



Universidade Federal de Alagoas  
Instituto de Ciências Farmacêuticas  
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas

OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE MICROCÁPSULAS E GRANULADOS  
DEPRÓPOLIS VERDE DE ALAGOAS

**MAILDE JESSICA LIODORIO DOS SANTOS**

Maceió, 2022

**MAILDE JESSICA LIODORIO DOS SANTOS**

**OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE MICROCÁPSULAS E GRANULADOS  
DEPRÓPOLIS VERDE DE ALAGOAS**

Dissertação apresentada ao Instituto de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Alagoas como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador(a): **Prof. Dr. Ticiano Gomes do Nascimento**  
Instituto de Ciências Farmacêuticas  
Universidade Federal de Alagoas

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

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

S237o Santos, Mailde Jessica Liodorio dos.

Obtenção e caracterização de microcápsulas e granulados de própolis verde de Alagoas / Mailde Jessica Liodorio dos Santos. – 2022.

96 f. : il. color.

Orientador: Ticiano Gomes do Nascimento.

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

Bibliografia: f. 92-96.

1. Própolis. 2. Granulados farmacêuticos. 3. Ensaio térmico. 4. Composto fenólico. 5. Antioxidantes. I. Título.

CDU: 661.725.852

Aos meus avós João, Cícera, Nininha e  
José. Motivos da minha maior saudade,  
Que por vontade divina não podem se  
fazer presente nesse momento,  
*in memoriam.*

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço ao meu amado Deus, por seu infinito amor, por se fazer presente em todos os momentos, por ter dado me sabedoria para chegar onde estou.

À minha amada Mãe, a doce Santíssima Virgem Maria, meu porto seguro, por me cobrir com seu manto de amor, por ser exemplo de humildade na minha vida.

Aos meus pais, Zailde e Antonio, por terem me educado, eles que sempre me incentivaram, foram meu porto seguro e nunca permitiram que eu desanimasse, por todo amor e dedicação.

Aos meus companheiros de laboratório Clinston, Ariana, Lais, Lucas, Isaias, Marcos e Valdemir.

Ao meu orientador de pesquisa Prof. Dr. Ticiano Nascimento que me ajudou a descobrir meu amor pela pesquisa. E a todos meus professores da graduação por todo o ensinamento que me foi passado.

A minha ENORME FAMÍLIA LIODORIO e LIMA que não consigo citar todos os nomes, devido ao tamanho da família obrigada por sempre me encherem de AMOR.

E por último e não menos especial meu amor, meu Esposo, meu fiel companheiro, aquele que esteve comigo em cada momento desde a escolha da graduação até hojeo fim do mestrado, foi com ele que dividi cada momento difícil, foi com ele que vibrei a cada conquista, era para ele que recorria nos momentos mais difíceis, e por isso digo essa conquista não é apenas minha é NOSSA. Eu TE AMO.

Agradeço imensamente a presença de cada um na minha vida, a final do que valeriaminhas conquistas se eu não tivesse vocês para partilhar ?!

Muito obrigada por serem anjos de luz na minha vida. AMO MUITO VOCÊS.

O Altíssimo deu-lhes a ciência da medicina para ser honrado em suas maravilhas; e dela se serve para acalmar as dores e curá-las; o farmacêutico faz misturas agradáveis, compõe unguentos úteis à saúde, e seu trabalho não terminará, até que a paz divina se estenda sobre a face da terra”.

Eclesiástico 38, 6-

## RESUMO

A própolis é uma substância resinosa, quimicamente complexa, elaborada por abelhas, cuja variabilidade e características físico-químicas são dependentes do ambiente onde são produzidas. O objetivo do trabalho foi obter e caracterizar os extratos hidroalcoólicos, extrato seco spray-dryer e granulados de Própolis Verde Comercial de Apícolas do Estado de Alagoas, através de métodos analíticos de caracterização químico, físico-químico e antimicrobiano. A matéria-prima (extrato de própolis verde) foi adquirida no comércio local, e submetidas a processos de obtenção de extrato seco spray-dryer, granulados farmacêuticos e caracterizações através de ensaios de determinação de fenóis, flavonoides, atividade antioxidante, grau de encapsulação usando UV-VIS, Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), Ensaios térmicos e ensaio de atividade antibacteriana. A CLAE mostrou perfil cromatográfico de compostos fenólicos como flavonoides e ácidos fenólicos em comprimento de onda de 289 nm e 313 nm. Os particionados do extrato comercial de própolis verde apresentaram atividade antibacteriana frente aos microorganismos *Staphylococcus aureus*, fase Hexano/Acetato 9:1 (512 µg/mL) e Hexano/Acetato 1:1 (512 µg/mL) *Staphylococcus epidermidis* fase Hexano/Acetato 9:1 (256 µg/mL) e Hexano/Acetato 1:1 (512 µg/mL) e *Enterococcus faecalis* fase Hexano/Acetato 9:1 (128 µg/mL) e Hexano/Acetato 1:1 (256 µg/mL). Os granulados de própolis verde demonstraram partículas micrométricas entre 5 e 20 µm na análise MEV. O grau de encapsulação para os granulados variou entre 71,92 e 83,27%. A atividade antioxidante variou entre 92,94% e 97,55% na concentração de 100 µg/mL com valores de IC<sub>50</sub> de 12,78 µg/mL para o extrato e entre 18,47 µg/mL e 26,13 µg/mL para granulados. A determinação de fenóis totais (20,58%) e flavonoides totais (2,92%) mostrou que os granulados apresentaram menores perdas de teor em relação à microcápsula spray-dryer. Os dados térmicos mostraram processos de perdas de massa na TG e entalpias endotérmicas de volatilização entre 50°C e 150°C que são sugestivos de perda de componentes voláteis como ésteres de ácido cinâmico presente no extrato de própolis verde. Os ensaios de atividade antioxidante combinados com ensaios térmicos, flavonoides totais e fenóis totais mostram a importância de monitorar a qualidade dos encapsulados de própolis verde para evitar perdas por volatilização ou

decomposição durante etapas de processamento e necessidade de condições especiais de acondicionamento e estocagem do extrato na forma sólida. O mercado de produtos naturais tem atraído a atenção de formas farmacêuticas sólidas livres de álcool.

**Palavras-chave:** Própolis Verde. Granulados Farmacêuticos. Ensaio térmico. Teor de fenólicos. Atividade antioxidante

## RESUME

Propolis is a resinous substance, chemically complex, produced by bees, whose variability and physicochemical characteristics are dependent on the environment where they are produced. The objective of this work was to obtain and characterize the hydroalcoholic extracts, spray-dryer dry extract and granules of Propolis Verde Comercial de Apícolas do Estado de Alagoas, through analytical methods of chemical, physical-chemical and antimicrobial characterization. The raw material (green propolis extract) was acquired in the local market, and subjected to processes for obtaining spray-dryer dry extract, pharmaceutical granules and characterizations through assays for the determination of phenols, flavonoids, antioxidant activity, encapsulation degree using UV-VIS, High Performance Liquid Chromatography (HPLC), Thermal assays and antibacterial activity assay. HPLC showed a chromatographic profile of phenolic compounds such as flavonoids and phenolic acids at wavelengths of 289 nm and 313 nm. The partitioned commercial extract of green propolis showed antibacterial activity against the microorganisms *Staphylococcus aureus*, Hexane/Acetate 9:1 phase (512 µg/mL) and Hexane/Acetate 1:1 (512 µg/mL) *Staphylococcus epidermidis* Hexane/Acetate phase 9:1 (256 µg/mL) and Hexane/Acetate 1:1 (512 µg/mL) and *Enterococcus faecalis* phase Hexane/Acetate 9:1 (128 µg/mL) and Hexane/Acetate 1:1 (256 µg/mL). The green propolis granules showed micrometric particles between 5 and 20 µm in the SEM analysis. The degree of encapsulation for the granules varied between 71.92 and 83.27%. The antioxidant activity varied between 92.94% and 97.55% at a concentration of 100 µg/mL with IC<sub>50</sub> values of 12.78 µg/mL for the extract and between 18.47 µg/mL and 26.13 µg/mL for granules. The determination of total phenols (20.58%) and total flavonoids (2.92%) showed that the granules had lower content losses compared to the spray-dryer microcapsule. The thermal data showed processes of mass loss in TG and endothermic enthalpies of volatilization between 50°C and 150°C, which are suggestive of loss of volatile components such as cinnamic acid esters present in the green propolis extract. The antioxidant activity tests combined with thermal tests, total flavonoids and total phenols show the importance of monitoring the quality of green propolis encapsulates to avoid losses due to volatilization or decomposition during processing steps and the

need for special conditions of packaging and storage of the extract in the solid form. The natural products market has attracted the attention of alcohol-free solid dosage forms.

**Keywords:** Green Propolis. Pharmaceutical Granules. Thermal tests. Phenolic content. Antioxidant activity. Antibacterial Activity.

## LISTA DE FIGURAS

|   |    |
|---|----|
| <b>Figura 1</b> - Colmeia com Abelhas <i>Apis mellífera</i> e própolis verde.....   | 36 |
| <b>Figura 2</b> - Estrutura da molécula do fenol.....   | 40 |
| <b>Figura 3</b> - Estrutura básica dos flavonoides.....   | 40 |
| <b>Figura 4</b> - Constituintes principais da própolis verde brasileira.....  | 41 |
| <b>Figura 5</b> - Esquema do Processo de Secagem em Spray Dryer: obtenção de micropartículas.....   | 47 |
| <b>Figura 6</b> - Aspecto geral da massa do encapsulado 2 formado após a mistura dos componentes antes do processo de obtenção dos granulados.....  | 61 |
| <b>Figura 7</b> – Perfis espectrais de UV-vis ( $\lambda = 200-500 \text{ nm}$ ) de extratos de Própolis Verde.....   | 65 |
| <b>Figura 8</b> - Cromatograma do Extrato de Própolis Verde (produto comercial) Cortico_5319_2019 no comprimento de onda de 254 nm. Presença de picos cromatográficos no extrato de própolis verde da Apícola O Cortiço.....  | 66 |
| <b>Figura 9</b> – Cromatograma do Extrato de Própolis Verde (produto comercial) Cortico_5319_2019 no comprimento de onda de 289 nm. Presença de picos cromatográficos majoritários em 8, 15, 19, 32 e 38 minutos no extrato de própolis verde da Apícola O Cortiço..... | 67 |
| <b>Figura 10</b> - Cromatograma dos Extratos de Própolis Verde (produto comercial) Cortico_5319_2019 no comprimento de onda de 315 nm. Presença de pico cromatográfico majoritário em 32 minutos no extrato de própolis verde da Apícola O Cortiço.....                 | 67 |
| <b>Figura 11</b> – Capacidade de sequestro de radical DPPH do Extrato de Própolis Verde (produto comercial) Cortico_23519_2019 pelo método DPPH.....  | 68 |
| <b>Figura 12</b> - Particionamento do extrato de própolis verde- o cortiço.....   | 69 |

|  |    |
|--|----|
| <b>Figura 13-</b> Perfil cromatográfico da fase Hexano:acetato 1:1 do extrato de própolis verde.....   | 72 |
| <b>Figura 14-</b> Espectro UV-Vis dos principais picos cromatográficos da fase Hexano:acetato 1:1 originado do extrato de própolis verde.....  | 73 |
| <b>Figura 15 -</b> Cromatograma do Extrato de Própolis Marrom esverdeada de União dos Palmares nos comprimentos de onda de (A) 254 nm, (B) 268 nm, (C) 289 nm e (D) 313 nm. Presença de picos cromatográficos no extrato de própolis marrom..... | 73 |
| <b>Figura 16 -</b> Microcápsula de própolis marrom-esverdeado do extrato comercial de própolis de União dos Palmares.....  | 74 |
| <b>Figura 17 -</b> Formulações de extrato de própolis verde em concentrações diferentes.....   | 74 |
| <b>Figura 18 -</b> Curva de calibração do extrato de própolis verde - Validação do método.....   | 75 |
| <b>Figura 19-</b> Gráfico com Percentagens do sequestro de radical DPPH das Formulações Contendo Extrato Bioativo da própolis verde.....   | 79 |
| <b>Figura 20 –</b> Determinação de Fenois totais nos granulados do Extrato de Própolis verde e própolis marrom pelo método Folin-Ciocalteu. Análise de variância (Teste de Tukey; $\alpha$ 0.05 e valor de $P < 0,0001$ ).....                   | 83 |
| <b>Figura 21 –</b> Determinação de flavonoides totais nos granulados do Extrato de própolis verde e microcápsulas de própolis marrom. Análise de variância (Teste de Tukey; $\alpha$ 0.05 e valor de $P < 0,0001$ ).....                         | 86 |
| <b>Figura 22-</b> Curvas TG do extrato de própolis verde e seus granulados obtidos na razão de aquecimento de 10°C/min.....  | 87 |
| <b>Figura 23 -</b> Curvas DSC do extrato de própolis verde e seus granulados obtidos na razão de aquecimento de 10°C/min. ....   | 87 |

**Figura 24** Microscopia eletrônica de varredura (MEV) dos granulados própolis verde amostra 3 e 4.....89

**Figura 25** Microscopia eletrônica de varredura (MEV) dos granulados própolis verde amostra 2, 3,4,e 5.....90

## LISTA DE TABELAS

|   |    |
|---|----|
| <b>Tabela 1</b> -Classificações da própolis brasileira.....   | 38 |
| <b>Tabela 2</b> - Principais classes de compostos encontradas na própolis.....  | 42 |
| <b>Tabela 3</b> - Formulação Microencapsulado de própolis marrom esverdeada de Alagoas.....   | 57 |
| <b>Tabela 4</b> - Condições de secagem do microencapsulado de própolis verde....  | 58 |
| <b>Tabela 5</b> - Composições dos microencapsulados de própolis verde com extrato comercial.....  | 58 |
| <b>Tabela 6</b> - Teor de fênois totais e flavonoides totais no extrato comercial de própolis verde.....  | 63 |
| <b>Tabela 7</b> - Produtos do particionamento submetidos a técnica de microdiluição para os microorgnaismos: <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Staphylococcusepidermidis</i> e <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ..... | 71 |
| <b>Tabela 8</b> - Grau de encapsulação dos formulados de própolisVerde.....   | 75 |
| <b>Tabela 9</b> – Determinação da IC50 do extrato de própolis verde e seus granulados.....  | 79 |
| <b>Tabela 10</b> - Determinação de fenois totais usando ácido gálico como padrão analíticopelo método Folin-Ciocalteu no extrato de própolis verde.....   | 80 |
| <b>Tabela 11</b> - Determinação de fenois totais usando ácido gálico como padrão analíticopelo método Folin-Ciocalteu no granulado formulação.....  | 81 |
| <b>Tabela 12</b> - Determinação de fenois totais usando ácido gálico como padrão analíticopelo método Folin-Ciocalteu no granulado formulação3.....   | 81 |
| <b>Tabela 13</b> - Determinação de fenois totais usando ácido gálico como padrão analíticopelo método Folin-Ciocalteu no granulado formulação 4   | 81 |
| <b>Tabela 14</b> - Determinação de fenois totais usando ácido gálico como padrão analíticopelo método Folin-Ciocalteu no granulado formulação5.....   | 82 |
| <b>Tabela 15</b> - Determinação de fenois totais usando ácido gálico como padrão analíticopelo método Folin-Ciocalteu no extrato de marrom.....   | 82 |
| <b>Tabela 16</b> - Determinação de fenois totais usando ácido gálico como padrão analítico pelo método Folin-Ciocalteu no formulado spray-dryer.....  | 82 |

**Tabela 17** - Determinação de flavonoide totais usando quercetina como padrão analítico pelo método de cloreto de alumínio no granulado formulação 2.....84

**Tabela 18** - Determinação de flavonoide totais usando quercetina como padrão analítico pelo método de cloreto de alumínio no granulado formulação 3.....84

**Tabela 19** - Determinação de flavonoide totais usando quercetina como padrão analítico pelo método de cloreto de alumínio no granulado formulação 4.....84

**Tabela 20** - Determinação de flavonoide totais usando quercetina como padrão analítico pelo método de cloreto de alumínio no granulado formulação 5.....85

**Tabela 21** - Determinação de flavonoide totais usando quercetina como padrão analítico pelo método de cloreto de alumínio no extrato de própolis marrom de Alagoas.....85

**Tabela 22** - Determinação de flavonoide totais usando quercetina como padrão analítico pelo método de cloreto de alumínio no extrato spray-dryer de própolis marrom de Alagoas.....85

## LISTA DE SIGLAS, ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

|                   |  |
|-------------------|--|
| ABS               | Absorbância  |
| ABTS              | 2,2-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) |
| (CE50)            | Concentração eficiente                                 |
| (IC50)            | Concentração inibitória                                |
| MPV               | Microencapsulado de própolis verde                     |
| SROS              | Supression of Reactive Oxygen Species                  |
| CV                | Coeficiente de variação                                |
| d.C.              | Depois de Cristo                                       |
| DPPH              | 1,1-difenil-2-picrilidrazil                            |
| DP                | Desvio Padrão  |
| DNA               | Deoxyribonucleic acid                                  |
| SNC               | Sistema nervoso central                                |
| UV                | Ultravioleta   |
| VIS               | Visível  |
| [ ]               | Concentração   |
| RFC               | Folin Ciocalteau                                       |
| $\lambda$ máx     | Comprimento de onda máximo                             |
| AlCl <sub>3</sub> | Cloreto de alumínio                                    |
| EHPV              | Extrato hidroalcoólico de própolis verde               |
| CIM               | Concentração Inibitória Mínima                         |
| DSC               | Differential Scanning Calorimetry                      |
| FTIR              | Fourier Fourier transform infrared spectroscopy        |
| HPLC              | High efficiency liquid chromatography                  |

|     |                              |
|-----|------------------------------|
| MEV | Scanning Electron Microscopy |
| OMS | Organização Mundial de Saúde |
| TG  | Termogravimetria             |

# SUMÁRIO

|          |  |           |
|----------|--|-----------|
| <b>1</b> | <b>INTRODUÇÃO</b>  | <b>33</b> |
| <b>2</b> | <b>REVISÃO DE LITERATURA</b>                                       | <b>34</b> |
| 2.1      | Própolis   | 34        |
| 2.2      | Tipos de Própolis  | 36        |
| 2.3      | Composição Química da Própolis                                     | 39        |
| 2.4      | Atividades Biológicas  | 43        |
| 2.5      | Microencapsulação por nebulização ( <i>Spray-Drying</i> )          | 46        |
| 2.6      | <b>GRANULOMETRIA DE PÓS</b>  | <b>47</b> |
| <b>3</b> | <b>OBJETIVOS</b>   | <b>49</b> |
| 3.1      | Objetivo Geral   | 49        |
| 3.2      | Objetivos Específicos  | 49        |
| <b>4</b> | <b>METODOLOGIA</b>   | <b>50</b> |
| 4.1      | Obtenção do Extrato de Própolis Verde e Própolis Marrom Esverdeada | 50        |
| 4.2      | Particionamento do Extrato Etanólico da Própolis Verde de Alagoas  | 50        |
| 4.3      | Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)               | 50        |
| 4.4      | Análise da capacidade de sequestro de radical DPPH                 | 52        |
| 4.4.1    | Preparação do DPPH   | 52        |
| 4.4.2    | Preparação do extrato  | 52        |
| 4.4.3    | Leitura das medidas de absorvância das amostras                    | 52        |
| 4.5      | Determinação do Teor de Fenóis Totais                              | 53        |
| 4.5.1    | Construção da curva de calibração do ácido gálico                  | 53        |
| 4.5.2    | Teor de fenóis totais do encapsulado da própolis verde de Alagoas  | 54        |
| 4.6      | Determinação do Teor de Flavonoides Totais                         | 54        |
| 4.6.1    | Construção da curva de calibração quercetina                       | 54        |

|        |  |    |
|--------|--|----|
| 4.6.2  | Teor de flavonoides totais do microencapsulado da própolis verde .....   | 55 |
| 4.7    | Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) .....  | 55 |
| 4.8    | Método de Varredura UV-VIS .....   | 56 |
| 4.8.1  | Construção da curva de calibração do extrato de própolis verde.....  | 56 |
| 4.9    | Preparação do Microencapsulado de Própolis Marrom Esverdeada.....  | 57 |
| 4.10   | Preparação dos Granulados Carregados com Extrato de Própolis Verde.....  | 58 |
| 4.11   | Caracterização da capacidade de sequestro de radical DPPH dos Extratos e Microencapsulado de Própolis Verde de Alagoas | 61 |
| 4.11.1 | Preparo das diluições para reação com DPPH .....   | 61 |
| 4.12   | Análise Térmica .....  | 62 |
| 4.12.1 | Termogravimetria (TG).....   | 62 |
| 4.12.2 | Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC).....   | 62 |
| 4.13   | Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....   | 62 |
| 5      | RESULTADOS E DISCUSSÃO .....   | 63 |
| 5.1    | Determinação de Fenóis e Flavonoides Totais no Extrato de Própolis Verde Lote 5319/2019 .....                          | 63 |
| 5.2    | Espectro de Varredura UV-VIS do Extrato de Própolis Verde.....   | 63 |
| 5.3    | Cromatografia Líquida de Alta Eficiência do Extrato de Própolis Verde.....   | 65 |
| 5.4    | Avaliação da capacidade de sequestro de radical DPPH do extrato da propolis verde .....                                | 68 |
| 5.5    | Atividade Antibacteriana do Extrato de Própolis Verde.....   | 69 |
| 5.5.1  | Particionamento Líquido-Líquido do extrato da própolis verde.....  | 69 |
| 5.5.2  | Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)...  | 69 |
| 5.5.3  | Cromatografia líquida de alta eficiência das partições líquido-líquido .....   | 71 |

|              |  |           |
|--------------|--|-----------|
| <b>5.6</b>   | <b>Obtenção do Microencapsulado de Própolis Marrom Esverdeado.....</b>   | <b>73</b> |
| <b>5.7</b>   | <b>Obtenção e Caracterização dos Granulados.....</b>   | <b>74</b> |
| <b>5.7.1</b> | <b>Obtenção dos granulados de própolis verde .....</b>   | <b>74</b> |
| <b>5.7.2</b> | <b>Determinação do grau de encapsulação .....</b>  | <b>75</b> |
| <b>5.7.3</b> | <b>Atividade antioxidante dos encapsulados de própolis verde.....</b>  | <b>78</b> |
| <b>5.8</b>   | <b>Determinação de Fenóis e Flavonoides Totais nos granulados de PrópolisVerde e extrato spray-dryer de própolis marrom.....</b> | <b>80</b> |
| <b>5.9</b>   | <b>Análise Térmica dos granulados de Própolis Verde de Alagoas.....</b>  | <b>86</b> |
| <b>5.10</b>  | <b>Microscopia Eletrônica de Varredura.....</b>  | <b>88</b> |
| <b>6</b>     | <b>CONCLUSÃO .....</b>   | <b>91</b> |
|              | <b>REFERÊNCIAS .....</b>   | <b>92</b> |

## 1 INTRODUÇÃO

A própolis é uma substância resinosa, quimicamente complexa, coletada por abelhas *Apis mellifera* de brotos, frutos, flores e exsudados de plantas. A essa mistura é adicionada saliva da abelha, pólen e cera para o processamento da mistura pelas abelhas para obtenção do produto final, cuja variabilidade e características físico-químicas são dependentes do ambiente onde são produzidas (FUNARI; FERRO, 2006).

