290nm) apresentam um comprimento de onda máxima em 281nm. A isoliquiritigenina (309nm), formononetina (302nm), biochanina A (262nm) apresentaram comprimento de onda diferentes, mas próximo a 280 nm (Figura 1). Estes dados foram importantes na escolha do comprimento de onda para análise por CLAE-UV perto de 280nm.

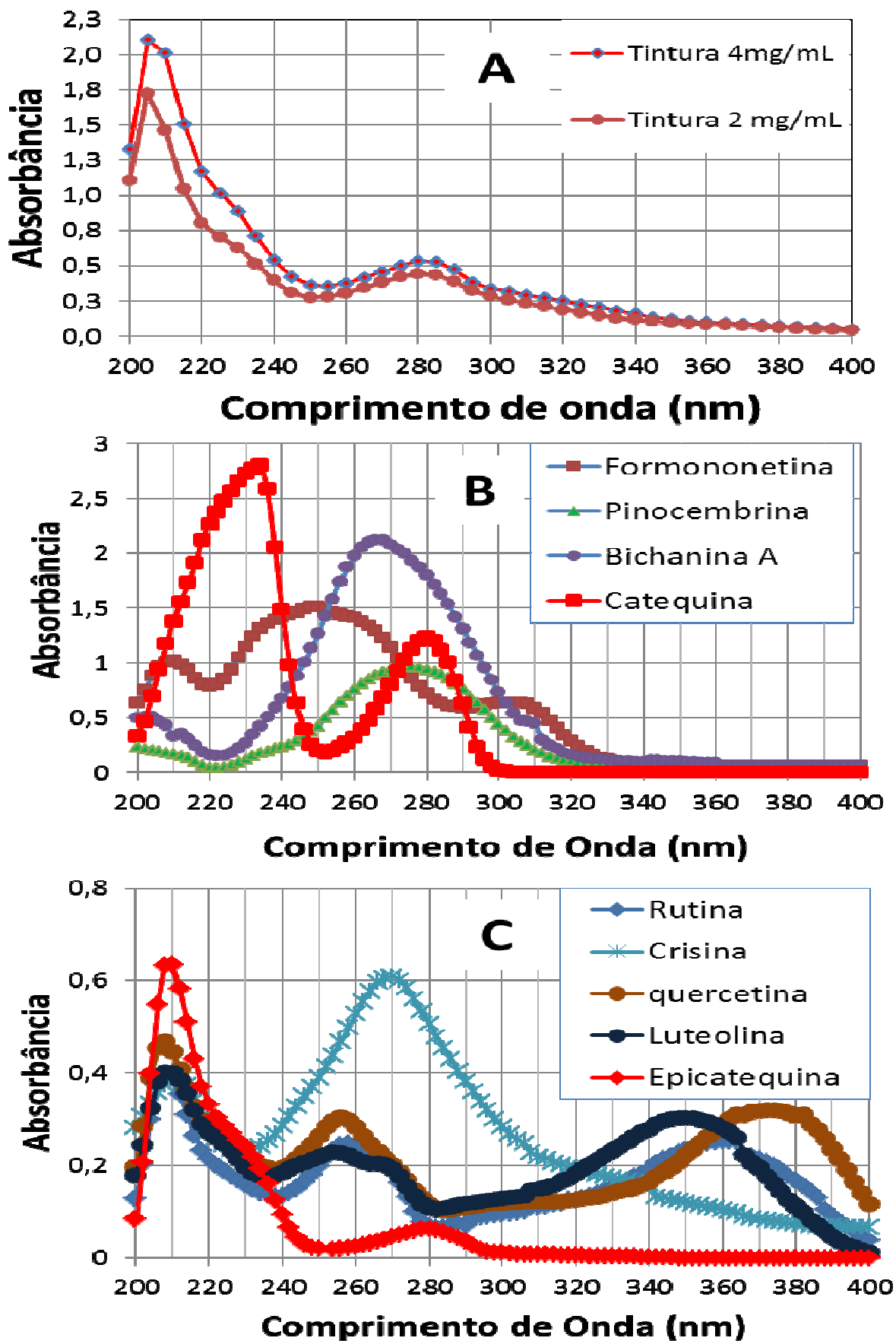


Figura 1 – Espectros UV dos padrões autênticos dos flavonóides encontrados na própolis vermelha de Alagoas.

II. Por CLAE

Com o método de cromatografia, com sistema de eluição em gradiente (descrito na secção 2,6) foi possível determinar quatro marcadores majoritários da própolis vermelha. A comparação com padrões mostraram que os compostos **1**, **2**, **3** e **4** apresentaram tempos de retenção de 25,4, 45,4, 47,2 e 59,7 minutos. Formononetina foi identificada em 47,2 minutos, pico de **3**, mas o pico **1**, **2** e **4** foram identificados como isoliquiritigenina, pinobanksina e pinobaksin-3acetato (Figura 1). Outros flavonóides também foram identificados utilizando o tempo de retenção do ácido gálico catequina (3,7) (4,9), epicatequina (5,9), ácido p-cumárico (11,9), ácido ferúlico (13,8), rutina (18,8), quercetina (32,7), luteolina (36,7), biochanina A (51,9) e chrysin (52,2), mas apresentaram menor concentração (Figura 2).

O cromatograma ampliado do extrato bruto de própolis vermelha mostrou a presença de outras substâncias fenólicas ainda não identificadas na matéria-prima de própolis vermelha e que será motivos de novos estudos para identificação e comprovação biológica (Figura 2 B).

A Formononetina foi identificada com um dos compostos majoritários em 47,2 minutos, e corresponde ao pico 3, mas o pico 1, 2 e 4 não foram identificados neste estudo. Estudo de Park *et al.*, (2005) mostram que os pico 1, 2 e 4, provavelmente correspondem a pinobanksina, isoliquiritigenina, e pinobaksin-3acetato, respectivamente.

Na própolis existem numerosos compostos fenólicos, especialmente flavonóides e ácidos fenólicos. Alguns compostos encontrados na própolis vermelha do nordeste do Brasil encontram-se presentes em outros tipos de própolis, porém, alguns componentes identificados somente são encontrados nessa própolis vermelha, ou, ainda, estes compostos apresentam maiores quantidades nela (MARCUCCI *et al.*; 2010).