É possível encontrar diversos tipos de própolis com diferentes composições químicas ao redor do mundo, cada tipo vai se diferenciar pela sua origem botânica, fauna, flora e sazonalidade (PARK et al., 2000).

A literatura científica mostra que já foram identificados 13 tipos de própolis no Brasil e a própolis verde pertence ao grupo 12, o qual é proveniente do sudeste brasileiro e têm a *Baccharis dracunculifolia* (Asteraceae) como origem botânica destacando-se por se encontrar de forma mais abundante na natureza, e ser alvo dos consumidores nacionais e internacionais. Sua composição é rica em ácidos fenólicos (ácido caféico, ácido ferúlico, ácido cumárico, ácido cinâmico), aromadendrin-4'-O- metil-éter (AME), Isosakuranetina, 3-prenil-4-hidroxicinâmico ácido (drupanina), 3- prenil-4-di-hidroxicinamoxicinâmico ácido (bacarina), ácido 2,2-Dimetil-6- carboxietenil-2H-1-Benzopyrano (DCBEN); Tendo como marcador majoritário compostos como 3,5- ácido diprenil-4-hidroxicinâmico (artepilina C) (BASTOS, 2009) ). Essas substâncias conferem atividades biológicas à própolis verde, tais como: antioxidante, antitumoral, imunoestimulante, anti-inflamatória, antibacteriana, antifúngica, e entre outras (MARCUCCI, 1995).

A caracterização da qualidade da própolis brasileira é um desafio que a comunidade científica tem pela frente, tendo em vista a variação de composição e o grande número de compostos bioativos. É necessário determinar quais são os parâmetros que devem ser controlados para que a própolis comercial possua uma determinada atividade farmacológica (PEREIRA, 2002). Além de que a baixa solubilidade da própolis em água limita o seu uso nas preparações de formas farmacêuticas, principalmente líquidas. No mercado, a maioria dos

extratos e tinturas disponíveis são produzidas a base de álcool, que pode provocar reações adversas e contraindicações. Essas características tem exigido desenvolvimento outras formas farmacêuticas à base de própolis, tais como as formas farmacêuticas sólidas, que apresentam vantagens farmacotécnicas quando comparado com outras formas farmacêuticas, como as tinturas (BANKOVA; CASTRO; MARCUCCI, 2000). A tecnologia de secagem *spray-drying* é muito utilizada em diversos segmentos, incluindo o alimentício e o farmacêutico, este último, tem finalidade para produção de drogas ou excipientes por processo de microencapsulação. O objetivo do trabalho é o desenvolvimento e a caracterização de microencapsulados e granulados da própolis verde e posteriormente realizar análises por diferentes métodos de controle de qualidade.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Própolis

A ampla diversidade biológica presente em território brasileiro, tem atraído muitos estudiosos nos últimos anos, devido a riqueza de compostos presentes em algumas espécies, destacando-se a própolis brasileira (MARCUCCI et al., 2001). Atualmente, a própolis vem sendo bastante estudada e em muitos desses estudos mostram que a mesma tem sido incorporada a formulações como alimentos e cosméticos, mesmo que de forma empírica, buscando agregar um efeito terapêutico ao uso (CASTALDO; CAPASSO, 2002).

A própolis é uma substância resinosa de composição química complexa, formada por material gomoso e balsâmico, coletada por abelhas (*Apis mellífera*) em diferentes tipos de arbustos, árvores e partes de tecido vegetal. Essa composição é alterada na colmeia por adição de ceras e secreções salivares. Sua coloração varia entre marrom escuro e uma tonalidade mais esverdeada, essa variação se dá de acordo com sua procedência (MARCUCCI, 1996). A espécie de abelha conhecida pela produção da própolis é a *Apis mellífera*, chamada comumente como abelha africanizada; ela é destacada por ser uma espécie bastante eficiente na polinização das plantas, polinizando mais de 30% da comida que comemos; além disso elaboram mel, geleia real e cera (PARK et

al., 1998).

A palavra própolis é derivada do grego (*pro* para ou em defesa), e (*polis* – a cidade) dando o significado de “em defesa da cidade ou da colmeia” (MARCUCCI, 1996). As abelhas *Apis mellifera* usufruem da própolis para revestir a colmeia, ela atua como um selante para proteger suas colmeias contra microrganismos invasores, calor, umidade e vento (PARK et al., 1998). Os primeiros relatos do uso da própolis foram no processo de mumificação usados pelos antigos, e no tratamento de algumas infecções e inchaços por Assírios. Posteriormente, Aristóteles e Hipócrates descobriram sua ação cicatrizante e sua capacidade de reverter inchaços e diminuir as dores e começaram a fazer seu uso em pacientes (PEREIRA; SEIXAS; DE AQUINO NETO, 2002). Atualmente, a própolis é bastante utilizada principalmente como agente antimicrobiano, anti-inflamatório, imunoestimulante e cicatrizante (FUNARI; FERRO, 2006).

Quando comparado com os países tropicais, o Brasil é o país onde existe uma maior diversidade de tipos de própolis. Destaca-se a própolis verde (figura 1) por se encontrar de forma mais abundante na natureza, e ser alvo dos consumidores, tendo como origem botânica os ápices de *Baccharis dracunculifolia* (Asteraceae) conhecida populacionalmente como alecrim do campo (MARCUCCI, 1995). Esta espécie de planta é rica em fenilpropanoides, triterpenos, ácidos clorogênicos e ácido benzóico. Na região nordeste encontramos a própolis vermelha tem como origem botânica a *Dalbergia ecastaphyllum* (Fabaceae), sendo os principais compostos isoflavonóides, chalconas, pterocarpanos e outros compostos fenólicos (RIGHI, 2008).

**Figura 1** - Colmeia com Abelhas *Apis mellifera* e própolis verde.



Fonte: [www.google.com/search?q=figura=propolis+na+colmeia&tbn](http://www.google.com/search?q=figura=propolis+na+colmeia&tbn). Acessado em agosto 2020.

## 2.2 Tipos de Própolis

No Brasil existe uma classificação com 13 grupos de própolis (tabela 1) (DAUGSCH et al., 2006; CABRAL et al., 2009), essa distinção ocorre devido a sua constituição fitoquímica e pelas características organolépticas preconizadas pelo Ministério da Agricultura, sendo elas: cor, sabor, consistência à temperatura ambiente e granulometria (BRASIL, 2001). As classificações verde e vermelha se destacam dentre os demais tipos de própolis brasileiras (CABRAL et al., 2009). Dentre as várias atividades biológicas desses grupos os tipos que apresentaram melhor atividade antimicrobiana foram o tipo 3 (região sul), o tipo 6 (região nordeste) e o tipo 12 (região sudeste). A própolis do tipo 6 se distingue das demais por possuir uma ausência de flavonoides como seu constituinte (RIGHI et al., 2008). Em destaque a própolis vermelha se destaca por sua propriedade antimicrobiana e por ser um potencial tratamento terapêutico alternativo contra a doença de Chagas (SILVA et al. 2005).

Atualmente, uma das aplicações da própolis é a adição em produtos alimentícios, agregando ao alimento uma atividade funcional. No entanto, essa aplicação vem sendo limitada principalmente por sua solubilidade em álcool e pelo sabor forte e amargo (RIGHT, 2011). O sabor amargo da própolis pode estar relacionado à presença de flavonoides, bem como as antocianinas. Uma

alternativa para uma melhor aplicação da própolis em alimentos seria a aplicação de técnicas visando à microencapsulação da mesma, sendo possível sua liberação no alimento de forma controlada (NORI et al., 2011).

**Tabela 1 – Classificações da própolis brasileira.**

| <b>Própolis</b> | <b>Cor</b>                 | <b>Origem geográfica</b> | <b>Origem Botânica</b>           | <b>Composição Química</b>   | <b>Referência</b>   |
|-----------------|----------------------------|--------------------------|----------------------------------|---|---|
| <b>Grupo 1</b>  | Amarelo                    | Sul (RS)                 | -                                |   | PARK et al., 2002   |
| <b>Grupo 2</b>  | Castanho claro             | Sul (RS)                 | -                                | -   | K et al., 2002; SILVA, 2008   |
| <b>Grupo 3</b>  | Castanho escuro            | Sul (PR)                 | <i>Populus alba</i>              | Éster do ácido dimetil dialil caféico; flavonoides: crisina e galangina;  | PARK et al., 2000 e 2002; SILVA, 2008   |
| <b>Grupo 4</b>  | Castanho claro             | Sul (PR)                 | -                                | -   | PARK et al., 2000 e 2002; SILVA, 2008   |
| <b>Grupo 5</b>  | Marrom esverdeado          | Sul (PR)                 | -                                | -   | PARK et al., 2000 e 2002; SILVA, 2008   |
| <b>Grupo 6</b>  | Marrom avermelhado         | Nordeste (BA)            | <i>Hyptis divaricata</i>         | Ésteres de ácidos graxos, compostos aromáticos, Terpenos, Flavonóides   | PARK et al., 2000 e 2002; SILVA, 2008;  |
| <b>Grupo 7</b>  | Marrom esverdeado          | Nordeste (BA)            | -                                | -   | PARK et al., 2000 e 2002; SILVA, 2008   |
| <b>Grupo 8</b>  | Castanhoescuro             | Nordeste (PE)            | -                                | -   | et al., 2000; SILVA, 2008   |
| <b>Grupo 9</b>  | Amarelo                    | Nordeste (PE)            | -                                | -   | PARK et al., 2000 e 2002; SILVA, 2008   |
| <b>Grupo 10</b> | Amareloescuro              | Nordeste (CE)            | -                                | -   | PARK et al., 2002   |
| <b>Grupo 11</b> | Amarelo                    | Nordeste (PI)            | -                                | -   | PARK et al., 2002   |
| <b>Grupo 12</b> | Verde ou Marrom esverdeado | Sudeste (SP, MG)         | <i>Baccharis dracunculifolia</i> | Artepilin c Isossacuranetina, Kaempferide Flavonóides, ácidos fenólicos, cetonas, aldeídos aromáticos, Alcoóis, terpenos, ácidos graxos, aminoácidos, oligoelementos, vitaminas B1, B2, B6, E, C e hidrocarbonetos. | PARK, 2004 e 2002; FUNARI e FERRO, 2006; MARCUCCI, 2007; BANKOVA, 2000; SOUSA, 2007 |
| <b>Grupo 13</b> | Vermelha                   | Nordeste (AL, BA, PB)    | <i>Dalbergia ecastophillum</i>   | formonetina, isoliquiritigenina, liquiritigenina, medicarpina, vestitol...Flavonóides: pinocem- brina, Formononetina, rutina, quercetina, dalbergina entre outros); Ácido: fenólico (ácido felúrico)                | SILVA et al., 2008; Dausch et al., 2007; SIQUEIRA,                                  |

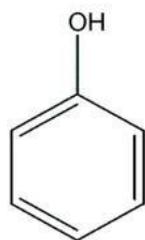
Fonte: Adaptado de (MENDONÇA, 2011)

### 2.3 Composição Química da Própolis

Embora exista uma grande variação na composição de própolis em função de suas propriedades botânicas e da sua origem geográfica a maioria dos componentes químicos farmacologicamente ativos da própolis está diretamente ligada com a flora da região e com a época de colheita (MARCUCCI, 1995). Mais de 300 constituintes conseguiram ser identificados, em diferentes amostras de própolis, essa variação é facilmente explicada pela grande biodiversidade brasileira, existindo assim no Brasil diferentes tipos de própolis, em distintas partes do país. Dentre os 300 constituintes já identificados estão: flavonoides, ácidos fenólicos, ácidos graxos, fenóis, aminoácidos, vitaminas A, B1, B2, B6, C, E e minerais como Mn, Cu, Ca, Al, Si, V, Ni, Zn e Cr (PEREIRA; SEIXAS; DE AQUINO NETO, 2002). A composição da própolis em geral é composta por 50% de resina e bálsamo vegetal, 30% de cera, 10% de óleos essenciais e aromáticos, 5% de pólen e 5% de outras substâncias variadas, incluindo resíduos orgânicos. É considerada uma das misturas mais heterogêneas encontradas em fontes naturais (PEREIRA et al., 2002). O maior grupo de compostos isolados da própolis são os flavonóides, largamente encontrados no reino vegetal, os quais junto com os ácidos fenólicos são os componentes responsáveis pela bioatividade contra vários microrganismos patogênicos (BURDOCK, 1998). Nos tipos de própolis da Europa por exemplo, os componentes predominantes são os flavonóides e os ésteres de ácidos fenólicos. Já na própolis cubana predominam as benzofenonas, diferente da própolis mexicana que é rica em isoflavonas e flavonas (RIGHI et al., 2011).

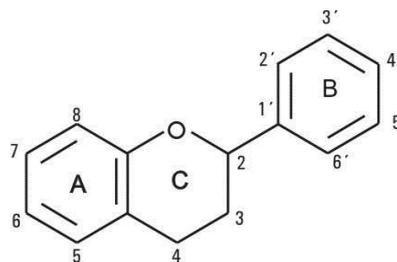
Os constituintes majoritários da própolis brasileira são os ácidos fenólicos, eles são uma grande família de compostos orgânicos de natureza aromática, caracterizados pela presença de um anel aromático ligado a um grupo hidroxila (figura 2) e a uma função orgânica de ácido carboxílico. Enquanto os flavonoides (figura 3), são moléculas polifenólicas e caracterizam-se pela coloração amarelada na maioria dos compostos, apesar de existirem alguns compostos de coloração incolor, ainda que as antocianinas apresentem coloração vermelha e azul. (OLIVEIRA et al., 2013).

**Figura 2** - Estrutura da molécula do fenol.



Fonte: Simões, 2017

**Figura 3** - Estrutura básica dos flavonoides.

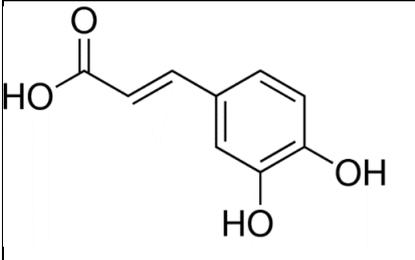
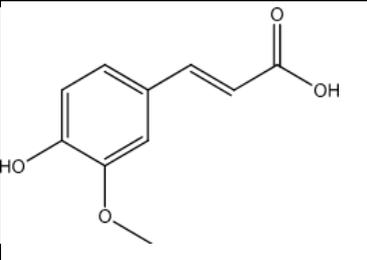
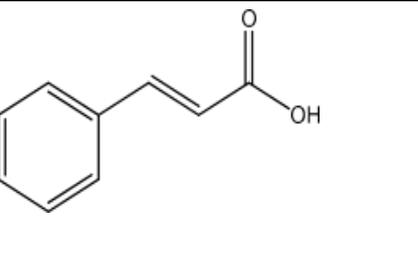
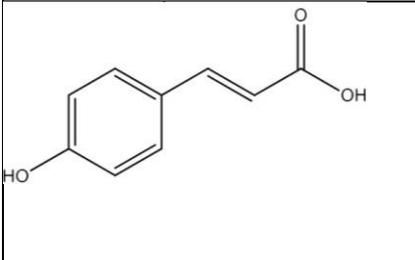
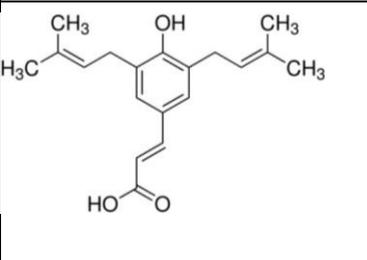
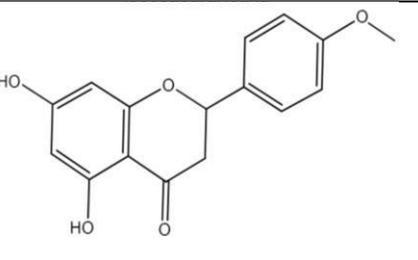
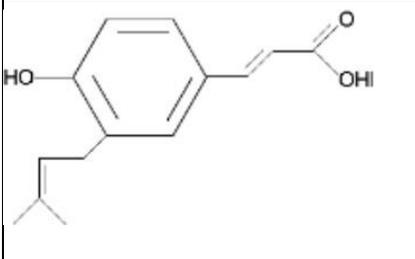
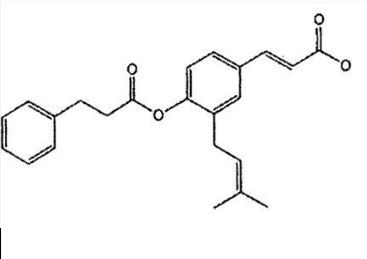
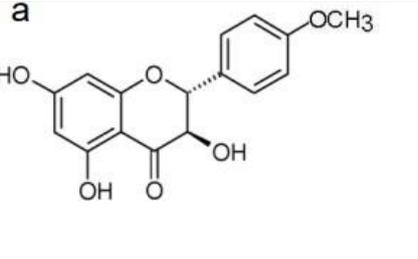
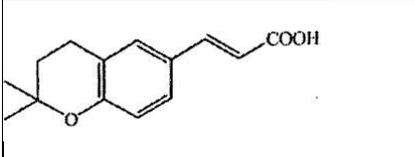


Fonte: Simões, 2017

Podem-se encontrar flavonoides em diversas formas estruturais. Entretanto, a maioria dos representantes dessa classe possui 15 átomos de carbono em seu núcleo fundamental, constituído de duas fenilas ligadas por uma cadeia de três carbonos entre elas conforme a figura 3. Nos compostos tricíclicos, as unidades são chamadas núcleos A, B e C e os átomos de carbono recebem a numeração como números ordinários para os núcleos A e C e os mesmos números seguidos de uma linha (') para o núcleo B. Alguns autores substituem a numeração 9 e 10 nos flavonoides por 8<sup>a</sup> e 4<sup>a</sup>, respectivamente, com exceção das chalconas (SIMÕES, 2017, p.211).

A própolis verde tem sua composição rica em ácidos fenólicos (ácido caféico, ácido ferúlico, ácido cumárico, ácido cinâmico), aromadendrin-4'-O-metil-éter (AME), Isosakuranetina, 3-prenil-4-hidroxicinâmico ácido (drupanina), 3-prenil-4-di- hidroxicinamoxicinâmico ácido (bacarina), ácido 2,2-Dimetil-6-carboxietenil-2H-1- Benzopyrano (DCBEN). A figura 4 mostra os marcadores majoritários destacando-se composto 3,5- ácido diprenil-4-hidroxicinâmico (artepilina C) (Bastos, 2009).