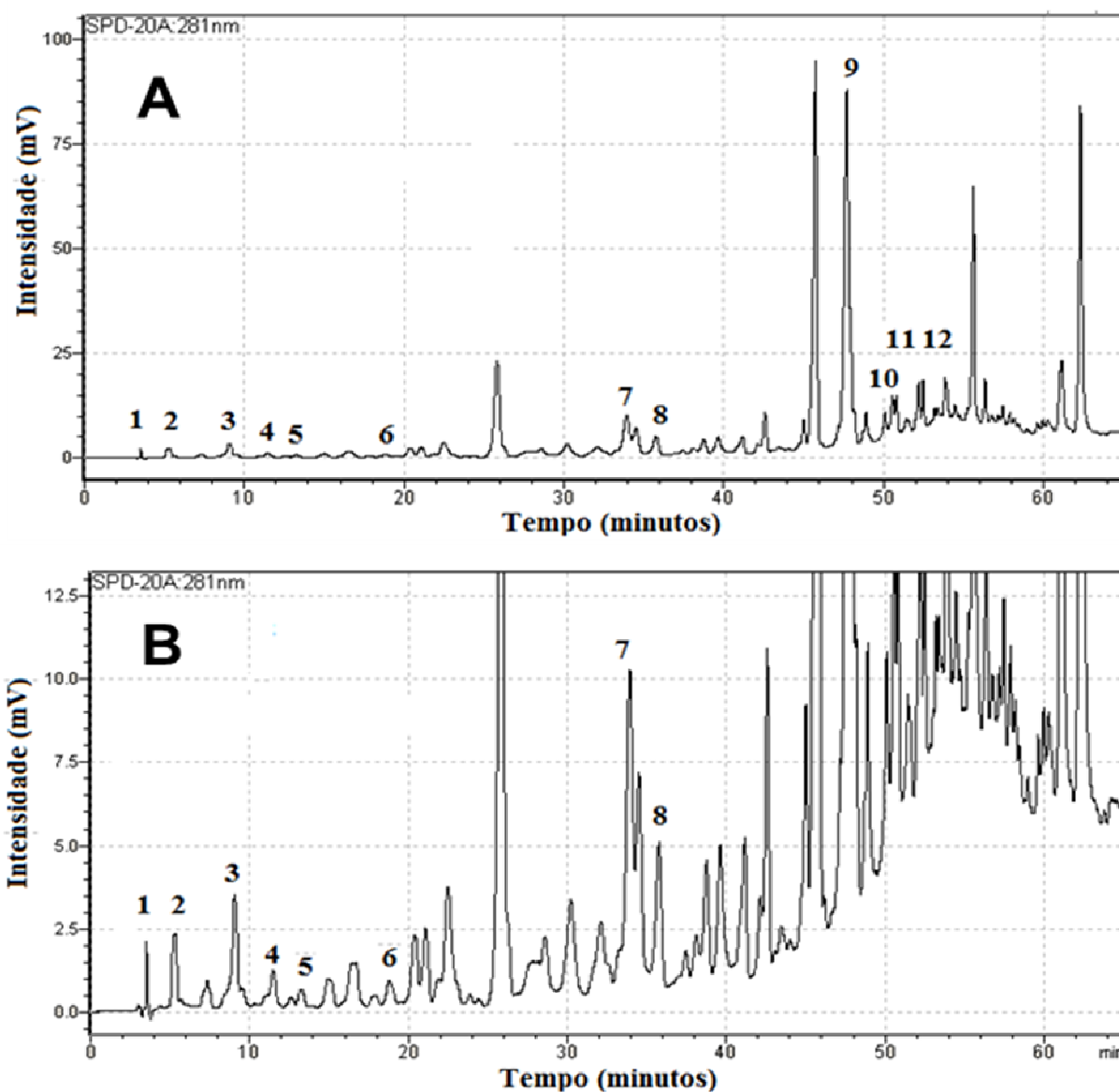
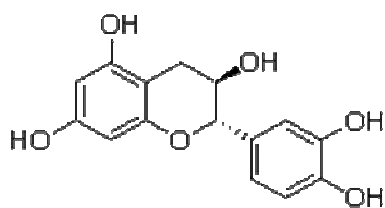
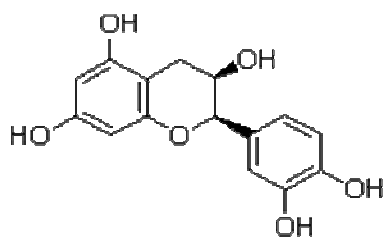


Figura 2 – (A) Perfil cromatográfico do extrato bruto de própolis vermelha na concentração de 1 mg/mL. (1) catequina, (2) epicatequina, (3) ácido caféico, (4) ácido p-coumárico, (5) ácido ferúlico, (6) rutina, (7) quercetina, (8) luteolina, (9) formononetina, (10) pinocembrina, (11) biochanina A e (12) crisina. (B) Perfil cromatográfico ampliado do extrato bruto de própolis vermelha. (1) catequina, (2) epicatequina, (3) ácido caféico, (4) ácido p-coumárico, (5) ácido ferúlico, (6) rutina, (7) quercetina, (8) luteolina.

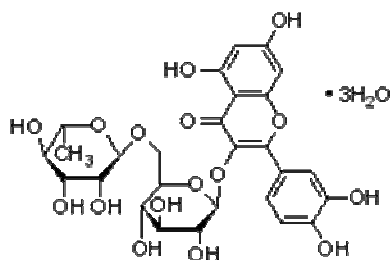
A Figura 3, a seguir, mostra as estruturas químicas de flavonóides identificados na própolis vermelha de Alagoas.



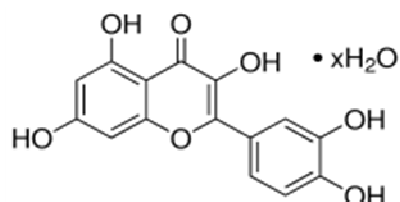
Catequina



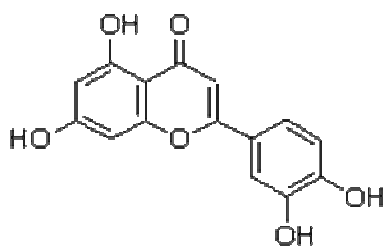
Epicatequina



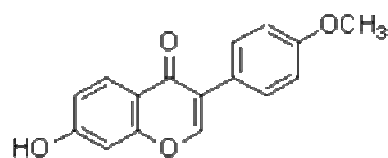
Rutina



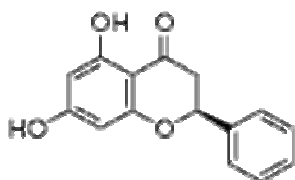
Quercetina



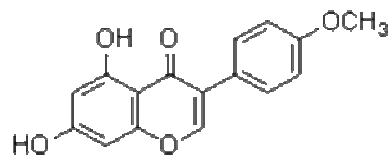
Luteolina



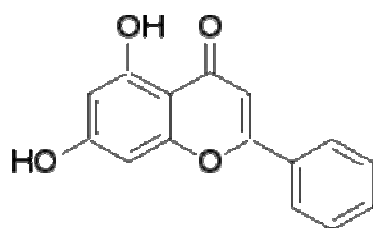
Formononetina



Pinocembrina



Bichanina A



Crisina

Figura 3 – Flavonóides identificados na própolis vermelha de Alagoas, região de Marechal Deodoro.

B - Atividade antimicrobiana da própolis vermelha.

I. Atividade antimicrobiana da fração clorofórmica de própolis vermelha.

Avaliando a atividade microbiológica da fração clorofórmica observamos que a própolis vermelha apresentou CIM de 4 mg/mL para *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853 e *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente produtora de Metalobetalactamase; já para *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 a CIM foi 1 mg/mL. A atividade antibacteriana da própolis é bem mais evidente frente a bactérias Gram positivas e mais limitada contra bactérias Gram negativas, como foi apresentado na Tabela 2. Ainda não há uma explicação para isso, mas acredita-se que a resposta possa está na parede celular das Gram negativas que é quimicamente mais complexa e possui um teor lipídico maior, o que poderia explicar essa maior resistência (LUSTOSA *et al.*, 2008).

Entre os principais microrganismos causadores de infecções nosocomiais e que apresentam importantes mecanismos de resistência destacam-se as *Pseudomonas aeruginosa*. Um importante mecanismo de resistência encontrado em cepas desta bactéria é a produção de metalobetalactamases (MBLs). Trata-se de enzima capaz de hidrolisar o anel betalactâmico por meio de hidroxilação irreversível do grupo amida, causando inativação de antimicrobianos que incluem penicilinas, cefalosporinas e carbapenens, excetuando-se o aztreonam. Atuam também sobre os inibidores de serinobetalactamases, como ácido clavulânico, sulbactama e tazobactama. A presença dessa forma de resistência restringe o tratamento apenas a polimixina B ou colistina (ZANOL *et al.*; 2010).

Tabela 2 – Atividade antimicrobiana da fração clorofórmica de própolis vermelha.

Concentração	BAC 1	BAC 2	BAC3	BAC 4	BAC 5
10,0 mg/ mL	N	N	N	N	N
8,0 mg/ mL	N	N	N	N	N
6,0 mg/ mL	N	N	N	N	N
4,0 mg/ mL	N	N	C	C	C
2,0 mg/ mL	N	N	C	C	C
1,0 mg/ mL	C	C	C	C	C

N – Não apresentou crescimento C – Apresentou crescimento

II. Atividade antimicrobiana das sub-frações de própolis vermelha

Para as sub-frações de própolis foram analisadas quatro concentrações diferentes. A sub-fração 17/21 na concentração de 0,96 mg/mL inibiu o crescimento de todos os microrganismos e na concentração de 0,24 mg/mL não inibiu o crescimento de nenhum microrganismos, exceto *Staphylococcus aureus*. Resultado semelhante foi observado para a sub-fração 40/54, contudo a espécie de *Enterococcus faecalis* também cresceu na concentração de 0,24 mg/mL, resultado também observado para a sub-fração 58/62. A sub-fração 87/95 na concentração de 1 mg/mL também inibiu o crescimento de todos os microrganismos, mas na concentração de 0,44 mg/mL todos os microrganismos cresceram (Tabela 3).

Embora a sub-fração 58/62 tenha apresentado uma maior quantidade de substâncias, ela não apresentou atividade antimicrobiana superior frente aos microrganismos Gram negativos. Isso confirma que o agente responsável por essa ação seria a substância em comum presente nas quatro sub-frações analisadas, o que nos leva a crer que seria a substância cujo pico é apresentado na Figura 4 D. Quanto à atividade frente aos microrganismos Gram positivos, as sub-frações 40/54 e 58/62 mostram uma melhor atividade. O número maior de substâncias nessas sub-frações aponta que outros compostos estariam associados à ação frente aos Gram positivos (Figura 4 e Tabela 3).

As amostras tropicais de própolis, especialmente as encontradas no litoral do nordeste brasileiro, têm mostrado diferenças significantes na composição química em relação a outros tipos de própolis, acreditando-se que tais moléculas possam revelar

atividades biológicas ainda não conhecidas. A composição química é bastante complexa e variada, contudo o grupo dos flavonoides chama a atenção por estarem relacionados com as atividades anti-oxidante, antiviral e antimicrobiana (LUSTOSA *et al.*, 2008). Os compostos majoritários descritos na Figura 4 podem pertencer a esse grupo, o que explicaria o poder antimicrobiano dessas sub-frações, todavia mais estudos serão necessários para que se possa fazer a identificação desses compostos.

Tabela 3 – Atividade antimicrobiana das sub-frações clorofórmicas de própolis vermelha.

Concentração	BAC 1	BAC 2	BAC3	BAC 4	BAC 5
Fração 17/21 – 0,96 mg/mL	N	N	N	N	N
Fração 17/21 – 0,68 mg/mL	N	N	C	C	C
Fração 17/21 – 0,48 mg/mL	N	N	C	C	C
Fração 17/21 – 0,24 mg/mL	N	C	C	C	C
Fração 40/54 – 0,97 mg/mL	N	N	N	N	N
Fração 40/54– 0,69 mg/mL	N	N	C	C	C
Fração 40/54– 0,48 mg/mL	N	N	C	C	C
Fração 40/54– 0,24 mg/mL	N	N	C	C	C
Fração 58/62 – 0,98 mg/mL	N	N	N	N	N
Fração 58/62 – 0,70 mg/mL	N	N	C	C	C
Fração 58/62 – 0,49 mg/mL	N	N	C	C	C
Fração 58/62 – 0,25 mg/mL	N	N	C	C	C
Fração 87/95 – 1,00 mg/mL	N	N	N	N	N
Fração 87/95– 0,88 mg/mL	N	C	C	C	C
Fração 87/95– 0,63 mg/mL	N	C	C	C	C
Fração 87/95– 0,44 mg/mL	C	C	C	C	C

N – Não apresentou crescimento C – Apresentou crescimento

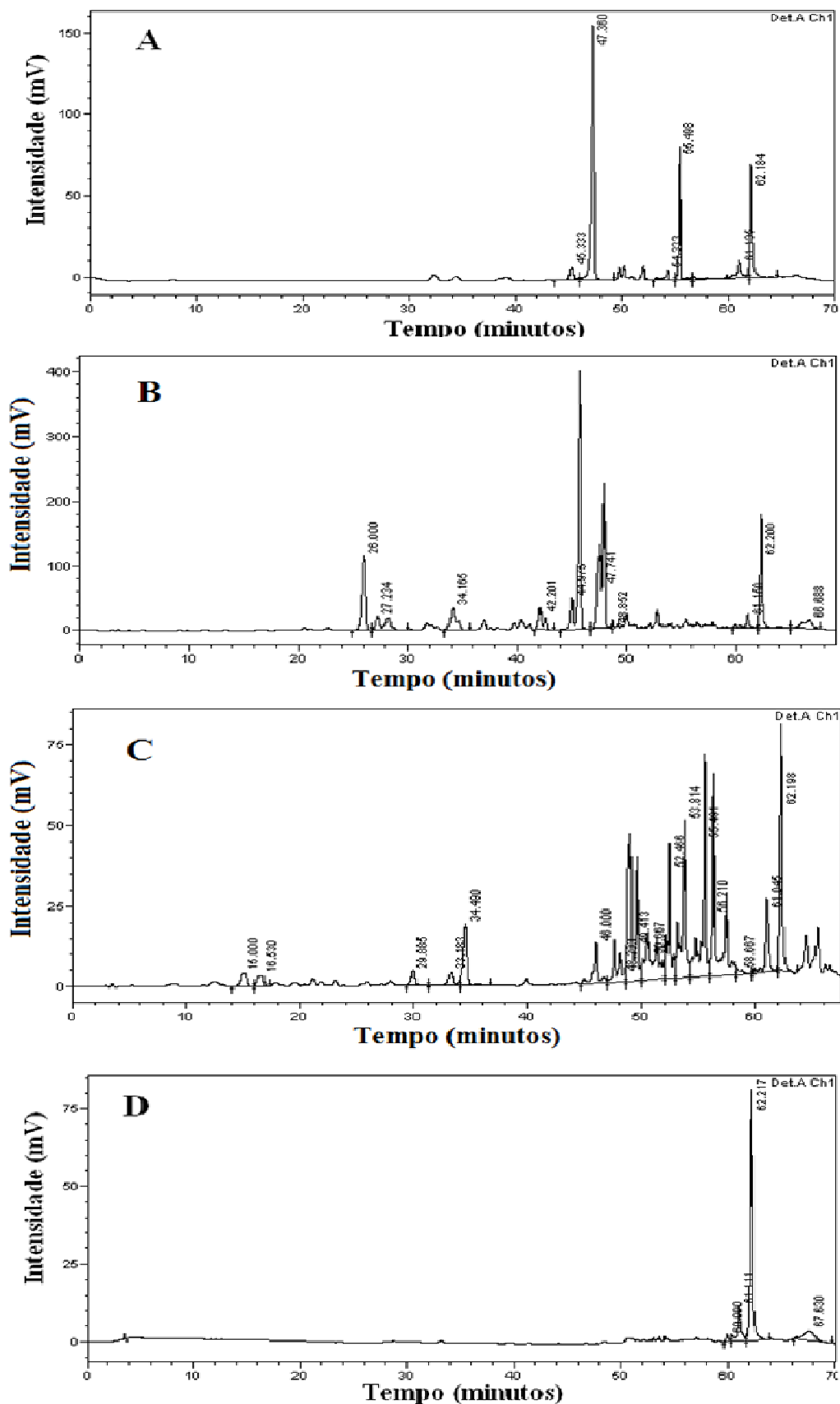


Figura 4 – Cromatogramas das sub-frações clorofórmicas de própolis vermelha. Cromatogramas: **(A)** subfração 17/21, **(B)** 40/54, **(C)** 58/62 e **(D)** 87/95.

3.2 - Extratos Secos de Própolis Vermelha (ESPV)

Os extratos secos de própolis apresentaram um rendimento total de: ESPV A (25,5%), ESPV B (32,3%), ESPV C (47,70%) e ESPV D (57,36%). Os extratos secos obtidos pelo método de emulsificação apresentaram melhor rendimento em relação ao método de dispersão em nossos experimentos. Apesar disso, o ESPV C e D apresentaram menor densidade que ESPV A e B. Esse fato foi observado quando o ESPV A e D foi utilizado na compactação para confecção de cápsulas para estudos de dissolução. De acordo com Cao *et al.* (2000), o aumento no conteúdo de sólidos, eleva a viscosidade, resultando em pós com maior densidade, pois a influência do teor de sólidos no material de partida é refletida no tamanho de partícula e na densidade do produto final.