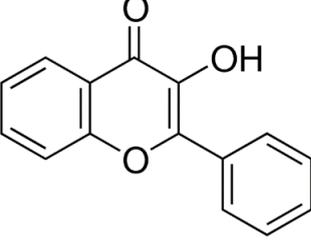
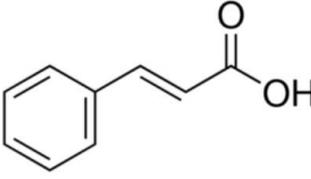
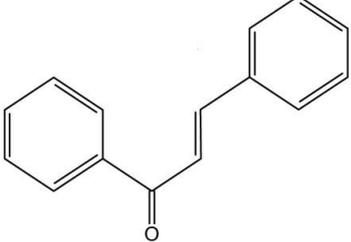
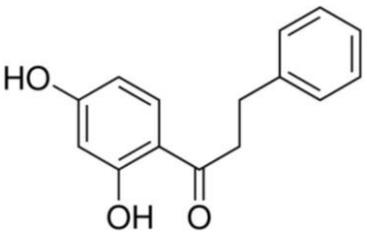
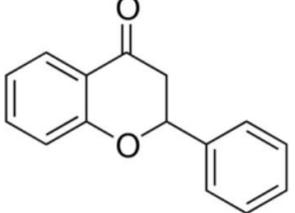
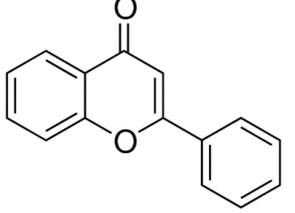
**Figura 4** - Constituintes principais da própolis verde brasileira.

|   |  |   |
|---|--|---|
|    |   |   |
| ÁCIDO CAFEICO   | ÁCIDO FERÚLICO   | ÁCIDO CINÂMICO  |
|    |   |   |
| ÁCIDO CUMÁRICO  | ARTEPILINA C   | ISOSACURANETINA   |
|   |  |  |
| DRUPANINA   | BACARINA   | AME   |
|  |  |   |
| DCBEN   |  |   |

**Fonte:** Adaptado de Bastos 2009.

Estas moléculas são produtos do metabolismo secundário das plantas e atuam como agentes protetores frente a patógenos, sendo eles utilizados como mecanismo de defesa, exemplo desses compostos são: flavanols, chalconas, flavonas, flavanonas, isoflavonas, taninos, estilbenos, curcuminoides, coumarinas, lignanas, etc (MARÍA et al., 2007). Além disso, estes compostos permitem às plantas interagir com outros seres vivos, como os insetos e pequenos pássaros, atraindo-os através destes compostos para realizarem a polinização (SILVA, 2016). No trabalho de (PAULINO, 2005), podemos observar alguns dos principais constituintes encontrados na maioria dos tipos de própolis (Tabela 2).

**Tabela 2-** Principais classes de compostos encontradas na própolis.

| <b>CompostoQuímico</b> | <b>Estrutura</b>   |
|------------------------|--|
| Flavonol               |  <chem>Oc1c(O)c2ccccc2oc1=O</chem>             |
| Ácido cinâmico         |  <chem>O=C(O)C=Cc1ccccc1</chem>                |
| Chalcona               |  <chem>O=C(c1ccccc1)C=Cc2ccccc2</chem>        |
| Dihidrochalcona        |  <chem>O=C(c1ccc(O)c(O)c1)CCc2ccccc2</chem>  |
| Flavonona              |  <chem>O=C1C(Oc2ccccc2)C(=O)c3ccccc13</chem> |
| Flavona                |  <chem>O=C1C(Oc2ccccc2)C(=O)c3ccccc13</chem> |

Fonte: Paulino, 2005.

## 2.4 Atividades Biológicas

O termo própolis já era descrito no século XVI na França. Em 1700 a.C no antigo Egito, os egípcios já conheciam as propriedades anti-putrefativas da própolis e a utilizava para embalsamar os mortos. No final do século XIX, foi também muito usada na segunda guerra mundial por conter propriedades cicatrizantes. Plínio, historiador romano, refere-se à própolis como medicamento capaz de reduzir inchaços e aliviar dores (PEREIRA et al., 2015).

Com o passar dos anos, a literatura vem evidenciando algumas atividades biológicas para a própolis como: antimicrobiana, anti-inflamatórias, anti-protozoária, antifúngica, antivirais, atividades citotóxicas e contra alguns tipos de tripanossomas. e hipoglicemiante (ZHANG et al., 2015) Além de muitas outras propriedade biológicas como anestésicas, antioxidantes, anticárie, hepatoprotetora e possui capacidade de regenerar tecidos cartilagosos e ósseos (MARCUCCI, 1996) Essas atividades podem variar, devido as grandes variabilidades em relação ao teor dos componentes da própolis, devido a sua grande variabilidade de acordo com alguns fatores como fauna e flora da região, como o teor de flavonoides nas amostras brasileiras, nas quais os ácidos fenólicos são geralmente bem mais abundantes, enquanto outras amostras apresentam um alto teor de flavonoides (PEREIRA et al., 2015).

Os compostos fenólicos do tipo flavonoides são considerados os principais compostos responsáveis pelos efeitos farmacológicos da própolis, agem em diferentes processos fisiológicos, atuando na absorção de vitaminas, nos processos de cicatrização como antioxidantes e exercendo função antimicrobiana e moduladora do sistema imune (BARBOSA et al., 2009, FROZZAA et al., 2013, DANESHMAND, et al., 2015).

A própolis verde é um dos produtos brasileiros de grande destaque mundial conhecida devido a suas atividades biológicas dentre seus componentes majoritários podemos destacar a artepilina C (ácido 3,5- diprenil-4-hidroxicinâmico) que possui dois grupo prenilados ligados ao grupo fenólico do ácido cinâmico, destacando-se algumas atividades biológicas já identificadas deste composto: Anti-inflamatória, antimicrobiana, anticancerígena, antitumoral

e antioxidante (BARBOSA et al., 2009).

Marcucci(1995) objetivou avaliar as propriedades biológicas e terapêuticas dos constituintes químicos da própolis. Neste sentido, observou a inibição *in vitro* de 25 espécies de bactérias, utilizando concentrações inferiores a 100 µg/mL. As linhagens de bactérias Gram positivas utilizadas foram: *Bacillus brevis*, *B. cereus*, *B. megatherium*, *B. polymyxa*, *B. pumilus*, *B. sphaericus*, *B. subtilis*, *Leuconostoe mesenteroides*, *Micrococcus lysodeikticus*, *Sarcina lutea*, *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus faecalis* e Gram negativas: *Aerobacter aerogenes*, *Alcaligenes* sp., *Bordetella bronchiseptica*, *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Serratia marcescens*. Confirmando o estudo anterior, outros autores concluíram que a própolis e seus constituintes apresentam atividade antibacteriana, principalmente para espécies de bactérias Gram positivas e limitadas para Gram- negativas (LU; CHEN; CHOU, 2005; MARCUCCI, 1996). A ação antibacteriana da própolis, deve-se muito provavelmente por dois mecanismos de ação; um deles relacionado a inibição da RNA polimerase bacteriano e o outro causando danos funcionais e estruturais, por agirem na membrana e parede celular do microrganismo (LUSTOSA et al., 2008). Os prováveis mecanismos de atividade antibacteriana estão relacionados ao efeito sinérgico entre os compostos fenólicos, flavonoides e outros compostos orgânicos, principalmente pinocebrina, pinobaksina e galangina (BURDOCK, 1998). É interessante observar que a própolis de alecrim-do-campo possui um teor relativamente baixo de flavonóides, constituintes considerados comumente como responsáveis pelas propriedades terapêuticas da própolis (PEREIRA; SEIXAS; DE AQUINO NETO, 2002). A própolis possui também atividade anti-inflamatória que ocorre devido a presença de flavonoides, do tipo galangina. Este flavonoide apresenta atividade inibitória das enzimas ciclooxigenase (COX) e lipooxigenase. A própolis tem demonstrado ação anti-inflamatória também por inibir a síntese das prostaglandinas, ativar a glândula timo, auxiliando o sistema imune e estimulando a imunidade celular (BORRELLI et al., 2002; LUSTOSA et al., 2008).

Outra propriedade biológica muito importante que está relacionada com os flavonoides é a atividade antioxidante, que está diretamente ligada à sua estrutura e propriedade redutora. A atividade antioxidante de compostos

fenólicos deve-se principalmente às suas propriedades redutoras e estrutura química, estas características desempenham um papel importante na neutralização ou sequestro de radicais livres e quelação de metais de transição, agindo tanto na etapa de iniciação como na propagação do processo oxidativo (SOUSA 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).

Um trabalho desenhado por (FONSECA et al., 2011) ao avaliarem a aplicabilidade potencial de dois extratos de própolis brasileira, verde e marrom, observaram, através de ensaios *in vitro*, que a própolis verde apresentou atividade antioxidante maior que a própolis marrom, pois o extrato de própolis verde continha uma maior quantidade de polifenóis, cumarina, drupanina, baccarina e artepilina C do que extrato de própolis marrom.

Já, em ensaios *in vivo*, o tratamento oral de camundongos sem pêlo demonstrou uma recuperação de GSH (Glutathione) esgotado induzida por radiação UV, enquanto que, o pré-tratamento tópico de animais com ambas as soluções de extrato de própolis, também, recuperaram o GSH esgotados, no entanto, os tratamentos empregados não inibiu o aumento da secreção cutânea de proteinase, cuja atividade é causada por irradiação.

No que diz respeito à atividade biológica apresentada pelos compostos fenólicos, a atividade antioxidante é a principal propriedade, devido à capacidade de estabilizar radicais livres (espécies reativas ao oxigênio – ERO). Reduzem a velocidade da oxidação por um ou mais mecanismos, como inibição de radicais livres e complexação de metais (OLDINI, 2007).

Estas moléculas ajudam à prevenção de formação de câncer evitando reações em cadeia de radicais livres que danificam as células de qualquer tecido (OLDINI, 2007). Em outro estudo pioneiro, *in vivo*, foi verificado que própolis é rica em derivados do ácido cinâmico: baccarina e drupanina, e tais substâncias demonstraram que são responsáveis pela indução da apoptose em linhas celulares de vários tumores, suprimindo o crescimento do tumor em camundongos com sarcoma alo-enxertada (MISHIMA et al., 2005).

A própolis verde apresentou efeitos anti-hipertensivos em ratos espontaneamente hipertensos, por ação vasodilatadora, e foi verificado que os componentes ativos são quatro flavonoides: dihidrocanferida, isosacuranetina, betuletola canferida (MARUYAMA et al., 2009).

## **2.5 Microencapsulação por nebulização (*Spray-Drying*)**

A secagem *spray-drying* conhecida como secagem por nebulização, spray dryer, secagem por atomização, secagem por aspersão é utilizada em diversos segmentos industriais, incluindo o alimentício e o farmacêutico por apresentar facilidade de operação e boa relação custo-benefício, tem finalidade para produção de drogas ou excipientes por processo de microencapsulação (BROADHEAD et al., 1992; PALMIERI et al., 1994; LEE et al., 1999; BILLON et al., 2000).

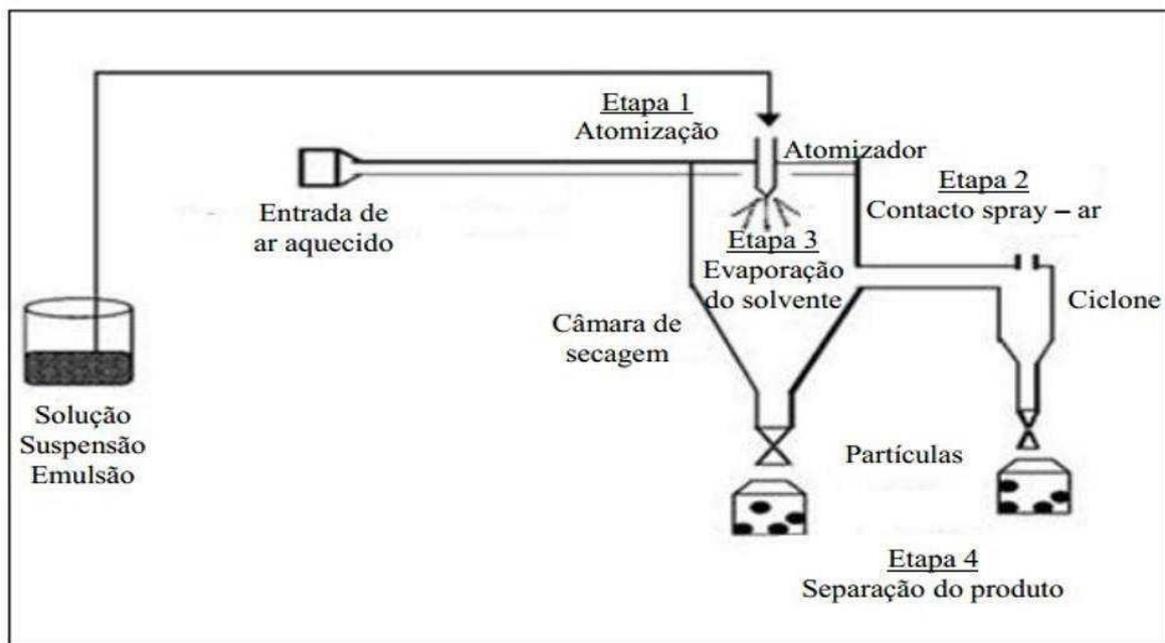
De modo geral, a secagem e obtenção do microencapsulado é um processamento unitário, em que um produto é modificado do estado fluido para o estado sólido em forma de pó dentro de uma câmara de secagem, onde é feita a dissipação de gotículas do material, que entram em contato com um gás ou ar aquecido, (GHARSALLAOUI et al., 2007; MASTERS, 1979). O microencapsulado formado permite a liberação modificada dos ingredientes sob estímulo específico, liberando a substância no local ou momento ideal velocidade e mascara odores e sabores desagradáveis (RÉ, 2000).

A formulação, é bombeada para a câmara de atomização ou câmara de secagem, onde se transforma num aerossol de finas gotículas que, quando entram em contato com o ar quente pressurizado gerado no interior da câmara de secagem, perdem água da camada mais externa da microcápsula para a camada mais interna, levando à solidificação do material e, conseqüentemente, ocorre o aprisionamento completo da substância que se pretende proteger (TULEY, 1996).

A caracterização da qualidade da própolis brasileira é um desafio que comunidade científica tem pela frente, tendo em vista a variação de composição e o grande número de compostos bioativos. É necessário determinar quais são os parâmetros que devem ser controlados para que a própolis comercial possua

uma determinada atividade farmacológica. (PEREIRA 2002). Além de que a baixa solubilidade da própolis em água limita o seu uso nas preparações de formas farmacêuticas, principalmente líquidas. No mercado, a maioria dos extratos e tinturas disponíveis são produzidas a base de álcool, que pode provocar reações adversas e contraindicações. O que tem atraído cada vez mais pesquisas com outros tipos de formas farmacêuticas (BANKOVA et al., 1996. KONISHI, et al.,2004).

**Figura 5-** Esquema do Processo de Secagem em Spray Dryer: obtenção de micropartículas.



Fonte: Adaptado de Swati, (2014).

## 2.6 GRANULOMETRIA DE PÓS

Substâncias de modo geral podem ser encontradas na natureza em três estados físicos: estado gasoso, estado sólido e estado líquido (Chang e Cruickshank,2005; Gomes, 2005).

Os sólidos possuem características gerais que permite os distinguir dos líquidos e gases: elasticidade (capacidade de se deformar e retomar a forma original após a força que levou à sua deformação), flexibilidade, fragilidade e ductilidade (propriedade que representa o grau de deformação que um material suporta até ao momento da sua fratura), dureza (resistência a deformações permanentes, fator que pode ser avaliado a partir da capacidade de um material riscar outro), resistência (capacidade de suportar forças intensas sem se

deformar) (Alindo e Finn, 1992).

Caracterização de um sólido quando ao os sólidos podem ser classificados como pós, grânulos ou pellets (INFARMED, 2005 a; Santos et al., 2004).

Os pós são uma mistura de partículas sólidas, livres, secas (fármacos ou substâncias químicas) finamente divididas, de origem animal, vegetal, mineral ou sintética. cujas dimensões se compreendem entre alguns nanómetros e 200  $\mu\text{m}$  (ANF, 2001; Hernández et al., 2011).

Os granulados podem ser considerados como produto intermediário importante na preparação de formas farmacêuticas sólidas (Couto, A.G. et al, 2000). A granulação tem a finalidade de transformar pós cristalinos ou amorfos em agregados sólidos de resistência, porosidade adequada, facilitar o escoamento durante processo de compressão ou enchimento de cápsulas, maior densidade e compressibilidade, melhor conservação, maior homogeneidade na distribuição dos componentes do granulado (LE HIR, A., 1997).

A análise granulométrica de pós consiste na determinação das dimensões das partículas que constituem as amostras e no tratamento estatístico dessa informação. Basicamente, o que é necessário fazer, é determinar as dimensões das partículas e estudar a sua distribuição da seguinte forma (DIAS, 2010): Pelo peso de cada classe dimensional considerada; Pelo volume; Pelo número de partículas integradas em cada classe.

Na indústria farmacêutica, a determinação da granulometria de pós é feita por meio de tamises (peneiras) com diferentes aberturas nominais de malha ( $\mu\text{m}$ ). Os tamises mais utilizados são os de abertura 2000, 710, 500, 355, 250, 180, 125 e 90  $\mu\text{m}$ , que são organizados um sobre os outros como uma bateria (BRANDÃO, 2007; FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2010). Os grânulos são aglomerados de um grande número de cristais e/ou partículas (INFARMED, 2005 b; Prista et al., 2008).

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo Geral**

Este trabalho tem o objetivo de caracterizar extrato comercial de própolis verde, bem como desenvolver microencapsulados na forma de granulados carregados com extrato de própolis verde visando uma produção em escala semi-industrial.

#### **3.2 Objetivos Específicos**

- Realizar estudos de caracterização físico-química do extrato comercial de própolis verde de Alagoas usando fenóis totais, flavonóides totais, UFLC-DAD;
- Determinar a atividade antimicrobiana do extrato comercial de própolis verde;
- Desenvolver microencapsulados e granulados contendo os extratos de própolis verde usando a técnica de spray-drying e técnicas farmacêuticas de granulação;
- Realizar estudos de caracterização físico-química das composições de microencapsulados usando diferentes técnicas dentre elas: UV-vis e análise térmica;
- Realizar estudos de caracterização química das composições de granulados e microencapsulados de própolis verde de Alagoas usando ensaios de flavonoides totais e fenóis totais;
- Avaliar grau de encapsulação dos compostos fenólicos presentes no extrato de própolis verde usando UV-Vis;
- Determinar a atividade antioxidante e  $IC_{50}$  do extrato comercial de própolis verde, granulados e microencapsulados contendo os mesmos;
- Propor composição sólida contendo extrato de própolis verde na forma de encapsulados.

## **4 METODOLOGIA**

### **4.1 Obtenção do Extrato de Própolis Verde e Própolis Marrom Esverdeada**

O extrato de própolis verde (EPV) foi obtido da empresa Cortiço em quantidade de 30 mL, embalado em embalagens de plástico, tipo frasco rosqueado, e estocado no laboratório em temperatura ambiente até o momento das análises. As amostras foram identificadas pelo laboratório como Cortico\_5319\_2019. Uma segunda amostra de própolis verde cortiço foi adquirida em 2020 em frascos com quantidade de 150 mL para realizar o estudo de obtenção dos granulados de própolis verde. O extrato hidroalcolico de própolis marrom esverdeada de Alagoas 17% (p/v) foi obtido da empresa Apícola Zumbi do Município do União dos Palmares em julho de 2019.

### **4.2 Particionamento do Extrato Etanólico da Própolis Verde de Alagoas**

O particionamento foi realizado com o auxílio de um funil de separação, por meio de extração líquido:líquido, onde, foram adicionados a um funil de separação 3mL do extrato etanólico de própolis verde, 1 mL de água e 10 mL de solventes que variaram nas concentrações de Hexano:Acetato de etila nas proporções de 9:1, 1:1 e 9:1 (V:V), além do particionamento com Etér:Acetato de etila na proporção 8:2 e 7:3 (V:V). O particionamento foi realizado em duas extrações para cada solução, onde obtivemos a fase solvente 1, fase solvente 2 e a fase 3 (aquosa) de cada uma das partições preparadas. Posteriormente, foram submetidas a secagem em temperatura ambiente, por 7 dias. Os produtos do particionamento foram submetidos a ensaio CIM e cromatografia líquida de alta eficiência para avaliar o perfil cromatográfico e possível identificação de seus marcadores de qualidade.

### **4.3 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)**

A concentração inibitória mínima (CIM) das partições obtidas no item 4.2 foi determinada pelo teste de microdiluição de caldo seguindo a metodologia descrita pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2012)*.

Para avaliar as atividades antimicrobianas foram utilizadas as linhagens bacterianas Gram positivas: *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213) e

*Staphylococcus epidermidis* (ATCC 31488), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) e Gram negativa: *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853).

O grau de atividade antimicrobiana foi determinado segundo os critérios estabelecidos por Tanaka et al., (2005): CIM de até 100 µg/mL (ativa), CIM de 100- 500 µg/mL (atividade inibitória moderada), CIM de 500-1000 µg/mL (atividade fraca) e CIM maiores que 1000 µg/mL (inativo).

Os inóculos foram preparados em solução salina tamponada estéril e a suspensão bacteriana determinada pela turvação do tubo 0,5 da escala de Mc Farland ( $1,5 \times 10^8$  UFC/ mL) diluída numa proporção de 1:10, até se conseguir uma concentração final de bactérias de  $5 \times 10^5$  UFC/poço ao inocular 5 µL dessa suspensão no caldo.

A CIM foi realizada em microplacas de poliestirenos estéreis de 96 poços, com 12 colunas (1 a 12) e 8 linhas (A a H). Todos os orifícios a partir da linha A foram preenchidos com 100 µL de Caldo Mueller Hinton (MH), um volume de 100 µL das frações foram adicionados nas colunas de 1 a 9 da linha A em triplicata. Em seguida uma alíquota de 100 µL do conteúdo de cada poço da linha A foi transferido para os poços da linha B, e após a homogeneização o mesmo volume transferido para a linha C, repetindo-se este procedimento até a linha H, desprezando-se após a homogeneização o excesso da diluição obtendo-se assim concentrações decrescentes dos extratos (4096 µg/mL; 2048 µg/mL; 1024 µg/mL; 512 µg/mL; 256 µg/mL; 128 µg/mL e assim por diante até 0,25 µg/mL).

Posteriormente em cada orifício adicionou-se 5 µL de inóculo microbiano.

Os poços da coluna 11 foram destinados para os testes de controle de experimento e os poços da coluna 12 receberam apenas caldo Muller Hinton para a verificação da esterilidade da placa.

As microplacas de poliestireno foram então incubadas em estufa bacteriológica a 36-37 °C por 18-24 horas. Decorrido esse tempo acrescentou-se a cada um dos poços 20 µL de uma solução aquosa de resazurina (7-hidroxi-3H-fenoxazina-3-ona 10-óxido) a 0,1% sendo assim então as microplacas incubadas por 1-2 horas a 36-37°C. Para preparo da Resazurina foram pesados 0,1g e solubilizado em 100 mL de hidróxido de sódio 0,02 M. Após percorrido esse

tempo o aparecimento de coloração vermelha nos orifícios foi considerado como prova negativa do efeito inibitório do particionado, ou seja, presença de microrganismos, e ausência de coloração foi considerada como prova positiva da ação inibitória do particionado frente ao microrganismo teste.

#### **4.4 Análise da capacidade de sequestro de radical DPPH**

##### **4.4.1 Preparação do DPPH**

Pesou-se em uma balança analítica 0,004 g do reagente DPPH, em seguida solubilizou-se em 100 mL de etanol absoluto para preparação de uma solução estoque de DPPH na concentração de 0,04 mg/mL. Essa preparação foi mantida sob refrigeração e protegida da luminosidade. Em solução etanólica o radical DPPH tem coloração violeta e tem velocidade de decaimento rápida, devendo ser usada em no máximo 1 semana toda a solução.

##### **4.4.2 Preparação do extrato**

Para calcular a umidade, 1 mL do extrato de própolis verde foi levado a balança de umidade durante 5 minutos o rendimento foi 87,92% e fez-se os cálculos dando uma concentração de 12,8 mg/ml, foi coletada uma alíquota de 103,5 µL do extrato e diluiu-se para um balão de 5 mL em álcool absoluto para chegar a uma concentração de 2,5 mg/mL da solução estoque.

##### **4.4.3 Leitura das medidas de absorvância das amostras**

Posteriormente retirou-se os volumes da solução estoque do extrato, adicionou-se 2 mL de solução de DPPH para balão de 5 mL, completando seu volume com etanol, obtendo assim as concentrações (5, 10, 15, 20, 25 µg/mL). Após 30 min de repouso na ausência de luz foi medida sua absorvância em espectrofotômetro UV- Mini em modo fotometria com comprimento de onda ( $\lambda$ ) de 518 nm.

A partir desses resultados, conseguiu-se avaliar a porcentagem da capacidade de sequestro de radicais livres através da equação:

$$AA(\%) = \left( \frac{A_{\text{controle}} - A_{\text{amostra}}}{A_{\text{controle}}} \right) \cdot 100\%$$

$A_{\text{controle}}$  = absorvância da solução do controle negativo e  $A$  (amostra) = absorvância das dissoluções dos referidos grupos.

## 4.5 Determinação do Teor de Fenóis Totais

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

Foi preparada uma solução de carbonato de sódio ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) a 15% (p/v) em água tendo como volume final 100 mL. Em seguida, foi preparada uma solução de ácido gálico a 1 mg/mL em água e completou-se com água para um volume final de 10 mL. Após feito esse processo, adicionou-se 250  $\mu\text{L}$  de Folin-Ciocalteu, em 3 mL de água destilada e o ácido gálico volumes para obter diferentes concentrações finais de (2, 4, 5, 6, 8, 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) agitando por 1 minuto em um balão volumétrico de 5 mL. Passado o tempo, transferiu-se 1 mL de carbonato de sódio ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) a 15% agitou-se por mais 30 segundos e posteriormente completou-se o balão (5 mL) com água destilada. A reação ocorreu no escuro por 2 horas para que ocorresse a oxidação de fenóis. O ensaio foi realizado em triplicata. Observou-se a mudança de coloração, de esverdeado para azul. A leitura foi realizada no espectrofotômetro UV-Vis, no comprimento de onda de 750 nm. Calculou-se a equação da reta pelo método dos mínimos quadrados.

#### **4.5.2 Teor de fenóis totais do encapsulado da própolis verde de Alagoas**

Foi feita utilizada a mesma solução estoque de própolis verde utilizada para o DPPH. Posteriormente para o método de fenóis totais, transferiu-se para um balão de 5 mL de 250 µL de Folin-Ciocolteau e adicionou-se 3 mL de água destilada retirou-se uma alíquota da solução estoque, para obter diferentes concentrações (50; 37,5; 25 µg/mL) agitando por 1 minuto. Após esse processo, adicionou-se 1 mL de solução de carbonato de cálcio e agitou-se por 30 segundos e aferiu-se com água destilada. A reação ocorreu no escuro por 2 horas para que ocorresse a oxidação de fenóis. A leitura foi realizada no espectrofotômetro, no comprimento de onda de 750 nm. Calculou-se a equação da reta pelo método dos mínimos quadrados. Todo o experimento foi realizado em triplicata. Foi realizado também fenóis totais para as formulações 2,3,4 e 5. Onde usou-se concentrações de (222, 195, 139, 104 e 70 µg/mL) para as formulações 2 e 3 e concentrações de (180, 160, 140, 100, 75 e 50 µg/mL) para as formulações 4 e 5.

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

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

Construiu-se a curva padrão de calibração utilizando-se quercetina ( $C_{15}H_{10}O_7$ ) em diferentes concentrações. Inicialmente preparou-se uma solução de cloreto de alumínio ( $AlCl_3$ ) a 5%. Cloreto de alumínio hexahidratado foi pesado (9,05g  $AlCl_3 \cdot 6 H_2O$ ) e solubilizado em metanol. Em seguida, foi preparada uma solução de quercetina, solubilizando-se 0,0159 mg de quercetina ( $C_{15}H_{10}O_7 \cdot H_2O$ ) em metanol. Foram preparadas diferentes concentrações para quercetina (2, 4, 5, 6, 8, 10 µg/mL). Foi colocado 100 µL de cloreto de alumínio a 5% em cada um dos seis balões, e quercetina com diferentes volumes. O balão foi completado com metanol até atingir 5 mL. Em seguida, agitou-se levemente por (30) segundos, e a solução foi mantida em repouso e no escuro durante 30 min. Em seguida, fez-se a leitura no espectrofotômetro UV-Vis, com comprimento de onda de 425 nm. Calculou-se a equação da reta pelo método dos mínimos quadrados.

#### **4.6.2 Teor de flavonoides totais do microencapsulado da própolis verde**

Foi utilizada a mesma solução estoque utilizada para fenóis (40% de excipientee 60% de extrato). Foram preparadas seis concentrações diferentes da própolis verde(70, 80, 90, 100, 110 µg/mL), onde foi colocado em cada um dos seis balões 100 µL de cloreto de alumínio a 5%, e diferentes concentrações da solução de própolis verdeem metanol e, posteriormente, o balão volumétrico foi completado para 5 mL, em seguida, agitou-se levemente por alguns segundos. Após o tempo de 30 minutos fez a leitura no espectrofotômetro UV-Vis, no comprimento de onda de 425 nm. Calculou-se a equação da reta pelo método dos mínimos quadrados.

Os valores das absorbâncias obtidos com as leituras das amostras foram substituídos na variável  $y$ , da equação ( $y = 9x+b$ ) para encontrar os valores de concentração na variável  $x$ . Para calcular a porcentagem de flavonoides totais presentes nas amostras analisadas utilizaram-se as equações descritas a cima, dividindo-se o valor de concentração de flavonóide encontrado na equação da reta pelo valor de  $x$  dividido pelo valor da concentração utilizada sendo elas (70, 80, 90,100, 110 µg/mL) e multiplicando-se por 100.

#### **4.7 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)**

A obtenção do perfil cromatográfico do extrato de própolis verde foi realizado utilizando uma cromatografia líquida de ultra-performance acoplada a detector de arranjo de diodos (HPLC-DAD) da Shimadzu, composta pelos seguintes módulos: uma bomba de alta pressão 20ADXR), degaseificador (modelo DGU20A3R), auto- injetor (modelo SIL-20AXR), coluna cromatográfica em forno, detectores de fotodiodos (modelo EPDM-20A) e detector de fluorescência (modelo RF-20A), um controlador (modelo CBM-20A) e um software Shimadzu Labsolution. A separação dos flavonóides ocorreu por meio de coluna de fase reversa ( $C_{18}$ , 150 × 4,6 mm; 5 µm), fase móvel composta de solvente A (água Milli-Q acidificada com 0,1% de ácido fórmico) e solvente B (metanol), bombeada a vazão de 0,3 mL/min. O gradiente inicial de eluição consistiu em água (70%) e metanol (30%) com uma variação da porcentagem de metanol para 100% em 40 min seguido por uma condição isocrática com

metanol (100%) até 53 min e retornou ao condição inicial aos 54 min, seguida por condições isocráticas com metanol (30%) até 60 min. Este método foi desenvolvido para lavar a coluna durante a análise com 100% de metanol e evitar a falta de precisão e exatidão durante a eficiência do ensaio de aprisionamento e evitar incrustações na coluna e acúmulo excessivo de pressão pela retenção irreversível de compostos não polares. A extrato de própolis verde foi preparado à 100 mg/mL em etanol e em seguida diluída nas concentrações de 1,000 mg/ml, 0,750 mg/mL, 0,500 mg/mL 0,250 mg/mL e 0,100 mg/mL e 0,050 mg/mL. As condições cromatográficas como detector, comprimento de onda (280nm), fase móvel (metanol:ácido fórmico 0,1% ou acetonitrila:ácido fórmico 0,1%), coluna, (C<sub>18</sub>), tempo de análise (47 min a 60 minutos), volume de injeção (2 µL).

#### **4.8 Método de Varredura UV-VIS**

Para calcular a umidade, 1 mL do extrato de própolis verde foi evaporado em balança de umidade Shimadzu durante 5 minutos e o rendimento calculado de 86,69% de solvente evaporado e resultando em uma concentração de 13,3 mg/mL de massa sólida solúvel. Foi coletada uma alíquota de 752 µL do extrato e diluiu-se para um balão de 10 mL em metanol para chegar a concentração padrão da solução estoque (1 mg/mL) para em seguida realizar diluições adicionais. Foram pipetados os seguintes volumes 400 µL, 300 µL, 200 µL e 100 µL para balão volumétrico de 10 mL para obter as seguintes concentrações de 40, 30, 20, 10 µg/mL.

As amostras foram lidas em comprimentos de onda que variaram entre de 200nm e 600 nm em Espectrofotômetro UV-Vis da Shimadzu, modelo UV-1280. A coletados dados foi realizada considerando valores de 2 em 2 nanômetros, para plotar gráfico com o auxílio dos softwares Graphpad Prism®. As análises espectrofotométricas na região do UV-visível (200 a 600 nm).

##### **4.8.1 Construção da curva de calibração do extrato de própolis verde**

Para se estabelecer a curva de calibração foi adicionado a um balão 1 mL do extrato (124,3 mg de extrato) posteriormente completou-se o balão (10mL) com metanol (MEOH), onde obteve-se uma solução estoque com 12,43 mg/mL

dessa solução estoque foi coletado 0,804 mL (804 µL) e adicionado a um balão de 10 mL com metanol a partir dessa solução estoque foram pipetados 50, 100, 200, 300, 400 e 500 µL para alcançar as seguintes concentrações 5, 10, 20, 30, 40 e 50 µg/mL, respectivamente. A leitura foi realizada no espectrofotômetro, no comprimento de onda de 290nm e 315nm. Calculou-se a equação da reta pelo método dos mínimos quadrados.

#### 4.9 Preparação do Microencapsulado de Própolis Marrom Esverdeada

O extrato de própolis marrom esverdeada foi adquirido na Apícola Zumbi dos Palmares em julho de 2019. Preparou-se a composição contendo como agentes encapsulantes gelatina, amido e aerosil tendo estes a função de diluente e de revestimento (Tabela 3). O preparo iniciou solubilizando-se 15 g de gelatina em 150 mL de água destilada aquecida (50°C) e posteriormente adicionou-se 5 g de amido até completar solubilização dispersão. Aos poucos foi incorporado na solução (gelatina + amido) o EEPV (100 mL correspondente a 15 g de massa sólida solúvel). Após a homogeneização, adicionou-se 50 mL de etanol absoluto e 1 g de dióxido de silício coloidal (Aerosil®) para conferir aumento da fluidez e da higroscopicidade do microencapsulado. Todo processo ocorreu em agitação magnética constante a 1090rpm durante o período de secagem spray-dryer.

**Tabela 3.** Formulação Microencapsulado de própolis marrom esverdeada de Alagoas

| <b>Componentes</b>                       | <b>Massa<br/>(g)</b> | <b>Percentual<br/>(%)</b> |
|--|----------------------|---------------------------|
| Extrato de própolis marrom<br>esverdeada | 15                   | 41,72                     |
| Gelatina                                 | 15                   | 41,72                     |
| Amido                                    | 5                    | 13,8                      |
| Aerosil                                  | 1                    | 2,76                      |

**Fonte:** AUTORA, 2021.

A obtenção do microencapsulado, foi feita através do Mini Spray Dryer B-290 usando uma corrente de ar comprimido. A alimentação da solução que estava

a secar foi efetuada usando uma bomba peristáltica. As condições de secagem estão representadas na (Tabela 4).

**Tabela 4.** Condições de secagem do microencapsulado de própolis verde

| Temperatura de Entrada (°C) | Temperatura de saída (°C) | Pressão Soprador (bar) | Vazão Volumétrica da Bomba Peristáltica (mL/h) |
|-----------------------------|---------------------------|------------------------|--|
| 180                         | 105                       | 2,9                    | ‘  |

Fonte: AUTORA, 2021

#### 4.10 Preparação dos Granulados Carregados com Extrato de Própolis Verde

Extrato de própolis verde da empresa cortiço foi adquirido na empresa em frascos plásticos de 150 mL pronto para consumo. Determinou-se a massa sólida solúvel em balança de umidade. Foram preparadas 5 formulações de extrato comercial de Própolis Verde com adjuvantes farmacotécnicos (Tabela 5).

**Tabela 5-** Composições dos microencapsulados de própolis verde com extrato comercial.

|                        | Fórmula 1 | Fórmula 2 | Fórmula 3 | Fórmula 4 | Fórmula 5 |
|------------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
|                        | 51.66%    | 18%       | 18%       | 25%       | 25%       |
| Componentes            | Massa (g) |           |           |           |           |
| Extrato própolis verde | 5,34      | 3,75      | 3,75      | 6,215     | 6,215     |
| Amido                  | 1,50      | 15,00     | 16,50     | 18,00     | 16,50     |
| Lecitina               | 1,50      | 1,50      | -         | -         | 1,50      |
| Caseína                | 2,00      | -         | -         | -         | -         |

Fonte: AUTORA, 2021.

**Formulação 1:** Foi solubilizado 2g de caseína em 50 ml de água osmose reversa, a solução foi levada ao ultrassom por 25 minutos. Em outro béquer adicionou-se 43 ml do extrato de própolis verde (correspondente a 5,345 g de extrato de própolisverde), 1,5 g de lecitina e 1,5 g de amido. A solução foi filtrada

utilizando como meio o papel filtro. Obtendo-se 8,06 mL da solução que foram misturados por gotejamento lento a solução de 2 g de caseína, onde foram levadas a Banho Maria a 85 °C por duas horas. O material que havia decantado no fundo do Béquer (amido, lecitina extrato) foram submetidos a evaporação no banho Maria (90 °C) para evaporação do álcool. Após a secagem adicionou-se mais 1,79 g de amido, totalizando 3,147g, a massa formada passou por uma peneira para obtenção do produto final. Esta composição piloto mostrou-se com problemas de incompatibilidades farmacotécnicas e escurecimento. Foi detectado grande perdas com evaporação de substâncias voláteis (ésteres de cinamato e outros voláteis) durante o aquecimento.

Em seguida pesou-se 168 mg produto final que foi diluído para 30 ml de metanol, em seguida deixado no ultrassom por 5 minutos, onde houve a decantação do amido (que foi desprezado ao transferir a solução para o filtro) onde foram realizadas as diluições para serem submetido a leitura no UV ( $\lambda = 209$  nm e 315 nm).

**Formulação 2** (18% de extrato): Em um béquer foi solubilizado 1,5g de lecitina em 30,2 mL do extrato de própolis verde (correspondente a 3,75g de extrato de própolis verde) com auxílio de um bastão de vidro. A solução foi levada ao banho ultrassônico para facilitar a solubilização. Logo após, a solução (extrato PV+Lecitina) foi adicionada por meio de gotejamento lento à 15 g de amido previamente dessecado, homogeneizando com o bastão de vidro. Posteriormente, a solução final contida no béquer foi protegida com parafilme com pequenos furos a fim de facilitar a evaporação do álcool e incorporação dos demais componentes durante 4 horas.

Ao final deste período e após verificar a umidade relativa da massa (15% UR). A massa formada passou por processo de granulação a frio com auxílio de uma peneira comum de tamanho médio, formando os granulados com umidade relativa de 3%, após determinação em balança de infravermelho. A pesagem em balança analítica demonstrou uma quantidade de 19,568g, com rendimento médio obtido de 96,63%, e acondicionados em frasco plástico branco.

**Formulação 3** (18%): Em um béquer foi solubilizado 16,5 g de amido de milho previamente dessecado em 30,2 mL do extrato de própolis verde

(correspondente a 3,75g de extrato de própolis verde) com auxílio de um bastão de vidro. A solução foi levada ao banho ultrassônico para facilitar a solubilização. Posteriormente, a solução final contida no béquer foi protegida com parafilme com pequenos furos a fim de facilitar a evaporação do álcool durante 5 horas.

Ao final deste período, a massa formada passou por processo de granulação a frio com auxílio de uma peneira comum de tamanho médio, formando os elados. Como os granulados obtidos ainda apresentavam umidade, foram levados à balança determinadora de umidade a 105°C por 23 minutos, perdendo 11,1% de umidade e adquirindo aspecto mais seco. Esses granulados foram pesados em balança analítica, totalizando 18,043g, com rendimento médio obtido de 89,10%, e acondicionados em frasco plástico branco.

**Formulação 4 (25%):** Em um béquer foi solubilizado 18 g de amido de milho previamente dessecado em 50 mL do extrato de própolis verde (correspondente a 6,215g de extrato de própolis verde) com auxílio de um bastão de vidro. A solução foi levada ao banho ultrassônico para facilitar a solubilização. Posteriormente, a solução final contida no béquer foi protegida com parafilme com pequenos furos a fim de facilitar a evaporação do álcool durante 7 dias. Ao final, a massa formada passou por processo de granulação a frio com auxílio de uma peneira comum de tamanho médio, formando os granulados. Como os grânulos obtidos ainda apresentavam umidade, foram levados à balança determinadora de umidade a 105 °C por 28 minutos, perdendo 9% de umidade e adquirindo aspecto mais seco. Esses granulados foram pesados em balança analítica, totalizando 20,079g, com rendimento médio obtido de 99%, e acondicionados em frasco plástico branco.

**Formulação 5 (25%):** Em um béquer foi solubilizado 1,5g de lecitina em 50 mL do extrato de própolis verde (correspondente a 6,215g de extrato de própolis verde) com auxílio de um bastão de vidro. A solução foi levada ao banho ultrassônico para facilitar a solubilização. Após isso, a solução foi adicionada por meio de gotejamento lento no béquer contendo 16,5 g de amido previamente dessecado, homogeneizando com o bastão de vidro. Posteriormente, a solução final contida no béquer foi protegida com parafilme com pequenos furos a fim de facilitar a evaporação do álcool e incorporação dos demais componentes durante 7 dias. Ao final, a massa formada passou por processo de granulação a frio com

auxílio de uma peneira comum de tamanho médio. Como os grânulos obtidos ainda apresentavam umidade, foram levados à balança determinadora de umidade a 105 °C por 32 minutos, perdendo 9,81% de umidade e adquirindo aspecto mais seco. Esses microencapsulados foram pesados em balança analítica, totalizando 19,244g, com rendimento médio obtido de 95,03%, e acondicionados em frasco plástico branco.

**Figura 6.** Aspecto geral da massa do encapsulado 2 formado após a mistura dos componentes antes do processo de obtenção dos granulados.



Fonte: Autora, 2021.

#### **4.11 Caracterização da capacidade de sequestro de radical DPPH dos Extratos e Microencapsulado de Própolis Verde de Alagoas**

A preparação da solução estoque de DPPH (2,2-Difenil-1-Picril-Hidrazila) foi obtida mediante a pesagem de 4 mg de DPPH, em um béquer, em uma balança analítica, seguida da dissolução deste reagente em etanol absoluto, em um balão volumétrico (âmbar) de 100 ml, obtendo-se uma solução de DPPH a 0,1 mM, a qual foi mantida sob refrigeração e protegida da luminosidade. Em solução etanólica, o radical DPPH possui coloração violeta.