A - Caracterização dos ESPV

I. Por CLAE

Os quatro marcadores da própolis, que mostram uma resposta adequada com base no sinal do detector, foram utilizados para avaliar a uniformidade de conteúdo para extrair corretamente incorporados ao extrato seco de própolis vermelha mantendo a mesma quantidade adicionada teoricamente. A determinação da uniformidade de conteúdo pode nos dar ainda outra informação valiosa, como se há incompatibilidade entre os adjuvantes utilizados na preparação, diminuição da estabilidade do extrato de própolis na presença de adjuvantes.

A uniformidade de conteúdo para ESPV B e C demonstrou estar fora dos limites estabelecidos (entre 85 e 115%) pelos códigos oficiais da farmacopéia brasileira. Apenas ESPV A e D apresentaram valores de uniformidade de conteúdo, dentro dos limites para os quatro principais compostos analisados (Tabela 4).

Tabela 4 – Determinação do teor de 4 marcadores nos ESPV.

Marcadores da própolis vermelha ensaiados				
Extrato Seco	Major 1	Major 2	Major 3	Major 4
ESPV A	100.52%	95.82%	92.62%	91.41%
ESPV B	68.16%	68.78%	61.76%	69.54%
ESPV C	130.07%	131.29%	118.27%	125.07%
ESPV D	102.89%	104.85%	94.71%	108.36%

A Tabela 4 mostra os valores obtidos no conteúdo do teste. Variações superiores ao limite estabelecido para ESPV B e C podem ser atribuídas à incorporação incompleta do extrato em adjuvante preparação B e problemas como a precipitação do adjuvante durante a preparação dos extratos C em discussão. Outras variações na uniformidade do conteúdo podem estar relacionadas à baixa solubilidade desses ESPV ao sistema de solventes metanol: água (1:1, v / v) utilizada no ensaio de uniformidade de conteúdo. A melhor solubilidade dos flavonóides ocorreu quando foi utilizado tampão fosfato equimolar pH 7,4.

O método cromatográfico mostrou robustez para analisar o extrato bruto, frações do extrato de própolis vermelha (clorofórmio) e extratos secos. Analisando os cromatogramas da fração clorofórmica de própolis e os ESPV A e B observamos que os compostos majoritários presentes na fração clorofórmica também estão presentes nos extratos secos de própolis, o que mostra que o processo de secagem não interferiu na composição química da própolis (Figura 5).

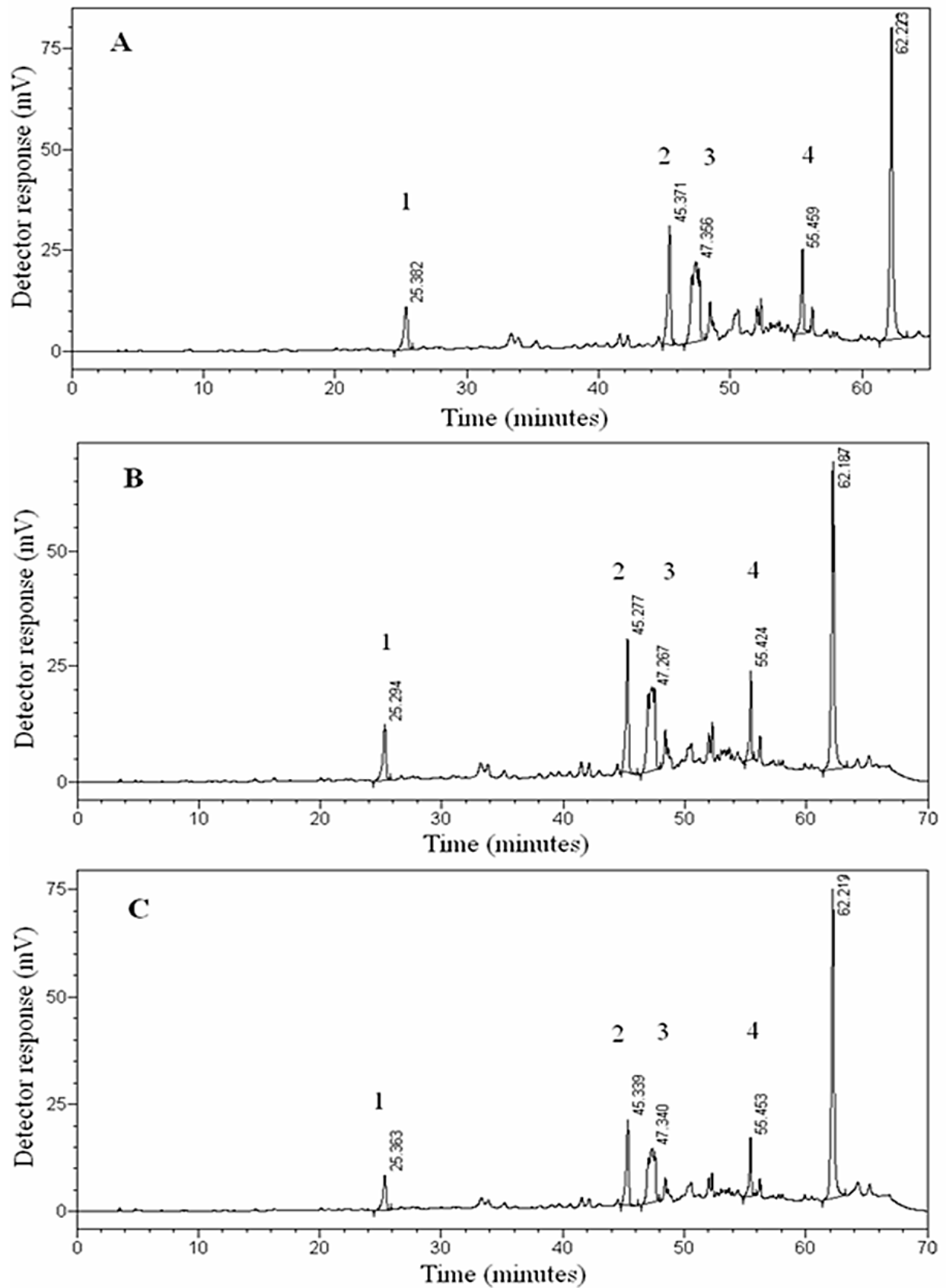


Figura 5 - Cromatogramas da fração clorofórmica de própolis vermelha em detector (λ_{max} . 281nm). (A) tintura de própolis na concentração de 200 μg / mL, (B) O ESPV A na concentração de 200 μg / mL e (C) ESPV B a uma concentração de 200 μg / mL.

II. Por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Os extratos secos foram submetidos à análise da MEV e as fotomicrografias revelaram uma superfície irregular para ESPV B, uma superfície esférica, mas não uniformes para ESPV C. Apenas amido como adjuvante não foi suficiente para promover uma integração adequada da tintura de própolis vermelha em ESPV B, pois observamos partículas grandes, irregulares e não uniformes. Estas partículas estavam de forma aglomerada (Figura 6).

Essas micropartículas mostraram-se esféricas, mas devido ao uso apenas da gelatina como coadjuvante a micropartículas apresentaram uma superfície esférica lisa, elas não eram uniformes, eram frágeis (quebradiças) em forma de aglomerados. Apesar da ESPV C apresentar pequenas partículas, superfície esférica lisa, elas não eram uniformes, eram frágeis em forma de aglomerados. Essas partículas mostraram-se esféricas, mas devido ao uso da gelatina como coadjuvante, foi necessária a presença de outros adjuvantes para aumentar a consistência da parede das micropartículas.

Os ESPV A e D apresentaram pequenas partículas com superfície muito lisa e formas menos aglomeradas. Observou-se uma parede superficial, com orifícios para ESPV D, enquanto que ESPV A apresentou uma superfície muito lisa e não quebradiça (Figura 6). Estes ESPV apresentaram a condição ideal para micropartículas, formando esferonização uniforme, micropartículas muito lisas, não frágeis e não aglomeradas. Isso foi possível devido à combinação de amido, gelatina e dióxido de silício coloidal, em proporções diferentes. A presença de amido combinado com a gelatina era necessária para promover a rigidez da parede das micropartículas. Presença de amido foi necessária, pois retém água na estrutura de enchimento de micropartículas garantindo estrutura interna vazia, evitando a fratura das micropartículas. ESPV A e D foram submetidos ao teste de dissolução.

O método de dispersão e emulsificação para a preparação dos extratos secos de própolis vermelha interferiu no tamanho e na forma das micropartículas, independentemente dos rendimentos obtidos. Sob o aspecto de produto intermediário, produtos secos por aspersão são valorizados devido à sua elevada estabilidade química e microbiológica, e maior facilidade de transporte e de armazenamento, embora, por outro lado, a elevada carga de constituintes vegetais acarretam problemas

de fluxo e causam aumento da superfície específica, favorecendo um comportamento desfavorável frente à umidade ambiental o que pode acarretar partículas sem uniformidade (SOARES *et al.*, 2005).

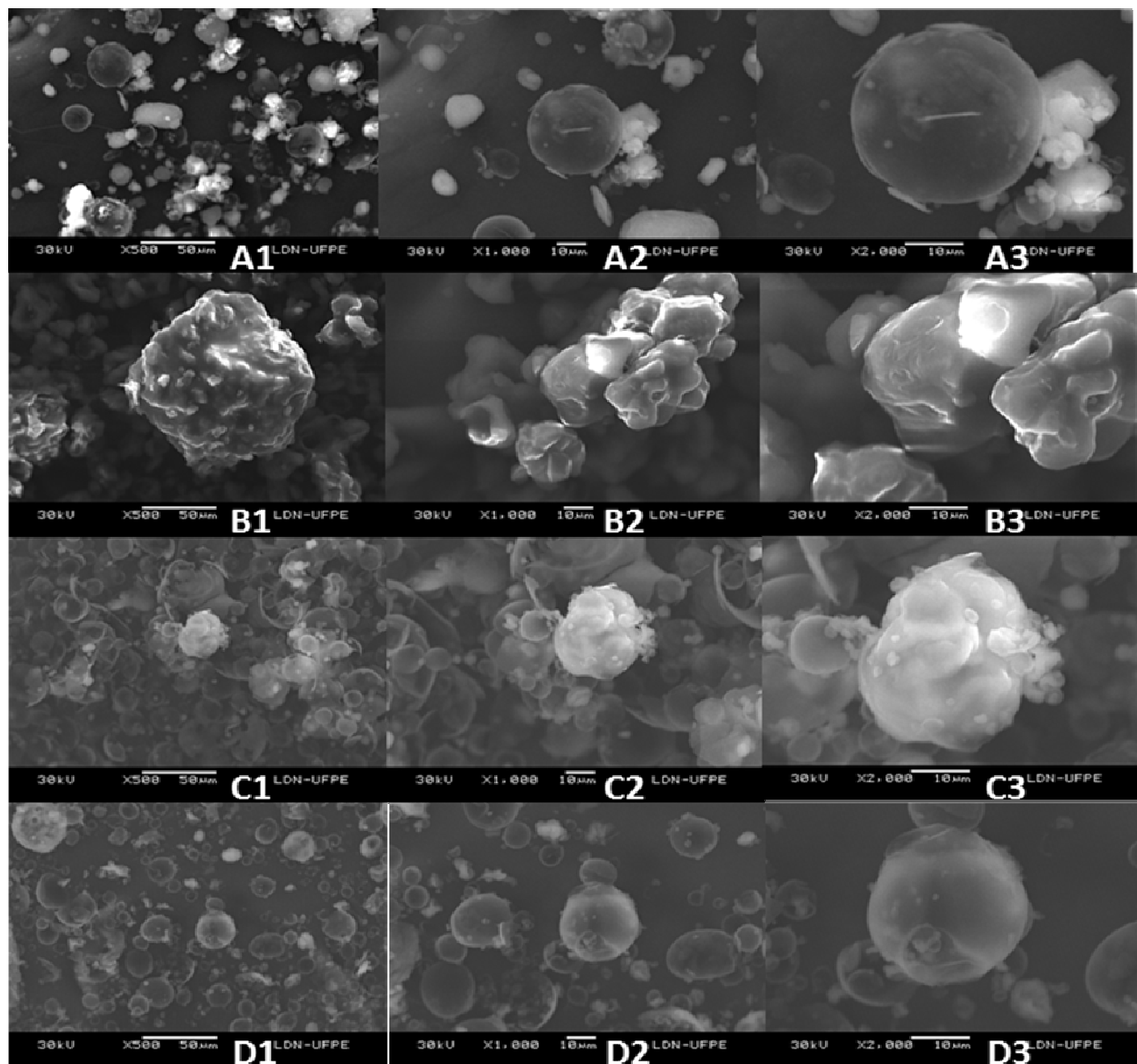


Figura 6 – Fotomicroscopia de Varredura Eletrônica dos Extratos Secos A, B, C e D da própolis vermelha de Alagoas. Fotomicrografias A1, B1, C1 e D1 ampliação de 500 vezes(escala 50 μ m); A2, B2, C2 e D2 ampliação de 1000 vezes(escala 10 μ m) e A3, B3, C3 e D3 ampliação de 2000 vezes(escala 10 μ m).

B - Atividade antimicrobiana do ESPV

A indústria de alimentos, para manter-se competitiva, é desafiada a desenvolver produtos voltados para as necessidades dos consumidores que buscam por produtos que associem atratividade ao paladar ao perfil nutricional equilibrado. O processamento de alimentos pode degradar os compostos funcionais, naturalmente presentes ou adicionados, prejudicando sua biodisponibilidade no organismo e, além disso, pode mudar características do produto como textura, sabor, cor, etc.. Uma forma de minimizar esses efeitos é a microencapsulação que é um processo moderno em que envolve a proteção de um composto dentro uma película que pode ser um polímero, como, por exemplo, a gelatina. Esse processo é capaz de proteger a substância das ações degradantes dos gases da atmosfera como a ação do oxigênio, no processo de oxidação e formação de radicais livres (HERNÁNDEZ, 2010).

Embora a técnica de secagem por Spray-Dryer envolva altas temperaturas, o processo de microencapsulação da própolis vermelha mostrou-se seguro no que diz respeito à preservação de biocomponentes com ação antimicrobiana. Quando se analisou os ESPV observou-se que todas as formulações inibiram o crescimento microbiano na concentração de 1,0 mg/mL e 0,6 mg/mL equivalentes de própolis vermelha. Se compararmos a atividade biológica antes do processamento, na tintura de própolis, e depois da secagem, microencapsulação por Spray-Dryer, notamos que o referido processo preservou os mesmos índices de atividade antimicrobiana no pó de própolis (Tabela 5).

Tabela 5 – Atividade antimicrobiana do pó de própolis vermelha obtido a partir das formulações A, B, C, e D.

Concentração de própolis no pó	BAC 1	BAC 2	BAC3	BAC 4	BAC 5
10,0 mg / mL	N	N	N	N	N
6,0 mg/ mL	N	N	N	N	N

N – Não apresentou crescimento C – Apresentou crescimento

3.3 - Dissolução

I - Curva de calibração

O método de cromatografia, com sistema de gradiente mostrou-se versátil para a análise quantitativa de quatro marcadores de própolis. As substâncias majoritárias 1, 2, 3 (formononetina) e 4 apresentaram uma boa correlação entre o sinal medido na área e na faixa de concentração testada. Os marcadores **1** ($y = 1123.1x - 3779.9$, $R^2 = 0.9997$), **2** ($y = 2309x - 8014.3$, $R^2 = 0.9998$), **3 (formononetina)** ($y = 4446.1x - 34211$, $R^2 = 0.9998$) e **4** ($y = 1215.3x - 10,429$, $R^2 = 0.9995$) mostraram inclinação e coeficiente de correlação adequados para ensaios quantitativos, mas a substância **5** ($y = 328.72x + 1.106$, $R^2 = 1,000$) não mostrou linearidade adequada para ensaios quantitativos, quando avaliado por sua inclinação (Figura 7).