##### **4.11.1 Preparo das diluições para reação com DPPH**

A partir das soluções trabalho de cada formulação obtidas anteriormente, foram transferidas alíquotas de 50, 100, 150, 250, 375 e 500 µL para balões volumétricos de 5 mL. Em cada balão foram adicionados 2 mL da solução estoque de DPPH e houve preenchimento com etanol absoluto até o menisco, ou seja, obtiveram-se, respectivamente, as concentrações de 10, 20, 30, 50, 75 e 100 µg/mL. A reação foi iniciada e os balões volumétricos foram armazenados

ao abrigo da luz durante 30 minutos. Ao término da reação, as soluções foram analisadas em um espectrofotômetro UV-Vis, no modo “fotometria”, com comprimento de onda ( $\lambda$ ) programado para 518 nm.

## **4.12 Análise Térmica**

### **4.12.1 Termogravimetria (TG)**

A análise térmica dos granulados de própolis verde de Alagoas foi realizada em um analisador termogravimétrico TGA SHIMADZU, usando amostra dois de 4,5 a 6 mg de amostra. O peso inicial foi estabilizado a 25 °C e curva de aquecimento foi de 10°Cmin<sup>-1</sup> até 900°C. O procedimento consumiu média 90 minutos além de 30 minutos adicionais para o resfriamento do aparelho. As curvas de termo decomposição foram adquiridas por um microcomputador acoplado ao instrumento, utilizado o programa TA-60 WS (SHIMADZU), a uma razão de um ponto a cada 0,5 segundos.

### **4.12.2 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)**

A Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) foi realizada para os granulados de própolis verde de Alagoas em um calorímetro modelo DSC-60 da Shimadzu, onde, foi pesado entre 2,0 e 2,5 mg, respectivamente, em um cadinho de alumina hermeticamente fechado. A taxa de aquecimento foi de 10 °C min<sup>-1</sup> na faixa de temperatura de 25 a 600 °C sob atmosfera de nitrogênio com fluxo de 50 mL min<sup>-1</sup>.

## **4.13 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)**

A análise MEV foi utilizada para caracterizar a morfologia das partículas no estado sólido dos granulados de própolis verde. Foi realizado em microscópio eletrônico de varredura MEV, da marca TESCAN, O MEV foi operado a 5 kV com ampliação de foco na faixa de 457 a 1800 vezes. Usou-se campo de visão entre 454  $\mu$ m e 115  $\mu$ m e escalas de 20  $\mu$ m e 500  $\mu$ m para visualizar as fotomicrografias. A varredura do pó se deu em diferentes pontos que variaram entre 300 e 4000 vezes. As análises foram realizadas no departamento de química do Instituto Federal de Alagoas (IFAL).

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Determinação de Fenóis e Flavonoides Totais no Extrato de Própolis Verde Lote 5319/2019

Os ensaios de teor de flavonoides e fenóis totais demonstraram concentrações de 20,58% para fenóis totais e 2,92 % para flavonoides totais (tabela 6). De acordo como Ministério de Agricultura Pecuária e Abastecimento, os extratos etanólicos de própolis devem conter, no mínimo, 0,50% (m/m) de fenólicos e 0,25% (m/m) de flavonoides (Brasil, 2001). As amostras avaliadas estão dentro dos padrões estabelecidos pela legislação brasileira.

**Tabela 6** - Teor de fénois totais e flavonoides totais no extrato comercial de própolis verde.

| Concentração do Extrato (µg/mL) | Teor de ácido gálico(média±DPR) |      |      |      |      | Teor de fenóis totais no extrato(média±DPR) |       |       |             |      |
|---------------------------------|---------------------------------|------|------|------|------|---|-------|-------|-------------|------|
|                                 | 50                              | 9,40 | 9,38 | 9,37 | 9,38 | 0,14  | 18,79 | 18,75 | 18,75       | 15,9 |
| 37,5                            | 7,27                            | 7,34 | 7,28 | 7,30 | 0,54 | 19,5  | 19,40 | 19,58 | 18,40 20,58 |      |
| 25                              | 5,93                            | 5,86 | 5,86 | 5,88 | 0,64 | 21,1  | 23,70 | 23,44 | 23,45       |      |

| Concentração do Extrato (µg/mL) | Teor de quercetina(média±DPR) |      |      |      |      | Teor de flavonoides totais no extrato (média±DPR) |      |      |          |      |
|---------------------------------|-------------------------------|------|------|------|------|---|------|------|----------|------|
|                                 | 110                           | 3,22 | 3,30 | 3,22 | 3,25 | 1,46  | 2,93 | 2,92 | 3,00     | 2,95 |
| 100                             | 2,95                          | 3,05 | 2,94 | 2,98 | 1,98 | 2,95  | 3,05 | 2,94 | 2,98     |      |
| 90                              | 2,62                          | 2,68 | 2,60 | 2,63 | 1,72 | 2,91  | 2,98 | 2,89 | 2,932,92 |      |
| 80                              | 2,34                          | 2,42 | 2,33 | 2,36 | 2,05 | 2,93  | 3,02 | 2,91 | 2,95     |      |
| 70                              | 2,01                          | 1,91 | 1,91 | 1,94 | 2,88 | 2,87  | 2,73 | 2,73 | 2,78     |      |

### 5.2 Espectro de Varredura UV-VIS do Extrato de Própolis Verde

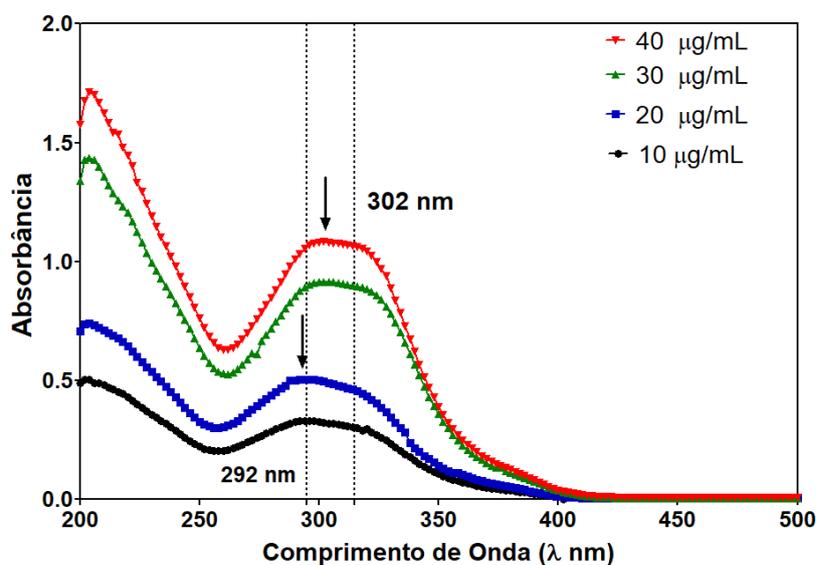
Um parâmetro físico-químico muito utilizado para avaliar o perfil e a qualidade da própolis é através do seu espectro de absorção nas regiões do ultravioleta e visível (UV-VIS), parâmetro exigido inclusive pela legislação brasileira (SOUSA et al., 2019).

É importante considerar que o espectro de absorção da radiação UV-Vis

na região de 200 a 400 nm é utilizado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) à avaliação da qualidade dos extratos de própolis comercializados no Brasil (MAPA, 2001). A presença de bandas intensas com máximos de absorção em torno de 280, 330 e 340 nm como foi encontrada no estudo pode indicar a presença de derivados de ácidos cinâmicos (como ácidos cafeoilquínicos) e de uma classe de fenólicos denominados flavonoides (como canferol, apigenina, canferida), comuns em própolis de *Apis mellifera*. (SOUSA et al., 2019).

Substâncias polifenólicas (flavonoides e ácidos fenólicos) são as principais responsáveis por diferentes propriedades biológicas da própolis e absorvem com considerável intensidade na região de 250 até 350 nm (MAPA 2001). Sendo assim compatível com a figura (6).

**Figura 7** – Perfis espectrais de UV-vis ( $\lambda = 200-500\text{nm}$ ) de extratos de Própolis Verde



Fonte: AUTORA, 2021

Estudo realizado por SCALOTONI, 2017 obteve como resultado que apesar do EEP vermelha apresentar maior quantidade de flavonoides totais e o conteúdo de fenólicos totais não apresentarem diferenças significativas para estes extratos, o EEP verde apresentou maior valor de absorbância comparado ao EEP vermelha, indicando maior quantidade de substâncias solúveis no processo de extração para própolis verde, sugerindo que estas substâncias solúveis absorvem neste comprimento de onda, entretanto, não seriam necessariamente fenólicas (SCATOLINI, 2017).

Outros autores já realizaram a análise espectrofotométrica de extratos hidroalcoólicos de própolis e reportaram valores próximos aos valores encontrados no presente estudo. Castro e colaboradores obtiveram EEP de diferentes regiões do Brasil e observaram picos máximos de absorção em 279 e 302 nm, atribuídos a presença de fenólicos totais (CASTRO et al., 2007). Os extratos de própolis verde em estudo apresentaram valores máximos de absorção na janela espectral dentro dos valores encontrados por Castro.

### 5.3 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência do Extrato de Própolis Verde

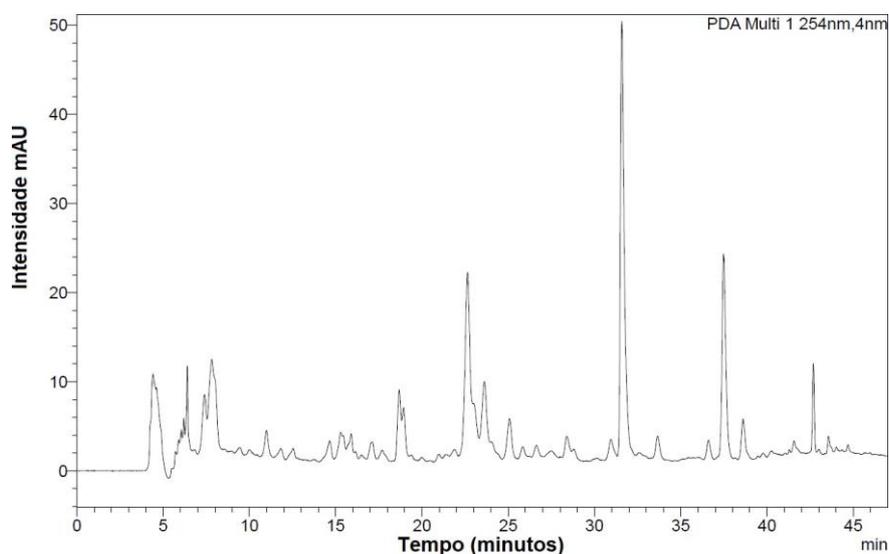
Os extratos etanólicos comerciais de própolis verde e suas fases Hexano:Acetato proveniente do extrato etanólico comercial de própolis verde

foram submetidos à análise por CLAE em escala analítica, de modo a traçar um possível perfil cromatográfico dos extratos. As figuras a seguir apresentam o perfil cromatográfico dos extratos etanólico e frações Hexano:Acetato da própolis verde (Apícola Cortiço).

Nesse perfil destaca-se a presença de uma substância majoritária, com pico com tempo de retenção em 22,66 min com comprimento de onda de 289 nm e pico 32 min com comprimento de onda de 313 nm (Própolis verde Cortiço®). Ambas as figuras apresentam esse pico majoritário em diferentes comprimentos de onda o espectro de UV referente a esse, diferenciando na separação de alguns outros compostos com o tempo de retenção próximos ao pico majoritário citado anteriormente.

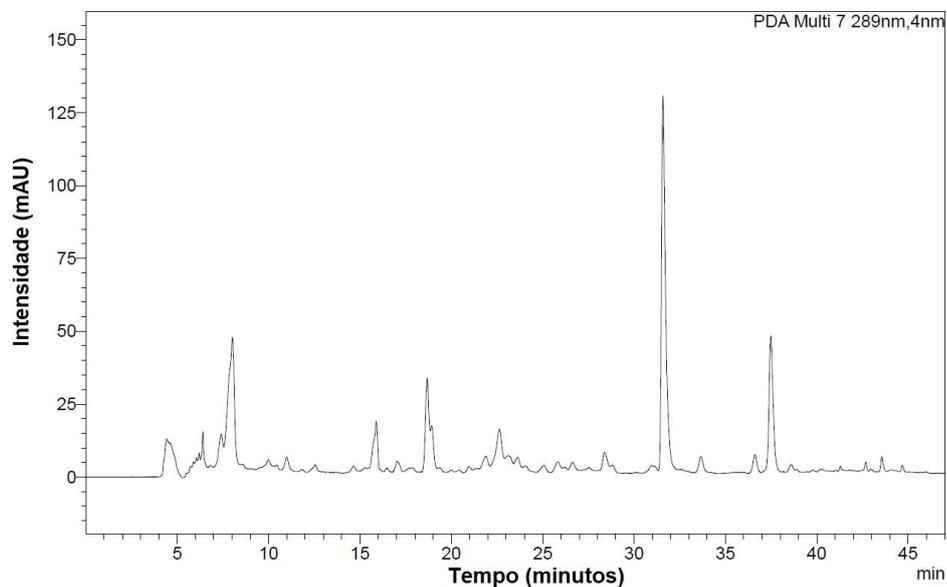
Nos comprimentos de onda 315 nm (gráfico 9) é possível observar uma maior quantidade de picos do que em 289 nm (gráfico 8), porém em 313 nm é possível observar picos mais definidos. A fração Hex:Acetato (7:3) e Hex:Acetato (5:5) foi enriquecida em termos de quantidade 3 vezes mais compostos fenólicos com tempo de retenção 22,6 min no comprimento de onda máximo 289 nm, enquanto o composto com tempo de retenção 32 min e comprimento de onda de 313 nm foi enriquecido em até 2,5 vezes.

**Figura 8** - Cromatograma do Extrato de Própolis Verde (produto comercial) Cortico\_5319\_2019 no comprimento de onda de 254 nm. Presença de picos cromatográficos no extrato de própolis verde da Apícola O Cortiço.



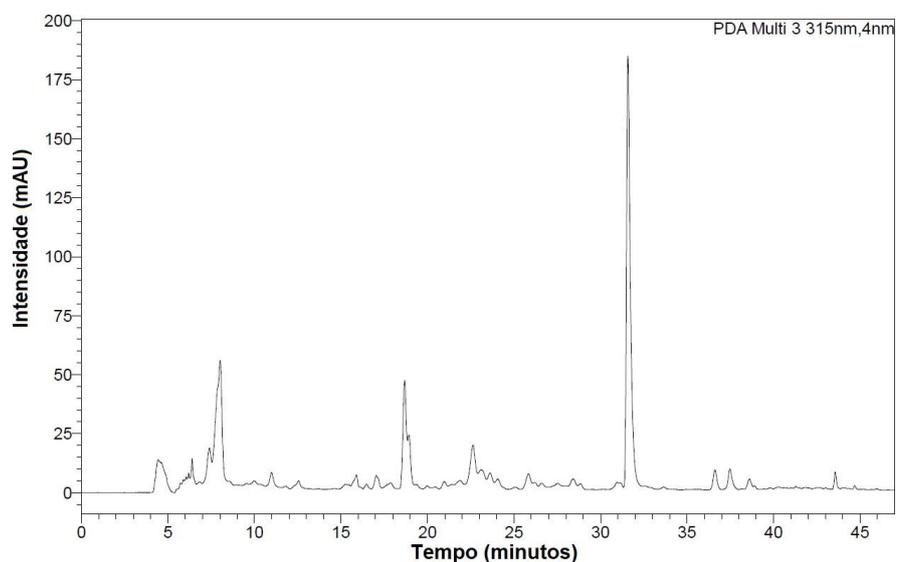
Fonte: Autora, 2021

**Figura 9** – Cromatograma do Extrato de Própolis Verde (produto comercial) Cortico\_5319\_2019 no comprimento de onda de 289 nm. Presença de picos cromatográficos majoritários em 8, 15, 19, 32 e 38 minutos no extrato de própolis verde da Apícola O Cortiço.



Fonte: Autora, 2021

**Figura 10** - Cromatograma dos Extratos de Própolis Verde (produto comercial) Cortico\_5319\_2019 no comprimento de onda de 315 nm. Presença de pico cromatográfico majoritário em 32 minutos no extrato de própolis verde da Apícola O Cortiço.



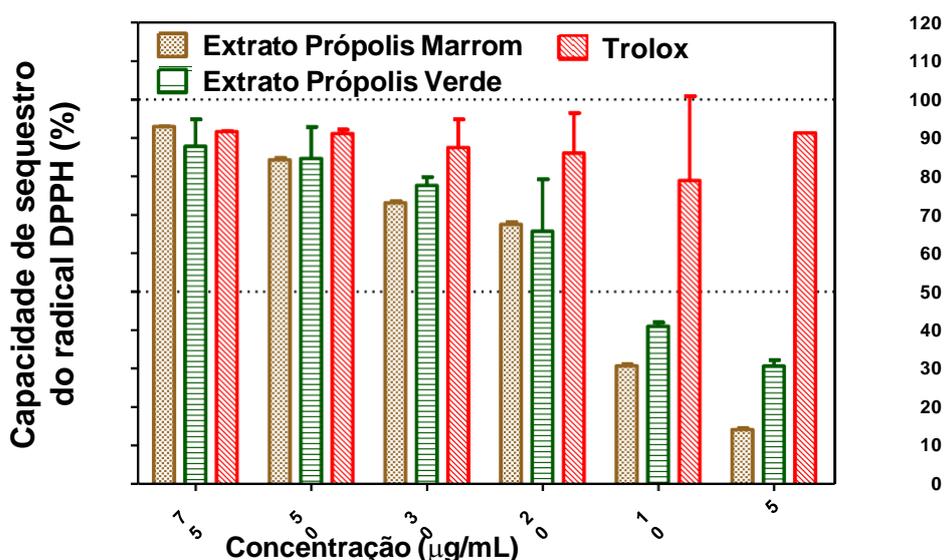
Fonte: Autora, 2021

Os resultados obtidos por técnica moderna de UPLC-DAD mostram a autenticidade da amostra de extrato de própolis verde (Cortico\_Lote\_5319\_2019) analisada.

#### 5.4 Avaliação da capacidade de sequestro de radical DPPH do extrato da própolis verde

A porcentagem de atividade antioxidante (%AA) é equivalente à quantidade de DPPH consumida pelo antioxidante, sendo que a quantidade de antioxidante necessária para decrescer a concentração inicial de DPPH em 50% é denominada concentração eficiente ( $CE_{50}$ ), ou concentração inibitória ( $CI_{50}$ ). Sendo assim, quanto maior a concentração da amostra e menor a absorbância, maior o consumo de DPPH (SOUZA, et al., 2007).

**Figura 11** – Capacidade de sequestro de radical DPPH do Extrato de Própolis Verde (produtocomercial) Cortico\_23519\_2019 pelo método DPPH.



Fonte: Autora, 2021

A capacidade de sequestro de radical DPPH demonstrou atividade antioxidante com valores entre 53% e 91% do extrato de própolis verde da empresa Cortiço Lote 5319/2019. Os valores de  $IC_{50}$  para extrato de própolis verde e extrato de própolis marrom foram de 12,78 µg/mL e 19,31 µg/mL, respectivamente.

Segundo Oldoni (2007) essa alta atividade antioxidante está relacionada

com os compostos fenólicos, principalmente os flavonoides, que possuem atividade de sequestro de espécies reativas de oxigênio, incluindo os radicais hidroxil, peroxil e radicais superóxido, além de quelar metais de transição, impedindo assim, a formação de espécies reativas.

## 5.5 Atividade Antibacteriana do Extrato de Própolis Verde

### 5.5.1 Particionamento Líquido-Líquido do extrato da própolis verde

Foram obtidos os produtos de particionamento, de solventes que variaram nas concentrações de Hexano:Acetato de etila; 9:1, 1:1, 9:1 (V:V) e Etér:Acetato de etila 8:2 e 7:3 (V:V). Das duas extrações para cada solução, onde obtivemos a fase solvente 1, fase solvente 2 e a fase 3 (aquosa) de cada uma das partições preparadas. Sendo os particionamentos Hexano:Acetato 9:1 e Hexano:Acetato de etila 1:1 os mais amarelados e límpidos.

Figura 12 - Particionamento do extrato de própolis verde- o cortiço



Fonte: Autora, 2021

### 5.5.2 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)

Os particionamentos Hexano:Acetato de etila 9:1 e Hexano:Acetato de etila 1:1 apresentaram os melhores resultados para microdiluição em caldo, pois além de inibirem o *S. Aureus* (favorecendo seu uso em formulações com via de administração tópica), inibiu também os micro-organismos *Enterococcus* e *S. epidermidis* (tabela 7). Nossa hipótese é que o alto teor de ácidos cinâmicos prenilados do tipo artepelina C e flavonoides encontrados, respectivamente, nessas fases tenha contribuído para melhor atividade antimicrobiana.

BURDOCK, 1998 afirmou que a atividade antimicrobiana da própolis foi ativa frente às espécies bacterianas, tanto gram-positivas quanto gram-

negativas. Porém, Valdés et al., 1989, ao avaliarem as características da própolis de diferentes zonas de província de Havana e suas propriedades antibacterianas, comprovaram que existe uma maior atividade frente às bactérias gram-positivas em relação às gram-negativas. Os prováveis mecanismos de atividade antibacteriana estão relacionados ao efeito sinérgico entre os compostos fenólicos, flavonoides e outros compostos orgânicos, principalmente pinocembrina, pinobaksina e galangina (BURDOCK, 1998).