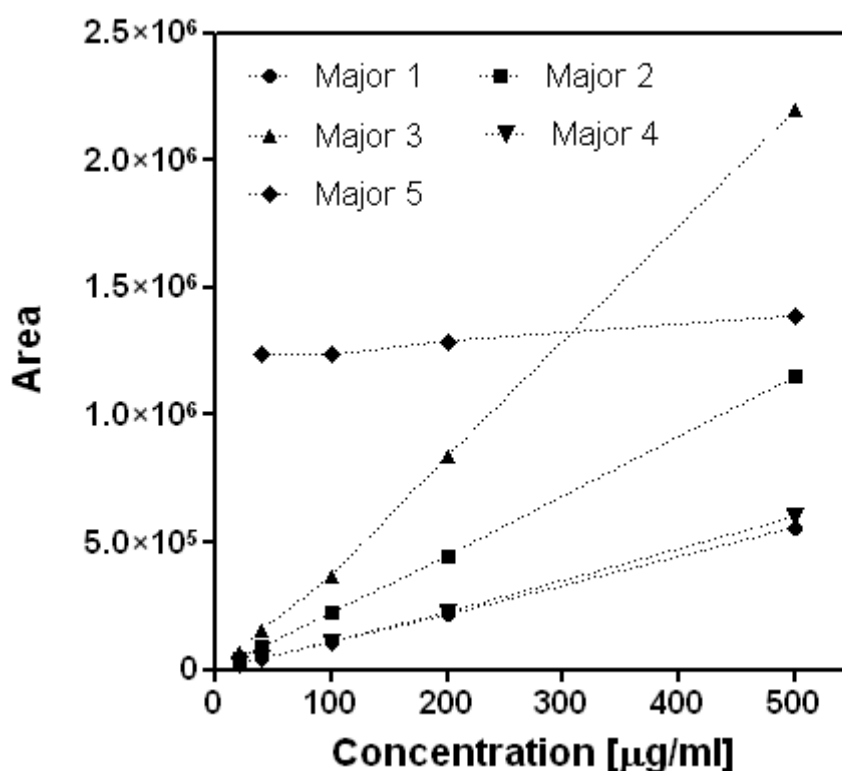


Figura 7 – Curva de calibração de 5 marcadores majoritários da própolis vermelha.

Não foi possível determinar o quinto marcador, com tempo de retenção de 62,2 minutos (Figura 2), devido à grande variação nos valores obtidos durante a integração

da área. O marcador **5** apresentou falta de linearidade, principalmente devido a dois motivos: o primeiro, o comprimento de onda não era o ideal. Esta substância não apresentou comprimento de onda máximo em 281 nm; o segundo, poderia ser devido a foto-instabilidade desta substância, o que foi observado durante os experimentos. Maiores cuidados no laboratório serão necessários para estabelecer o POP (Procedimento Operacional Padrão) para determinação de validação para esta substância em particular. Estudos adicionais deverão ser realizados para identificar a substância.

II - Precisão do método cromatográfico

Quatro marcadores de própolis vermelha apresentaram precisão durante o método de dissolução e a variabilidade não foi maior que 10,0%. O marcador **5** não apresentou precisão adequada com variação superior a 20,0% e não é adequado para estudos de quantificação de dissolução (Tabela 6). Os parâmetros de validação da precisão e linearidade foram importantes para excluir o marcador **5** da uniformidade de conteúdo e determinação dissolução.

Tabela 6 - Precisão dos marcadores de própolis vermelha.

Amostras QC	Precisão (média ± DP; DPR%)		
	pH 1.0	pH 6.8	pH 7.4
Major 1			
QC 1	125333 ± 5522.9; 4.4	122674 ± 12057.6; 9.8	128417.0 ± 1162.1; 0.9
QC 2	-	202384 ± 1053.5; 0.5	195701.5 ± 579.1; 0.3
Major 2			
QC 1	220199.7 ± 14917.4; 6.7	240444 ± 2429.6; 1.0	235728.0 ± 6859.0; 2.9
QC 2	-	370599.7 ± 1026.2; 0.3	352602.0 ± 17500.9; 5.0
Formononetina			
QC 1	380000 ± 12653.1; 3.3	409293 ± 1770.6; 0.4	399155.0 ± 3945.6; 1.0
QC 2	-	596356.0 ± 10432.5; 1.7	596417.0 ± 24731.8; 4.1
Major 4			
QC 1	92090.3 ± 13151.8; 14.3	77941.5 ± 5701.4; 7.3	72281.0 ± 2256.4; 3.1
QC 2	-	118467.0 ± 8785.0; 7.4	152290.5 ± 10925.5; 7.2
Major 5			
QC 1	337427.3 ± 174243.9; 51.6	277989.0 ± 57861.1; 20.8	302499.3 ± 713083; 23.6
QC 2	-	492445.7 ± 435645; 88.5	396144.0 ± 238198.8; 60.1

QC 1= controle de qualidade baixo, 100.0 µg/mL. QC 2= Controle de qualidade médio, 200.0 µg/mL. Cada valor é expresso com resultado ± DP de duas determinações. DPR = Desvio Padrão Relativo.

III - Perfil de dissolução dos flavonoides nos ESPV

A solubilidade de um composto bioativo é parâmetro chave nos estudos de pré-formulação de um produto, como por exemplo, um nutracêutico. Ela é determinada através da substância adicionada ao meio, agitação da suspensão durante um determinado período, filtração ou centrifugação da suspensão e medição da quantidade de composto ativo dissolvida. Ela irá determinar se a formulação em estudo será capaz de liberar os componentes ativos (ROY *et al.*, 2001).

Com base nos resultados da análise em MEV e uniformidade de conteúdo para os quatro marcadores da própolis somente os extratos secos A e D foram selecionados para o teste de dissolução. Os extratos secos foram avaliados pela solubilização de marcadores 1, 2, 3 e 4 de própolis vermelha em três faixas de pH (Figura 8).

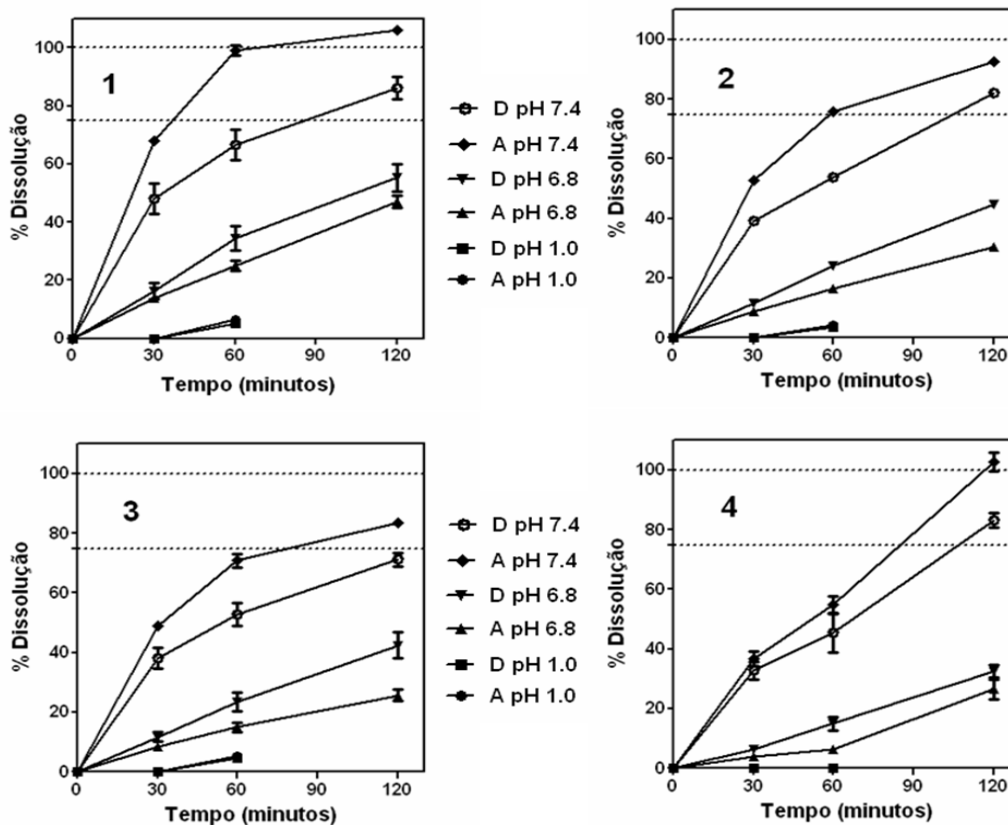


Figura 8 - Perfis de dissolução de quatro componentes principais presentes em ESPV A e D, (gráficos 1, 2, 3 e 4). Os gráficos mostram as três condições testadas, a pH 1,0, pH 6,8 e pH 7,4.

Todos os marcadores tiveram baixa dissolução no intervalo de 1 hora em ácido clorídrico 0,1 N. Os valores da dissolução dos marcadores 1 ($6.41\% \pm 0.8$), ($5.30\% \pm$

0.2), **2** (4.40% ± 0.8), (3.53% ± 0.3), **formononetina** (21.5% ± 0.7), (4.50% ± 0.1) não ultrapassaram os 10% de dissolução nos extratos secos A e D, respectivamente. O marcador **4** não foi dissolvido em meio ácido. A dissolução baixa dos marcadores no momento de uma hora foi importante para estabelecer o tempo do perfil de dissolução de duas horas.

Avaliou-se também o período de tempo para ensaio de dissolução para produtos apiterápicos. A baixa dissolução dos marcadores no período de uma hora foi ponto importante para estabelecer o tempo do perfil de dissolução de duas horas.

Usando tampão equimolar de fosfato pH 6,8 e na presença de lauril sulfato de sódio 0,01%, observou-se que os marcadores da própolis tiveram um aumento significativo na porcentagem de dissolução. Os valores de dissolução do marcador **1** (46,2% ± 4,9) (55,3% ± 8,2), **2** (29,5% ± 4,1) (44,8% ± 7,5), **formononetina** (25,0% ± 4,5) (42,5% ± 7,4) e **4** (24,0% ± 5,4) (32,5 ± 3,7%), variaram entre 24,0% e 55,3% para as formulações A e D, respectivamente, com 120 minutos de tempo de dissolução. Este fato confirma a hipótese de que as substâncias em questão, os flavonóides, são “ácidos fracos” e terão melhor ionização em meio alcalino (Figura 3).

No último experimento de dissolução, que foi conduzido em pH 7,4, usando tampão fosfato de sódio equimolar + 0,01% de lauril sulfato, observou-se um aumento na taxa de dissolução para o marcador **1** (105,6 ± 2,0), (86,2 ± 6,6); marcador **2** (92,5 ± 1,2), (82,0 ± 4,0); **formononetina** (83,7 ± 1,0), (71,2 ± 4,2) e marcador **4** (102,8 ± 5,3), (83,2 ± 4,3) para as formulações A e D, respectivamente.

A esta formulação foi adicionado os desintegrantes, carboximetilcelulose de sódio em ESPV A e glicolato de amido sódico em ESPV D, respectivamente, utilizando o mesmo percentual (8,70%) na composição destas formulações. Estes adjuvantes têm desempenhado um papel importante no processo de dissolução de flavonóides, pois promoveram o aumento da disponibilidade desses marcadores no meio de dissolução e, conseqüentemente, aumentando a taxa de dissolução. Pode-se observar que a carboximetilcelulose adjuvante teve um melhor desempenho na formulação em relação ao glicolato amido de sódio.

A partir dos dados apresentados, podemos estabelecer uma especificação com um mínimo de dissolução de 75% dos extratos secos de própolis com velocidade de

rotação de 100 rpm, meio de dissolução (tampão fosfato pH 7,4 e lauril sulfato de sódio 0,01%) no intervalo de tempo de 120 minutos.

4 – Conclusão

Concluimos que através do método de CLAE desenvolvido foi possível identificar os flavonóides Biochanina A, quercetina, luteolina, pinocembrina, catequina, epicatequina e rutina, bem como ácidos fenólicos, ácido p-coumárico, ácido caféico e ácido ferúlico na própolis vermelha. O isoflavonóide formononetina foi determinado como um dos marcadores principais para a própolis vermelha de Alagoas.

Quanto à atividade antimicrobiana, a própolis vermelha apresentou uma excelente ação, inclusive frente a *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente produtora de Metalobetalactamase. Os compostos associados a essa atividade mantiveram-se preservados, mesmo após o processamento para a produção dos ESPV, o que torna essa técnica perfeitamente viável para a produção de micropartículas com bioatividade.

os extratos secos obtidos pelo método de emulsificação foram os mais adequados para a utilização em preparações nutracêuticas por apresentarem melhor rendimento e características tecnológicas de pó, uniforme, liso com micropartículas não-aglomeradas.

Os ensaios de dissolução mostraram ser eficientes para avaliar as características de solubilidade dos principais marcadores da própolis vermelha em diferentes condições de pH que simularam os fluidos do trato gastrointestinal, sendo o pH próximo da neutralidade onde houve melhor solubilização dos compostos.

5 – Agradecimentos

Agradecimentos ao Laboratório Industrial Farmacêutico de Alagoas (LIFAL) pela concessão das análises em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência e ensaios de dissolução, à Universidade Estadual de Ciências da Saúde de Alagoas (UNCISAL) na pessoa do Prof. Dr. Zenaldo Porfírio (UFAL/UNCISAL) pela concessão das análises microbiológicas e obtenção dos extratos Spray-Dryer da própolis vermelha, ao Prof. Dr. Irinaldo Diniz Basílio Júnior (UFAL) pela co-orientação e análises MEV.

6 – Referências

- ALENCAR, S. M.; OLDONI, T. L. C.; CASTRO, M. L.; CABRAL, I. S. R.; COSTANETO, C. M.; CURY, J. A.; ROSALEN, P. L.; IKEGAKI, M. Chemical composition and biological activity of a new type of Brazilian propolis: Red propolis. *Journal of Ethnopharmacology* 113, 278-283, 2007.
- ANDRADE, P., FERRERES, F.; GIL, M. I., TOMÁS-BARBERÁN, F. A. **Food Chemistry**, **60** (1): 79-84, 1997.
- ARAGÃO, C.F.S.; MACÊDO, R.O.; FILHO, J.M.B. **J. Therm Anal Calorim**, **V.64**, n.1, p. 185-191, 2001.
- BANKOVA, V.S.; POPOV, S.S.; MAREKOV, N.L. **Journal of Natural Products**, **46** (4): 471-474, 1983.
- BANSKOTA, A. H., TEZUKA, Y., KADOTA, S. **Recent Progress in Pharmacological Research of Propolis, Phytoterapy Research**, **15**(1): 561-571, 2001.
- BOYANOVA, L., DEREJIAN, S., KAUMANOVA, R., KATSAROV, N., GERGOVA, G., MITOV, I., NIKOLOV, I., KRASTEV, Z. **Journal of Medical Microbiology**, **52**(5): 417-419, 2003.
- CAO XQ, VASSEN R, SCHWARTZ S, JUNGEN W, TIETZ F, STÖEVER D. **J Eur Ceram Soc** **20**: 2433-2439, 2000.
- CASTALDO, S.; CAPASSO, F. **Fitoterapia**, **73**: 51-56, 2002.
- CONCEIÇÃO, M. M.; JR, V. J. F.; SOUZA, A. G.; NASCIMENTO, T. G.; ARAGÃO, C. F. S. AND MACÊDO, R. O. **Thermochimica Acta**, **433**: 175-181, 2005.
- HERNÁNDEZ, O. D. L. **Rev Cubana Farm**, **44** (3): 381-389, 2010.
- KUMAZAWA, S.; HAMASAKA, T.; NAKAYAMA, T. **Food Chemistry**, **84** (3): 329-39, 2004.
- LUSTOSA, S. R.; GALINDO, A. B.; NUNES, L. C. C.; RANDAU, K. P.; NETO, P. J.R. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, **18**(3): 447-454, 2008.
- MACEDO, R. O.; NASCIMENTO, T. G. **Thermochima Acta**, **392**: 85-92, 2002.