Andrade (2010) conforme citado do Almeida (2013) relata que a atividade antimicrobiana pode ser dada devido aos compostos fenólicos que podem ativar ou aumentar a atividade da enzima lisozima, responsável pela desestabilização da parede celular bacteriana. Devido às diferenças estruturais entre as paredes celulares de bactérias Gram-negativas e Gram-positivas e as bactérias gram-positivas são consideradas mais sensíveis aos agentes antibacterianos, devido a portarem uma parede celular composta por peptidoglicanos, enquanto que as bactérias Gram-negativas possuem uma camada adicional rica em lipopolissacáridos, o que dificulta a lise de suas paredes (Mizoerva *et al.*, 1997).

Várias pesquisas demonstram a atividade antimicrobiana, Castro et al., 2007, em ensaios *in vitro*, concluíram que tanto o extrato etanólico quanto a fração hexânica da própolis inibiam o crescimento de *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus mutans*.

Os resultados demonstram que o extrato de própolis verde demonstrou atividade antimicrobiana e podem ser aplicados em terapias antibióticas naturais para bactérias gram-positivas e especialmente, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus epidermidis*.

**Tabela 7.** Produtos do particionamento submetidos a técnica de microdiluição para os microorganismos: *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus epidermidis* e *Pseudomonas aeruginosa*

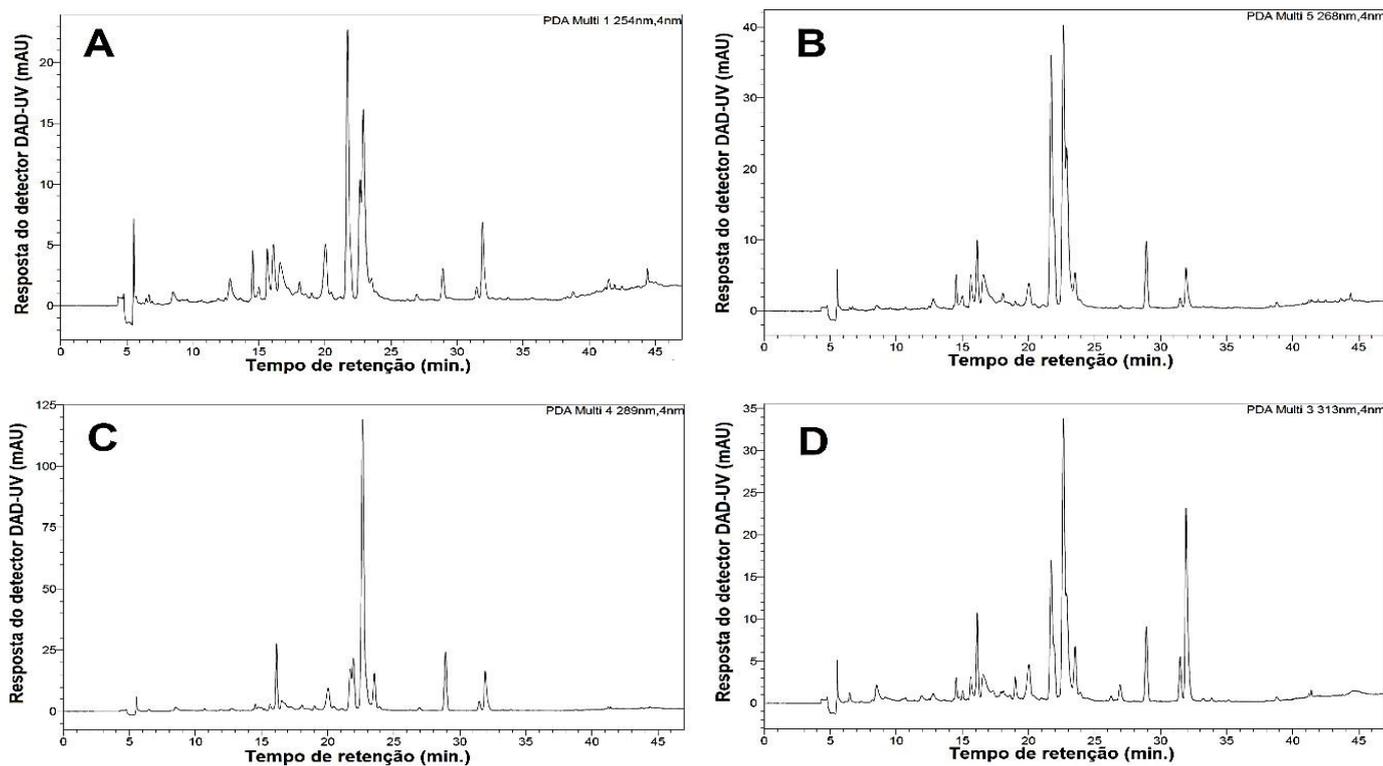
| MICROORGANISMOS<br>EXTRATO/FRAÇÕES | <i>Staphylococcus</i>            | <i>Enterococcus</i>                | <i>Staphylococcus</i>                 | <i>Pseudomonas</i>                   |
|------------------------------------|----------------------------------|------------------------------------|---------------------------------------|--------------------------------------|
|                                    | <i>aureus</i><br>(Gram-positivo) | <i>faecalis</i><br>(Gram-positivo) | <i>epidermidis</i><br>(Gram-positivo) | <i>aeruginosa</i><br>(Gram-negativo) |
| PV Hexano/Acetato 1:9              | <b>1024 µg/mL</b>                | > 1024 µg/mL                       | > 1024 µg/mL                          | > 1024 µg/mL                         |
| PV Hexano/Acetato 9:1              | <b>512 µg/mL</b>                 | <b>128 µg/mL</b>                   | <b>256 µg/mL</b>                      | > 1024 µg/mL                         |
| PV Hexano/Acetato 1:1              | <b>512 µg/mL</b>                 | <b>256 µg/mL</b>                   | <b>512 µg/mL</b>                      | > 1024 µg/mL                         |
| PV Éter/Acetato 8:2                | <b>256 µg/mL</b>                 | > 1024 µg/mL                       | > 1024 µg/mL                          | > 1024 µg/mL                         |
| PV Éter/Acetato 7:3                | <b>512 µg/mL</b>                 | > 1024 µg/mL                       | > 1024 µg/mL                          | > 1024 µg/mL                         |

Fonte: Autora, 2021

### 5.5.3 Cromatografia líquida de alta eficiência das partições líquido-líquido

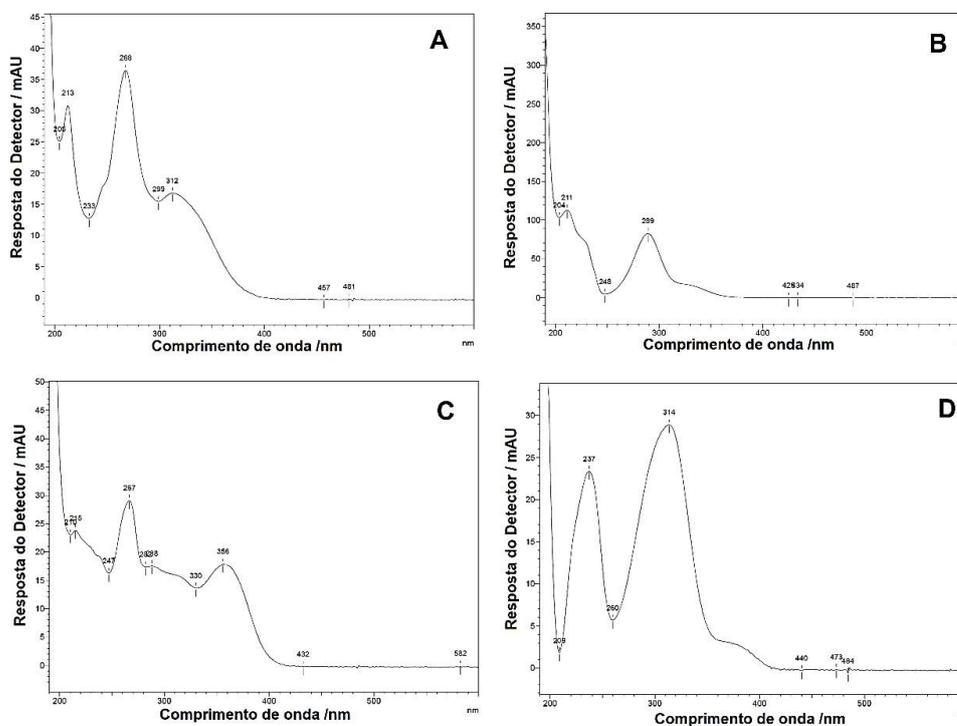
As fases Hexano:Acetato de etila (9:1) e (1:1) submetidas aos ensaio microbiológico e ao ensaio cromatográfico apresentaram perfil cromatográfico semelhante nos comprimentos de onda de 254 nm, 268 nm, 289 nm e 313 nm (figura13). Após o enriquecimento das amostras pela técnica de particionamento, observou-se picos cromatográficos intenso na faixa de tempo de retenção entre 20 e 32 minutos. Alguns picos cromatográfico foram analisados utilizando a varredura do pico cromatográfico na faixa de 200 a 600nm. O dados mostram a presença de bandas de absorção em comprimentos de onda na faixa de 235 a 291 nm e 340 a 370 nm que são características de flavonoides e comprimentos de onda 314 a 325 nm característicos de ácidos cinâmicos.

**Figura 13** - Perfil cromatográfico da fase Hexano:acetato 1:1 do extrato de própolis verde



Fonte: Autora, 2020.

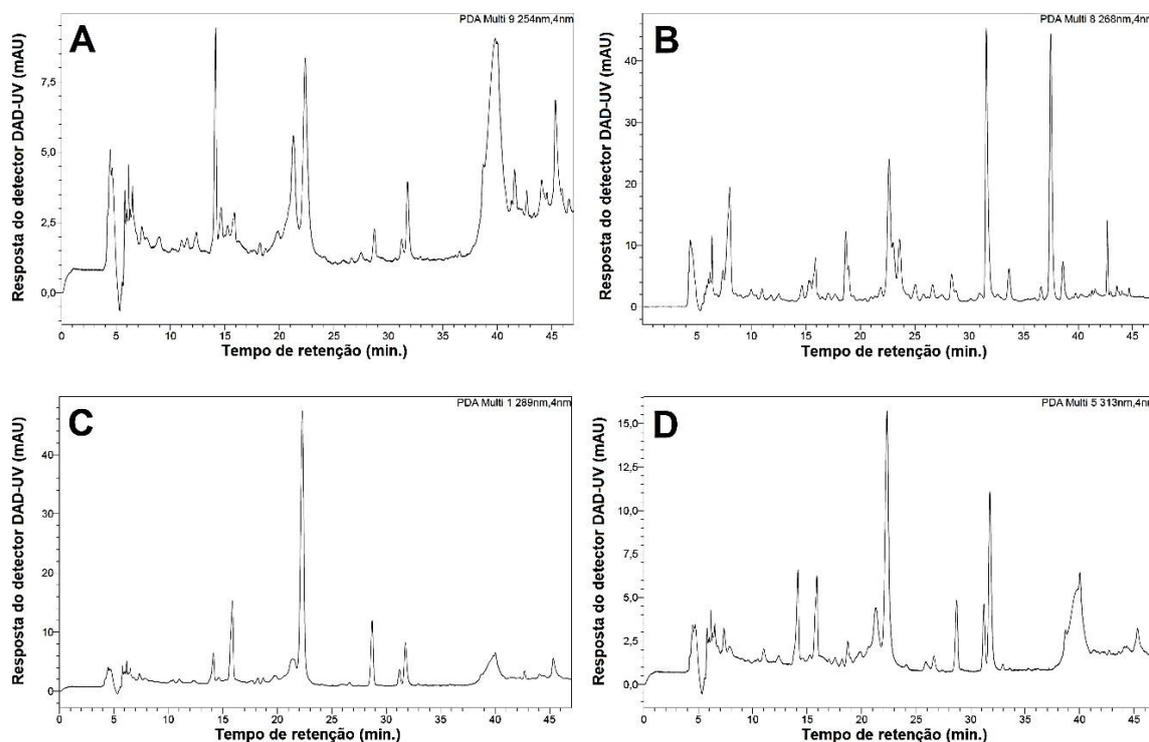
**Figura 14** – Espectro UV-Vis dos principais picos cromatográficos da fase Hexano:acetato 1:1 originado do extrato de própolis verde



Fonte: Autora, 2020.

O Pico cromatográfico 21,6 minutos apresentou comprimentos de onda máximo em 268 e 312 nm. Pico cromatográfico em 22,6 minutos apresentou comprimento de onda máximo em 289 nm. Pico cromatográfico em 22,9 minutos apresentou comprimentos de onda máximo em 267 e 356 nm e pico cromatográfico 31,9 minutos apresentou comprimento de onda máximo de 237 e 314 nm.

**Figura 15** - Cromatograma do Extrato de Própolis Marrom esverdeada de União dos Palmares nos comprimentos de onda de (A) 254 nm, (B) 268 nm, (C) 289 nm e (D) 313 nm. Presença de picos cromatográficos no extrato de própolis marrom.



Fonte: Autora, 2020.

## 5.6 Obtenção do Microencapsulado de Própolis Marrom Esverdeado

O microencapsulado, (Figura 16) apresentou coloração marrom claro, aroma característico da própolis verde e aspecto leve, e homogêneo a olho nu, aparentemente um pó higroscópico. O rendimento do pó foi aproximadamente 27,28% do percentual esperado, teve como peso final 9,824g considerando a perda natural provocada pelo equipamento.

**Figura 16** - Microcápsula de própolis marrom-esverdeado do extrato comercial de própolis de União dos



Palmares.

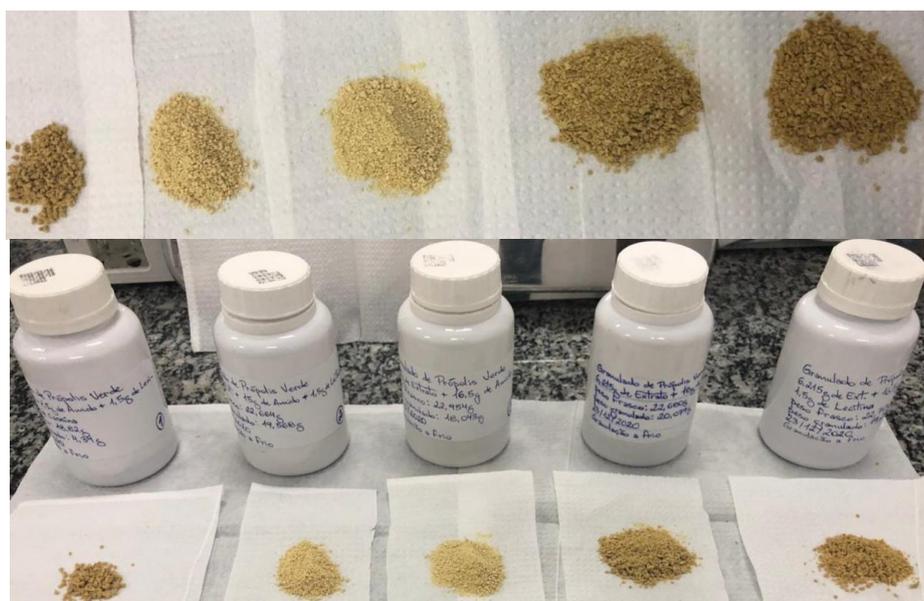
Fonte: Autora, 2021.

## 5.7 Obtenção e Caracterização dos Granulados

### 5.7.1 Obtenção dos granulados de própolis verde

Foram preparadas 5 formulações de extrato de própolis verde. A figura 17 mostra as características organolépticas destas composições que apresentaram coloração que variaram entre bege claro e marrom claro, aroma característico da própolis e aspecto leve, e homogêneo a olho nu, aparentemente um pó higroscópico.

**Figura 17** - Formulações de extrato de própolis verde em concentrações diferentes.

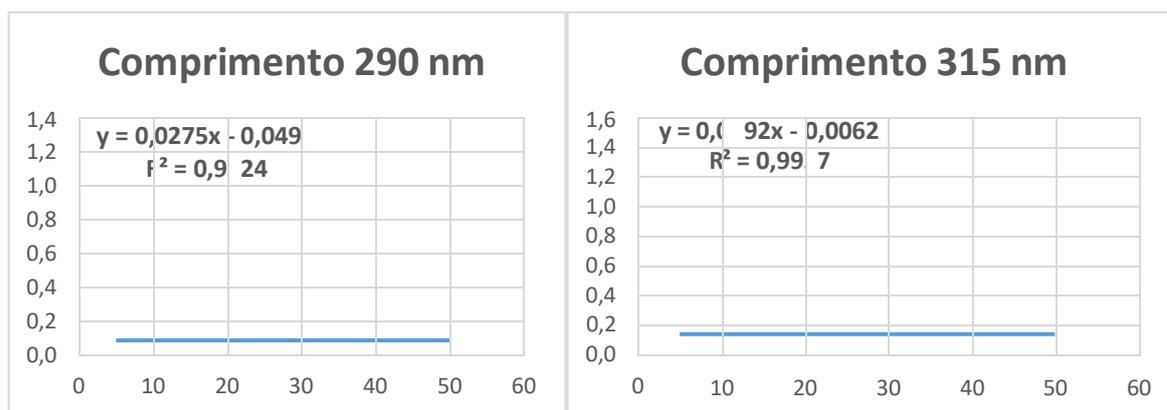


Fonte: Autora, 2021.

### 5.7.2 Determinação do grau de encapsulação

Para se obter os dados quantitativos da própolis verde comercial em estudo, foram construídas curvas analíticas com  $R^2$  maiores que 0,99. O método apresentou linearidade, precisão intermediária e exatidão na faixa de concentração entre 5 e 50.

**FIGURA 18** - Curva de calibração do extrato de própolis verde- Validação do método.



Fonte: Autora, 2021.

Com base nos resultados obtidos foi verificado o grau de encapsulação dos formulados 2, 3, 4 e 5 pois eles apresentaram melhor granulação e aroma característico da própolis verde e aspecto leve, e homogêneo a olho nu, aparentemente pouco higroscópico.

**Tabela 8** - Grau de encapsulação dos formulados de própolis Verde.

| GRAU DE ENCAPSULAÇÃO      | MULÇAÇÃO2 (%) | MULÇAÇÃO3 (%) | MULÇAÇÃO4 (%) | MULÇAÇÃO5 (%) |
|---------------------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| $\lambda = 290\text{nm}$  | 78,49         | 72,35         | 74,75         | 83,27         |
| $\lambda = 315\text{ nm}$ | 74,23         | 80,66         | 71,92         | 72,55         |

Fonte: AUTORA, 2021

A microencapsulação é uma tecnologia utilizada com o objetivo de recobrir pequenas partículas sólidas, líquidas ou gasosas, conhecidas como material de recheio, núcleo ou ativo são revestidas por um material de parede,

formando partículas denominadas microcápsulas, micropartículas, ou microesferas, apresentando diferenças na morfologia e estrutura interna, as quais podem liberar o conteúdo de forma controlada e sob condições específicas. (PEZZIN; MEIER, 2015)

Diversas indústrias, tais como a de alimentos, a farmacêutica, de cosméticos e a de higiene e limpeza, utilizam técnicas de encapsulação em seus produtos, sendo diversas as finalidades que justificam o emprego dessas tecnologias. A encapsulação forma uma barreira entre o composto ativo e o ambiente externo a fim de proteger o composto contra condições adversas do ambiente (umidade, pH, temperatura, luz, oxigênio, enzimas etc.), e prevenir o contato com outros componentes presentes na formulação de produtos. Seja durante a estocagem, ou no próprio organismo de quem ingerir, garantindo maior estabilidade do composto do que se ele estivesse livre (DE MENDONÇA et al., 2015) A utilização de tecnologias de microencapsulação em compostos fenólicos tem o objetivo de manter a bioatividade e aumentar a estabilidade e biodisponibilidade dessas moléculas, garantindo seus efeitos benéficos. Além da proteção aos compostos, a encapsulação pode mascarar aspectos sensoriais indesejáveis (FANG; BHANDARI, 2010).

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

Como materiais encapsulantes são normalmente utilizados, para aplicação em alimentos, os polissacarídeos (maltodextrinas, ciclodextrinas, goma arábica, pectina, amidos, amidos modificados, alginatos, etc.), proteínas (glúten, caseína, gelatina, albumina, hidrolisados proteicos, etc.) e também alguns lipídeos (mono diacilgliceróis, óleos e gorduras) são, muitas vezes, adicionados aos alimentos para minimizar a perda de compostos ativos, além de atuar como agentes de encapsulação para melhorar ou modificar a composição física e

química de um produto (FÁVARO-TRINDADE; PINHO; ROCHA, 2008; AUGUSTIN; HEMAR, 2008 ) (RAJAB et. al. 2015). Diferentes substâncias têm sido avaliadas como material de parede na encapsulação da própolis, por distintas técnicas como: utilização de gelatina e manitole encapsulação por spray drying para manter a propriedade antimicrobiana frente a *S. aureus* (BRUSCHI et al. 2003); de poli ( $\epsilon$ -caprolactona) por emulsificação/evaporação de solventes para promover a liberação controlada e manter a atividade antimicrobiana frente a bactéria *Streptococcus mutans* (DURÁN et al. 2007); de proteína isolada de soja e pectina por coacervação complexa para manter a atividade antioxidante e a estabilidade dos compostos fenólicos e dos flavonoides em diferentes temperaturas pelo período de seis meses (NORI et al. 2011); e de gomaarábica e amido OSA por spray drying para produzir microcápsulas estáveis (da SILVA et al. 2013).