MACEDO, R.O. DO NASCIMENTO, T.G.; BARRETO GOMES, A. P. J. **Thermal Analysis and Calorimetry**, **59** (3): 657-661, 2000.

MACEDO, R.O.; BARRETO GOMES, A.P.; DE SOUZA, F.S. J. **Thermal Analysis and Calorimetry**, **64** (2): 739-743, 2001b.

MACÊDO, R.O.; DO NASCIMENTO, T.G.; VERAS, J.W.E. **J. Thermal Analysis and Calorimetry**, **67** (2): 483-489, 2002a.

MACÊDO, R.O.; DO NASCIMENTO, T.G.; VERAS, J.W.E. **J. Thermal Analysis and Calorimetry**, **64** (2): 757-763, 2001a.

MACÊDO, R.O.; FILHO, J.M.B.; DA COSTA, E.M.; DO NASCIMENTO, T.G. **Thermochima Acta**, **392**: 79-84, 2002b.

MARCUCCI, M.C.; WOISKY, R.G.; SALATINO, A. Disponível em: <www.roberg.com.br/PaginaTrabalhoCientifico06.htm>. Acesso em: 20 de outubro de 2010.

MARQUELE, F.D.; STRACIERI, K.M.; FONSECA, M.J.V.; FREITAS, L.A.P.; **Pharmazie**, **61** (4): 325-330, 2006.

MATSUNO, T.; MATSUMOTO, Y.; SAITO, M.; MORIKAWA, J. **Journal of Biosciences**, **52** (9-10): 702-704, 1997.

MITAMURA, T.; MATSUNO, T.; SAKAMOTO, S.; MAEMURA, M.; KUDO, H.; SUZUKI, S.; KUWA, K.; YOSHIMURA, S.; SASSA, S.; NAKAYAMA, T.; NAGASAWA, H. **Anticancer Research**, **16** (5): 2669-2672, 1996.

MORENO, M.I.N.; ISLA, M.I., SAMPIETRO, A.R.; VATTUONE, M.A. Comparison of the free radical scavenging activity of propolis from several regions of Argentina. *Journal of Ethnopharmacology*, **71**(1-2): 109-14, 2000.

NASCIMENTO, T. G.; BASÍLIO-JÚNIOR, I.D.; DORNELAS, C. B.; MACÊDO, R. O.; MOURA, E. A.; BARBOSA, V. B.; ROCHA V. N.; NOVAK, C. **Journal Thermal Analysis and Calorimetry**, **102**: 269–275, 2010.

NASCIMENTO, T. G.; OLIVEIRA, E. J.; MACÊDO, R. O. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, **37**: 777-783, 2005.

PARK, Y.K.; FUKUDA, I.; ASHIDA H.; NISHIUMI, S.; YOSHIDA, K.; DAUGSCH, A.; SATO, H.H.; PASTORE, G.M. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, **53**(26): 10306-9, 2005.

PICCINELLI, A. L.; FERNANDEZ, M. C.; CUESTA-RUBIO, O.; HERNAÁNDEZ, I. M.; DE SIMONE, F.; RASTRELLI, L. **J. Agric. Food Chem.** **53**: 9010-9016, 2005.

PIETTA, P.; GARDANA, C.; SCAGLIANTI, M.; SIMONETTI, P. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, **45**: 390-399, 2007.

ROCHA, F. R. P.; TEIXEIRA, L. S. G.. **Quim. Nova**, **Vol. 27**, No. 5, 807-812, 2004

ROSALEN, P.L.; CASTRO, M. L.; CURY, J.A. **Quimica Nova**, **30** (7): 1512-1517, 2007.

ROY, D., DUCHER, F., LAUMAIN, A., LEGENDRE, J. Y. **Drug Dev. Ind. Pharm.**, **v. 27**, n. 1, p. 107-109, 2001..

SFORCIN, J.M.; FERNANDES, A.JR.; LOPES, C.A.; BANKOVA, V.; FUNARI, S.R. **Journal of Ethnopharmacology**, **73** (1-2): 243-9, 2000.

SILICI, S.; KUTLUCA. S. **Journal of Ethnopharmacology**, **99** (1): 69-73, 2005.

SOARES, L.A.L; GONZÁLEZ ORTEGA, G; PETROVICK, P.R, SCHMIDT, P.C. **AAPS Pharmsci** **6**: E359-E366. 2005.

SOUZA, J.P.B.; TACON, L.A.; CORREIA, C.C.; BASTOS, J.K.; FREITAS, L.A.P. **PHARMAZIE**, **62** (7): 488-492, 2007

TOMÁS-BARBERÁN, F. A.; MARTOS, I. COSENTINI, M.; FERRERES, F., **J. Agric. Food Chem**, **45**: 2824-2829, 1997.

VOLPI, N.; BERGONZINI, G. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, **42**: 354–361, 2006.

WATSON, D.G.; PEYFOON, E.; ZHENG, L.; LU, D.; SEIDEL, V.; JOHNSTON, B.; PARKINSON, J.A.; FEARNLEY, J. **Phytochemical Analysis**, **17** (5): 323-331, 2006.

WESTON, R. J., MITCHELL, K. R., ALLEN, K. L. **Food Research International**, **37**: 166–174, 2004.

YAO, L.; JIANG, Y.; SINGANUSONG, R., DATTA, N.; RAYMONT, K. **Food Chemistry**, **86**: 169–177, 2004.

YAO, L.; JIANG, Y.; SINGANUSONG, R., DATTA, N.; RAYMONT, K., **Food Research International**, **38**: 651–658, 2005.

ZANOL, F. M.; PICOLI, S.U.; MORSCH, F. **J Bras Patol Med Lab**, **46** (4): 309-314, 2010.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nos últimos tempos, inúmeros trabalhos vêm demonstrando que a própolis pode ser uma alternativa no que diz respeito a ações biológicas que favorecem à saúde humana, inclusive demonstrando as inúmeras aplicações terapêuticas. Isso faz com que haja um aumento no consumo da própolis e, até mesmo, pode fazer com que novos produtos cheguem à população sem que haja um controle eficiente, devido a essa enorme repercussão divulgada pela mídia. Apesar de ser aceita por órgãos regulatórios como produto com finalidade terapêutica, a própolis ainda precisa ser padronizada quimicamente para garantir sua qualidade, eficácia e segurança, um trabalho que poderá demorar alguns anos, pois, como foi mostrado, vários fatores podem interferir na composição química.

O presente estudo apontou que a técnica para secagem de própolis utilizada pode ser um promissor recurso para confecção de produtos secos como subsídio para a produção de nutracêuticos, visto que tal processo foi capaz de manter a atividade biológica após o processamento. Também, são necessários mais estudos que correlacionem a composição química com a atividade biológica, pois assim, torna-se possível discutir o uso do tipo de própolis e suas preparações em função da utilização terapêutica, o que é imprescindível para um mercado cada vez maior e exigente em todo o mundo.

5. APÊNDICE

Apêndice 1 - Biosíntese dos flavonóides