Os valores encontrados (Tabela 8) foram utilizados para determinar a eficiência de encapsulação. A Eficiência do grau de encapsulação para os granulados apresentou maior encapsulação para formulação 5 no ( $\lambda = 290 \text{ nm}$ ) de 83,27 % e menor na formulação 4 ( $\lambda = 315 \text{ nm}$ ) de 71,92% . Pode-se observar que a eficiência de encapsulação das micropartículas variou de acordo com a concentração do material de parede utilizado e com o composto fenólico analisado. No trabalho de Nascimento et al. (2016), apesar dos autores terem encontrado alta eficiência de encapsulação do EP (38,0% a 99,0%) para alguns dos flavonoides nanoencapsulados, as perdas foram superiores a 50%. Da Rosa et al. (2014), ao encapsularem compostos fenólicos de amora, não encontraram nenhuma matriz capaz de encapsular equitativamente todos os compostos originalmente identificados no extrato fenólico.

A eficiência da encapsulação pode estar relacionada a diversos fatores, como a interação entre os compostos bioativos e o material de parede (Da ROSA et al., 2014; Dos REIS et al., 2017). Além disso, a intensidade em que os compostos são afetados pode variar de acordo com o perfil de composição da própolis, a qual pode apresentar compostos mais ou menos suscetíveis a altas temperaturas (Da SILVA et al., 2011).

### 5.7.3 Atividade antioxidante dos encapsulados de própolis verde

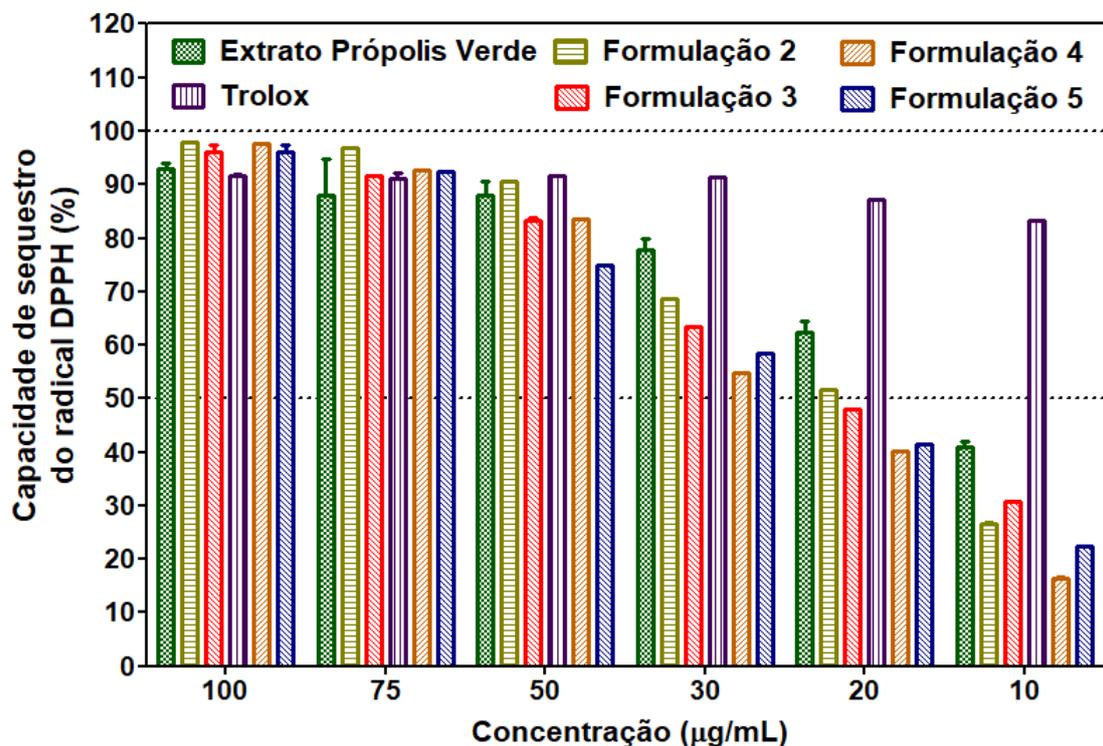
A porcentagem de atividade antioxidante (%AA) é equivalente à quantidade de DPPH consumida pelo antioxidante, sendo que a quantidade de antioxidante necessária para decrescer a concentração inicial de DPPH em 50% é denominada concentração eficiente ( $CE_{50}$ ), ou concentração inibitória ( $CI_{50}$ ). Quanto maior o consumo de DPPH por uma amostra, menor será a sua  $CE_{50}$  e maior a sua atividade antioxidante. Sendo assim, quanto maior a concentração da amostra e menor a absorbância, maior o consumo de DPPH (SOUZA, et al., 2007).

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

O granulado de própolis verde apresentou percentual de atividade antioxidante de 96,07% para formulação 3 e 97,55% para formulação 4 na concentração de 100  $\mu\text{g/ml}$  tendo sua atividade diminuída proporcionalmente com a diminuição da concentração atingindo atividade de 11,51% na formulação 4 e 22,45% na formulação 5 na menor concentração 10  $\mu\text{g/mL}$  (gráfico 6).

Segundo Oldoni (2007) essa alta atividade antioxidante está relacionada com os compostos fenólicos, principalmente os flavonoides, possuem atividade de sequestro de espécies reativas de oxigênio, incluindo os radicais hidroxil, peroxil e radicais superóxido, além de quelar metais de transição, impedindo assim, a formação de espécies reativas.

**Figura 19** – Gráfico com Percentagens do sequestro de radical DPPH das Formulações Contendo Extrato Bioativo da própolis verde.



Fonte: AUTORA, 2021

Os dados gráficos da atividade antioxidante foram utilizados para calcular o IC<sub>50</sub> mostraram que o extrato de própolis verde apresentou um valor de IC<sub>50</sub> de 12,80 µg/mL. Comparando os granulados de própolis verde, as formulações 2 e 3 apresentaram melhores valores de IC<sub>50</sub> em relação aos granulados 4 e 5. As formulações 4 e 5 apresentaram maiores tempos de processamento (7 dias) em relação as composições 2 e 3. Este maior tempo de processamento pode ter promovido uma volatilização de constituintes ativos presentes no extrato de própolis verde reduzindo assim a sua capacidade antioxidante.

**Tabela 9** - Determinação da IC<sub>50</sub> do extrato de própolis verde e seus granulados

| Extrato PV | Determinação da IC <sub>50</sub> (µg/mL) |                    |                   |                    |        |
|------------|--|--------------------|-------------------|--------------------|--------|
|            | Formulação 2 (18%)                       | Formulação 3 (18%) | Formulação 4 (5%) | Formulação 5 (25%) | Trolox |
| 12,80      | 18,48                                    | 20,44              | 26,13             | 23,37              | < 10   |

Fonte: Autora, 2021

## 5.8 Determinação de Fenóis e Flavonoides Totais nos granulados de Própolis Verde e extrato spray-dryer de própolis marrom

Amostra comercial de própolis verde Lote 2020 demonstrou teores de fenóis totais para as formulações demonstraram concentrações de (13,88%) para extrato de própolis verde, (9,06%) para granulado formulação 2, (9,37%) para granulado formulação 3, (9,49%) para granulado formulação 4, (9,13%) granulado formulação 5. O extrato de própolis marrom apresentou teores de (14,47%) e (9,13%) para o formulado spray-dryer. Foram encontradas diferenças significativas entre extrato própolis verde e granulados de própolis verde, Diferenças significativas entre extrato de própolis marrom e extrato seco spray-dryer de própolis marrom; sem nenhuma diferença significativa entre extrato de própolis verde e extrato de própolis marrom. De acordo com o Ministério de Agricultura Pecuária e Abastecimento, os extratos etanólicos de própolis devem conter, no mínimo, 0,50% (m/m) de fenólicos. As amostras avaliadas estão dentro dos padrões estabelecidos pela legislação brasileira.

**Tabela 10** - Determinação de fenóis totais usando ácido gálico como padrão analítico pelo método Folin-Ciocalteu no extrato de própolis verde.

| Conc. Ext Propolis verde | Determinação de ác. gálico<br>(µg/mL) |       |       | Determinação de ác. gálico<br>(%) |        |       |
|--------------------------|---------------------------------------|-------|-------|-----------------------------------|--------|-------|
|                          | Média                                 | DP    | %CV   | Média                             | DP     | %CV   |
| 50                       | 7,242                                 | 0,001 | 0,012 | 14,483                            | 0,002  | 0,012 |
| 44,5                     | 6,597                                 | 0,001 | 0,013 | 14,824                            | 0,002  | 0,013 |
| 39                       | 5,716                                 | 0,002 | 0,041 | 14,656                            | 0,006  | 0,041 |
| 28                       | 3,852                                 | 0,001 | 0,035 | 13,758                            | 0,005  | 0,035 |
| 20                       | 2,622                                 | 0,001 | 0,020 | 12,607                            | 0,002  | 0,020 |
| Total                    | -                                     | -     | -     | <b>13,885</b>                     | 0,9270 | 6,676 |

**Tabela 11** - Determinação de fenois totais usando ácido gálico como padrão analítico pelo método Folin-Ciocalteu no granulado formulação 2

| Conc. Equi. Ext. Propolis verde | Determinação de ác. galico<br>( $\mu\text{g/mL}$ ) |       |       | Determinação de ác. galico<br>(%) |       |       |
|---------------------------------|--|-------|-------|-----------------------------------|-------|-------|
|                                 | Média  | DP    | %CV   | Média                             | DP    | %CV   |
| 90                              | 8,148  | 0,003 | 0,033 | 9,053                             | 0,003 | 0,033 |
| 80                              | 7,789  | 0,005 | 0,067 | 9,737                             | 0,007 | 0,067 |
| 70                              | 6,031  | 0,002 | 0,037 | 8,616                             | 0,003 | 0,037 |
| 50                              | 4,596  | 0,002 | 0,040 | 9,192                             | 0,004 | 0,040 |
| 37,5                            | 3,206  | 0,002 | 0,070 | 8,549                             | 0,006 | 0,070 |
| Total                           | -  | -     | -     | <b>9,061</b>                      | 0,438 | 4,833 |

**Tabela 12** - Determinação de fenois totais usando ácido gálico como padrão analítico pelo método Folin-Ciocalteu no granulado formulação 3

| Conc. Equi. Ext. Propolis verde | Determinação de ác. galico<br>( $\mu\text{g/mL}$ ) |       |       | Determinação de ác. galico<br>(%) |        |        |
|---------------------------------|--|-------|-------|-----------------------------------|--------|--------|
|                                 | Média  | DP    | %CV   | Média                             | DP     | %CV    |
| 80                              | 7,290  | 7,293 | 7,297 | 9,113                             | 9,116  | 9,121  |
| 70                              | 6,537  | 6,539 | 6,542 | 9,339                             | 9,342  | 9,345  |
| 50                              | 4,524  | 4,525 | 4,530 | 9,048                             | 9,050  | 9,060  |
| 37,5                            | 4,107  | 4,107 | 4,106 | 10,951                            | 10,953 | 10,948 |
| 25                              | 2,102  | 2,105 | 2,109 | 8,409                             | 8,419  | 8,437  |
| Total                           | -  | -     | -     | <b>9,377</b>                      | 0,944  | 10,067 |

**Tabela 13** - Determinação de fenois totais usando ácido gálico como padrão analítico pelo método Folin-Ciocalteu no granulado formulação 4

| Conc. Equi. Ext. Propolis Verde | Determinação de ác. galico<br>( $\mu\text{g/mL}$ ) |       |       | Determinação de ác. galico<br>(%) |       |       |
|---------------------------------|--|-------|-------|-----------------------------------|-------|-------|
|                                 | Média  | DP    | %CV   | Média                             | DP    | %CV   |
| 90                              | 8,314  | 8,347 | 8,355 | 9,238                             | 9,275 | 9,284 |
| 80                              | 7,365  | 7,367 | 7,368 | 9,206                             | 9,208 | 9,210 |
| 70                              | 6,469  | 6,470 | 6,472 | 9,241                             | 9,243 | 9,246 |
| 50                              | 5,064  | 4,977 | 4,976 | 10,128                            | 9,954 | 9,952 |
| 37,5                            | 3,657  | 3,659 | 3,661 | 9,753                             | 9,757 | 9,762 |
| Total                           | -  | -     | -     | <b>9,497</b>                      | 0,365 | 3,846 |

**Tabela 14** - Determinação de fenois totais usando ácido gálico como padrão analítico pelo métodoFolin-Ciocalteu no granulado formulação 5

| Conc. Equi. Ext. Propolis Verde | Determinação de ác. galico<br>(µg/mL) |       |       | Determinação de ác. galico<br>(%) |       |       |
|---------------------------------|---------------------------------------|-------|-------|-----------------------------------|-------|-------|
|                                 | Média                                 | DP    | %CV   | Média                             | DP    | %CV   |
| 80                              | 7,519                                 | 0,001 | 0,012 | 9,398                             | 0,001 | 0,012 |
| 70                              | 6,731                                 | 0,018 | 0,264 | 9,616                             | 0,025 | 0,264 |
| 50                              | 4,501                                 | 0,004 | 0,080 | 9,001                             | 0,007 | 0,080 |
| 37,5                            | 3,548                                 | 0,007 | 0,208 | 9,460                             | 0,020 | 0,208 |
| 25                              | 2,054                                 | 0,004 | 0,218 | 8,214                             | 0,018 | 0,218 |
| Total                           | -                                     | -     | -     | <b>9,138</b>                      | 0,564 | 6,170 |

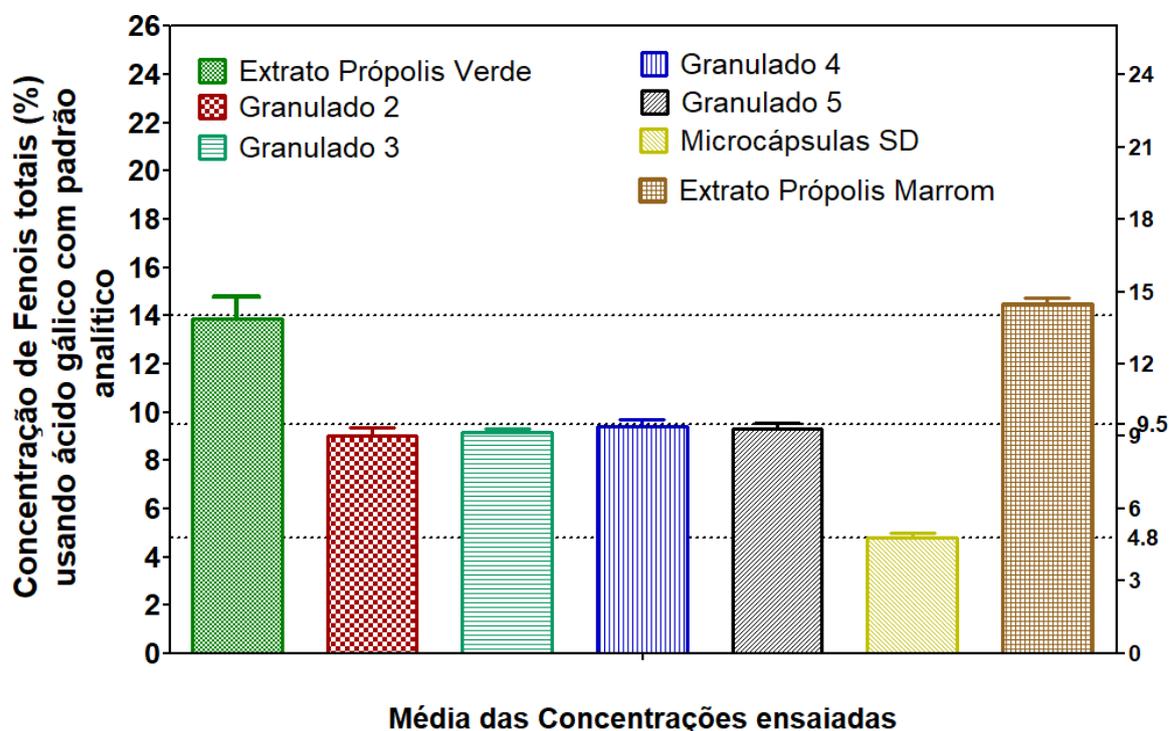
**Tabela 15** - Determinação de fenois totais usando ácido gálico como padrão analítico pelo métodoFolin-Ciocalteu no extrato de marrom

| Conc. Ext. PMUP | Determinação de ác. galico<br>(µg/mL) |       |       | Determinação de ác. galico<br>(%) |       |       |
|-----------------|---------------------------------------|-------|-------|-----------------------------------|-------|-------|
|                 | Média                                 | DP    | %CV   | Média                             | DP    | %CV   |
| 100             | 14,166                                | 0,003 | 0,019 | 14,166                            | 0,003 | 0,019 |
| 70              | 11,327                                | 0,005 | 0,044 | 16,181                            | 0,005 | 0,031 |
| 50              | 7,373                                 | 0,003 | 0,034 | 14,745                            | 0,003 | 0,017 |
| 40              | 5,456                                 | 0,002 | 0,037 | 13,640                            | 0,002 | 0,015 |
| 32              | 4,617                                 | 0,002 | 0,033 | 14,428                            | 0,002 | 0,011 |
| Total           | -                                     | -     | -     | <b>14,470</b>                     | 0,811 | 5,603 |

**Tabela 16** - Determinação de fenois totais usando ácido gálico como padrão analítico pelo métodoFolin-Ciocalteu no formulado spray-dryer.

| Conc. Equi. Ext. PMUP | Determinação de ác. galico<br>(µg/mL) |       |       | Determinação de ác. galico<br>(%) |       |       |
|-----------------------|---------------------------------------|-------|-------|-----------------------------------|-------|-------|
|                       | Média                                 | DP    | %CV   | Média                             | DP    | %CV   |
| 500                   | 21,119                                | 0,012 | 0,059 | 4,224                             | 0,012 | 0,295 |
| 400                   | 18,338                                | 0,014 | 0,074 | 4,584                             | 0,014 | 0,296 |
| 300                   | 16,384                                | 0,017 | 0,106 | 5,461                             | 0,017 | 0,319 |
| 200                   | 9,929                                 | 0,002 | 0,020 | 4,965                             | 0,002 | 0,040 |
| 140                   | 6,805                                 | 0,015 | 0,216 | 4,861                             | 0,015 | 0,303 |
| Total                 | -                                     | -     | -     | <b>4,819</b>                      | 0,459 | 9,534 |

**Figura 20** – Determinação de Fenóis totais nos granulados do Extrato de Própolis verde e própolis marrom pelo método Folin-Ciocalteu. Análise de variância (Teste de Tukey;  $\alpha$  0.05 e valor de  $P < 0,0001$ ).



Fonte: Autora, 2021

Os teores de flavonoides totais para as formulações demonstraram concentrações de (3,17 %) para formulação 2, (3,38%) para formulação 3, (3,23%) para formulação 4, (3,50 %) para formulação 5. Obteve-se Diferenças significativas entre Formulações 2 e 3. Diferenças significativas entre Formulações 4 e 5 e Diferenças significativas entre Formulações 2 e 5. De acordo com o Ministério de Agricultura Pecuária e Abastecimento, os extratos etanólicos de própolis devem conter, no mínimo 0,25% (m/m) de flavonoides (Brasil, 2001). As amostras avaliadas estão dentro dos padrões estabelecidos pela legislação brasileira.

**Tabela 17** - Determinação de flavonoide totais usando quercetina como padrão analítico pelo método de cloreto de alumínio no granulado formulação 2

| Determinação de quercetina ( $\mu\text{g/mL}$ ) |       |       |       | Determinação de quercetina (%) |        |       |
|---|-------|-------|-------|--------------------------------|--------|-------|
| Conc. Equi. Ext. Propolis verde                 | Média | DP    | %CV   | Média                          | DP     | %CV   |
| 110   | 3,426 | 0,003 | 0,085 | 3,114                          | 0,003  | 0,085 |
| 100   | 3,144 | 0,006 | 0,200 | 3,144                          | 0,006  | 0,200 |
| 90  | 2,906 | 0,010 | 0,347 | 3,229                          | 0,011  | 0,347 |
| 80  | 2,597 | 0,018 | 0,702 | 3,246                          | 0,023  | 0,702 |
| 70  | 2,206 | 0,034 | 1,531 | 3,151                          | 0,048  | 1,531 |
| Total   | -     | -     | -     | <b>3,177</b>                   | 0,0057 | 1,808 |

**Tabela 18** - Determinação de flavonoide totais usando quercetina como padrão analítico pelo método de cloreto de alumínio no granulado formulação 3

| Determinação de quercetina ( $\mu\text{g/mL}$ ) |       |       |       | Determinação de quercetina (%) |        |       |
|---|-------|-------|-------|--------------------------------|--------|-------|
| Conc. Equi. Ext. Propolis verde                 | Média | DP    | %CV   | Média                          | DP     | %CV   |
| 110   | 3,554 | 0,028 | 0,795 | 3,231                          | 0,026  | 0,795 |
| 100   | 3,365 | 0,006 | 0,173 | 3,365                          | 0,006  | 0,173 |
| 90  | 2,964 | 0,004 | 0,119 | 3,294                          | 0,004  | 0,119 |
| 80  | 2,848 | 0,017 | 0,609 | 3,560                          | 0,022  | 0,609 |
| 70  | 2,424 | 0,003 | 0,120 | 3,463                          | 0,004  | 0,120 |
| Total   | -     | -     | -     | <b>3,383</b>                   | 0,1316 | 3,890 |

**Tabela 19** - Determinação de flavonoide totais usando quercetina como padrão analítico pelo método de cloreto de alumínio no granulado formulação 4

| Conc. Equi. Ext. Propolis verde | Determinação de quercetina ( $\mu\text{g/mL}$ ) |       |       | Determinação de quercetina (%) |        |       |
|---------------------------------|---|-------|-------|--------------------------------|--------|-------|
|                                 | Média   | DP    | %CV   | Média                          | DP     | %CV   |
| 110                             | 3,559   | 0,077 | 2,177 | 3,235                          | 0,070  | 2,177 |
| 100                             | 3,275   | 0,043 | 1,303 | 3,275                          | 0,043  | 1,303 |
| 90                              | 2,897   | 0,023 | 0,809 | 3,219                          | 0,026  | 0,809 |
| 80                              | 2,654   | 0,017 | 0,640 | 3,317                          | 0,021  | 0,640 |
| 70                              | 2,194   | 0,033 | 1,491 | 3,134                          | 0,047  | 1,491 |
| Total                           | -   | -     | -     | <b>3,236</b>                   | 0,0683 | 2,110 |

**Tabela 20** - Determinação de flavonoide totais usando quercetina como padrão analítico pelo método de cloreto de alumínio no granulado formulação 5

| Determinação de quercetina ( $\mu\text{g/mL}$ ) |       |       |       | Determinação de quercetina (%) |        |       |
|---|-------|-------|-------|--------------------------------|--------|-------|
| Conc. Equi. Ext. Propolis verde                 | Média | DP    | %CV   | Média                          | DP     | %CV   |
| 110   | 3,763 | 0,007 | 0,196 | 3,421                          | 0,007  | 0,196 |
| 100   | 3,482 | 0,049 | 1,404 | 3,482                          | 0,049  | 1,404 |
| 90  | 3,121 | 0,008 | 0,258 | 3,468                          | 0,009  | 0,258 |
| 80  | 2,737 | 0,004 | 0,147 | 3,421                          | 0,005  | 0,147 |
| 70  | 2,607 | 0,018 | 0,674 | 3,724                          | 0,025  | 0,674 |
| Total   | -     | -     | -     | <b>3,503</b>                   | 0,1263 | 3,608 |

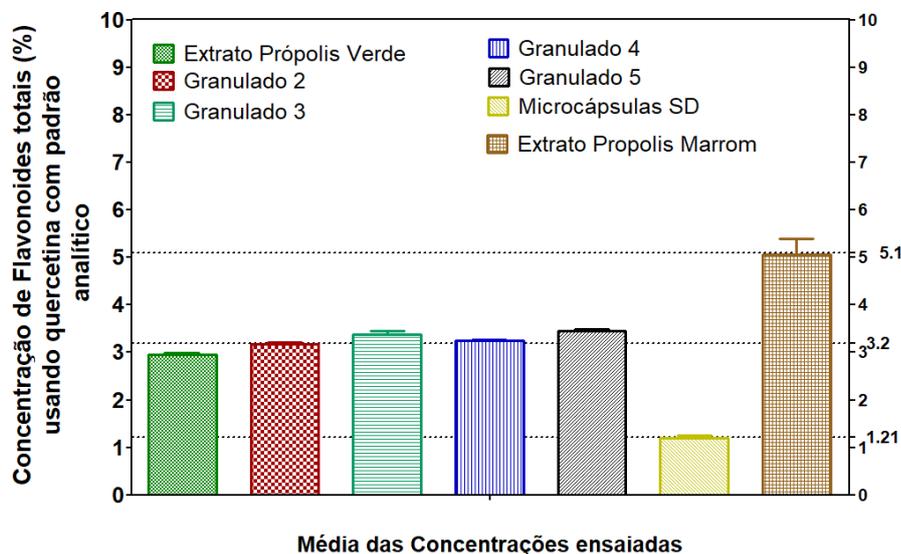
**Tabela 21** - Determinação de flavonoide totais usando quercetina como padrão analítico pelo método de cloreto de alumínio no extrato de própolis marrom de Alagoas

| Determinação de quercetina ( $\mu\text{g/mL}$ ) |       |       |       | Determinação de quercetina (%) |       |       |
|---|-------|-------|-------|--------------------------------|-------|-------|
| Conc. Equi. Ext. Propolis marrom                | Média | DP    | %CV   | Média                          | DP    | %CV   |
| 160   | 8,561 | 0,010 | 0,122 | 5,350                          | 0,007 | 0,122 |
| 140   | 6,579 | 0,004 | 0,053 | 4,699                          | 0,003 | 0,053 |
| 100   | 5,143 | 0,003 | 0,057 | 5,143                          | 0,003 | 0,057 |
| 70  | 3,278 | 0,076 | 2,322 | 4,683                          | 0,109 | 2,322 |
| Total   | -     | -     | -     | <b>5,184</b>                   | 0,421 | 8,112 |

**Tabela 22** - Determinação de flavonoide totais usando quercetina como padrão analítico pelo método de cloreto de alumínio no extrato spray-dryer de própolis marrom de Alagoas

| Determinação de quercetina ( $\mu\text{g/mL}$ ) |       |       |       | Determinação de quercetina (%) |       |       |
|---|-------|-------|-------|--------------------------------|-------|-------|
| Conc. Equi. Ext. Propolis marrom                | Média | DP    | %CV   | Média                          | DP    | %CV   |
| 500   | 6,161 | 0,091 | 1,475 | 1,232                          | 0,018 | 1,475 |
| 400   | 4,862 | 0,090 | 1,847 | 1,216                          | 0,022 | 1,847 |
| 300   | 3,354 | 0,107 | 3,181 | 1,118                          | 0,036 | 3,181 |
| 200   | 2,223 | 0,077 | 3,461 | 1,111                          | 0,038 | 3,461 |
| Total   | -     | -     | -     | <b>1,169</b>                   | 0,064 | 5,432 |

**Figura 21** – Determinação de flavonoides totais nos granulados do Extrato de própolis verde e microcápsulas de própolis marrom. Análise de variância (Teste de Tukey;  $\alpha$  0.05 e valor de  $P < 0,0001$ ).

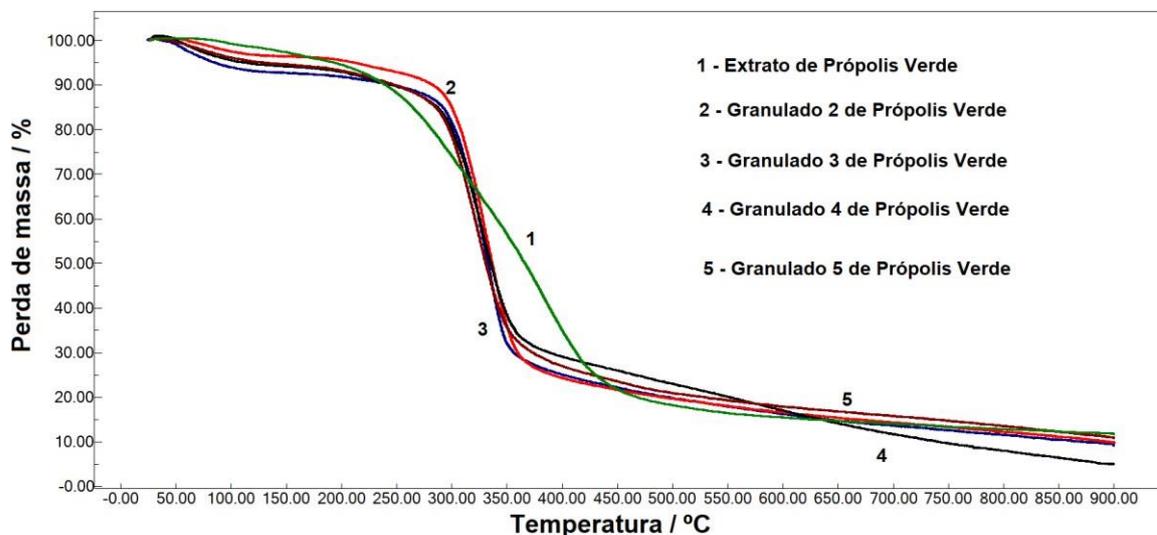


## 5.9 Análise Térmica dos granulados de Própolis Verde de Alagoas

Os granulados de própolis verde de Alagoas apresentaram estabilidade térmica frente ao aumento de temperatura em ensaios acelerados de TG e DSC. (Figura 22 e 23 apresenta as curvas TG dinâmica do extrato de própolis verde obtido após dessecar o extrato em balança de infravermelho e o resíduo foi submetido a ensaios térmicos. O extrato de própolis verde inicia processo lento de perda de massa a partir de 75°C até temperatura de 150°C. Em seguida, um processo acelerado de decomposição a partir da temperatura de 190°C. Os granulados de própolis verde também apresentaram de forma mais pronunciada a perda de massa entre 50°C e 275°C comparado ao extrato de própolis verde.

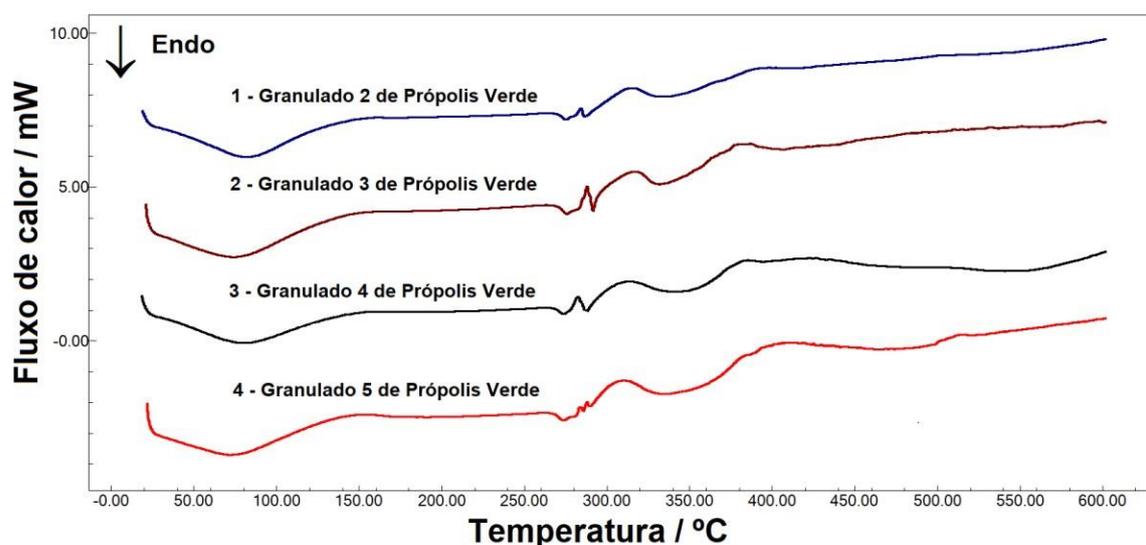
Processos de carbonização dos extratos e granulados ocorrem a altas temperatura a partir de 190°C para o extrato e 275°C para os granulados. Isso indica que os excipientes utilizados na composição dos granulados estão protegendo os compostos fenólicos da própolis verde aumentando a estabilidade térmica destas substâncias do extrato de própolis verde quando incorporado nos granulados. O granulado 2 apresentou um teor menor de umidade residual em relação aos demais.

**FIGURA 22** - Curvas TG do extrato de própolis verde e seus granulados obtidos na razão de aquecimento de 10°C/min.



Fonte: Autora, 2021

**FIGURA 23** - Curvas DSC do extrato de própolis verde e seus granulados obtidos na razão de aquecimento de 10°C/min.



Fonte: Autora, 2021

As curvas DSC dos granulados de própolis verde são apresentadas na figura 23. Observa-se os picos de transição de fase endotérmico entre 30 e 150°C correspondente a volatilização de umidade residual adquiridas durante processamento e estocagem e corroboram com dados TG (gráfico 7) ou ainda a volatilização de ésteres fenólicos voláteis presentes no extrato de própolis verde. Os dados térmicos se combinados com outras técnicas como GC-MS poderiam comprovar esta afirmação.

As curvas DSC dos granulados (figura 23) também demonstram várias

transições de fase a partir de 275°C que corroboram com os dados TG e correspondem a processos de decomposição térmica dos granulados. Devido a semelhança entre as composições, observa-se padrões de decomposição semelhantes para granulados 3 e 4 (sem lecitina) e granulados 2 e 5 (presença de lecitina).

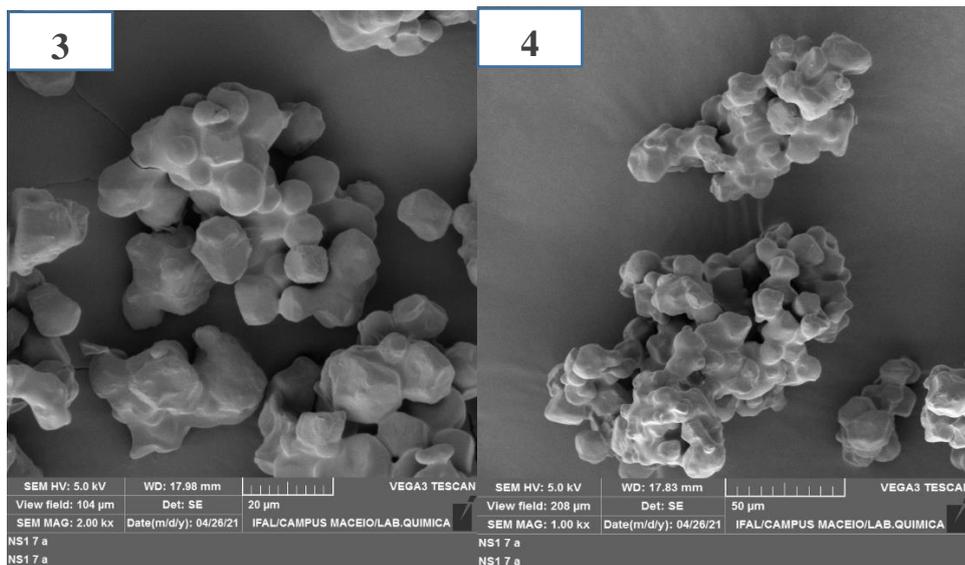
Os dados térmicos estão sendo úteis para correlacionar o grau de perdas de volatilização dos compostos voláteis bioativos (ésteres fenólicos) dos extratos de própolis verde de Alagoas e diminuição da atividade antioxidante, diminuição dos teores de fenóis totais e/ou flavonoides totais dos bioprodutos de própolis obtidos utilizando processos térmicos de evaporação como banho maria, estufa de secagem 40°C (granulados) e secagem por spray-dryer (microcápsulas).

### **5.10 Microscopia Eletrônica de Varredura**

Os ensaios de microscopia eletrônica de varredura foram utilizados para comprovar que houve o microencapsulamento dos granulados de própolis verde. Os resultados mostram que foram formadas microesferas entre 5 e 20 µm, esféricas, ausência de fissuras ou porosidades, lisas e uniformes indicando a formação de um filme encapsulante contínuo na parede externa (Figura 24). As micropartículas apresentam-se predominantemente lisas, algumas com depressões sem rugas em sua superfície (YAN; ZHENG BIAO, 2010). Os granulados apresentaram microesferas, mas algumas apresentam geometria poligonal ou poliédrica com bordas irregulares (RAMOS et al., 2019; SANTOS et al., 2019).

Microesferas são partículas esféricas, normalmente com menos de 200 µm de diâmetro, que podem ser utilizadas como cargas para polímeros podem ser sólidas ou ocas. Apresentam várias diferenças com relação às cargas não-esféricas (que podem se apresentar na forma de flocos, grânulos, fibras, partículas irregulares e outras) (BARBOZA, 2002).

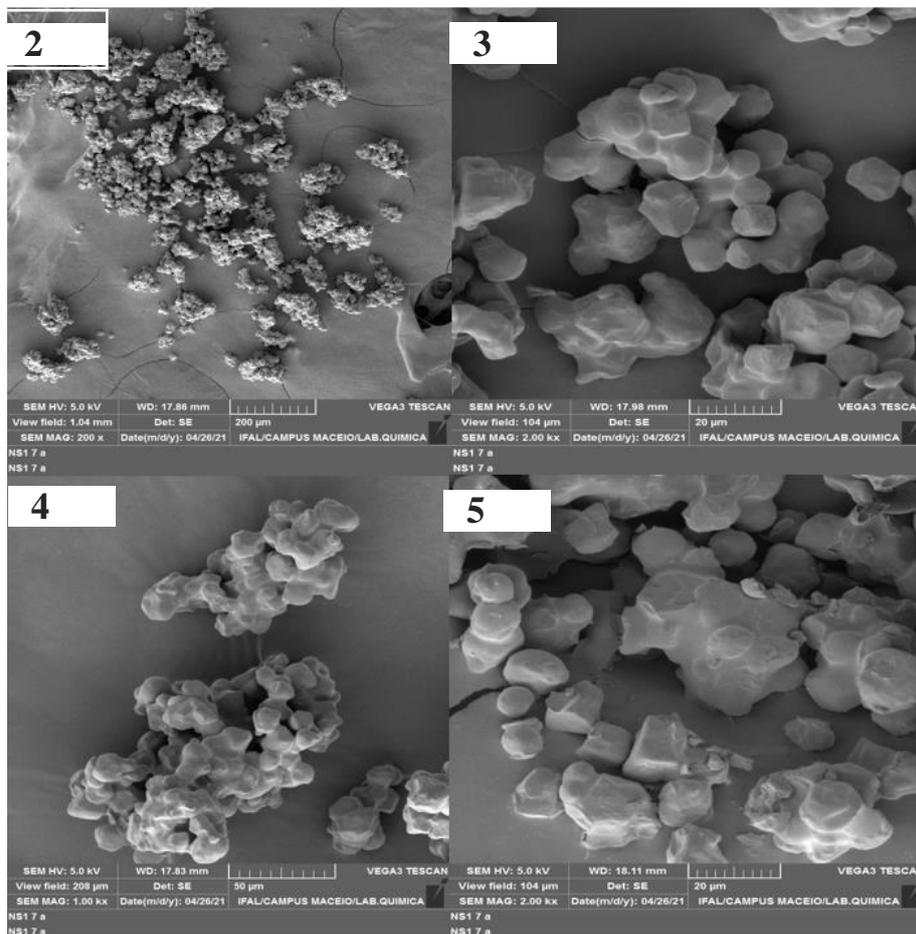
**FIGURA 24** -Microscopia eletrônica de varredura (MEV) dos granulados própolis verde amostra 3 e 4.



Fonte: Autora, 2020.

A partir da observação das micrografias, foi possível perceber que a maior parteda amostras apresentou formato esférico definido, além de evidenciar uma tendênciaà agregação, superfície rugosa e não lisa. Foi possível identificar a formação de esferas de superfície rugosa e tamanho de partícula abaixo de 100 µm, podendo ser consideradas como microesferas, possível identificar a formação de esferas desuperfície rugosa e tamanho de partícula abaixo de 100 µm, podendo ser consideradas como microesferas. (YAN; ZHENG BIAO, 2010).

**FIGURA 25** Microscopia eletrônica de varredura (MEV) dos granulados própolis verde amostra 2,3,4 e 5,



Fonte: Autora, 2020.

## 6 CONCLUSÃO

- ✓ O extrato comercial de própolis verde comercializado por empresa residente em Alagoas apresentou alto teor de fenóis totais e flavonoides totais de acordo com as especificações do MAPA;
- ✓ O extrato comercial de própolis verde apresentou perfil cromatográfico que sugere presença de flavonoides, ácidos cinâmicos prenilados e ésteres fenólicos voláteis;
- ✓ Os particionados do extrato comercial de própolis verde apresentou atividade antibacteriana frente aos microorganismos *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* e *Enterococcus faecalis*;
- ✓ As microcápsulas spray-dryer e encapsulados na forma de granulados apresentaram-se como pó seco estáveis sem demonstrar qualquer modificação de estado físico frente as condições de estocagem;
- ✓ Os granulados apresentaram grau de encapsulação acima de 70% demonstrando alto teor de flavonoides e compostos fenólicos;
- ✓ O extrato comercial de própolis verde, granulados de própolis verde, extrato de própolis marrom-esverdeada e microcápsula spray-dryer de empresa Alagoana também apresentaram atividade antioxidante;
- ✓ Os ensaios de atividade antioxidante combinados com ensaios de flavonóides totais e fenóis totais mostram a importância de monitorar a qualidade dos encapsulados de própolis verde para evitar perdas por volatilização ou decomposição durante etapas de processamento do extrato em bioprodutos.
- ✓ Os granulados de própolis verde apresentam estabilidade térmica superior ao extrato de própolis verde quando comparados pelo ensaio de termogravimetria, porém foi detectado volatilização e perdas de compostos voláteis bioativos, indicando necessidade de condições especiais de acondicionamento e estocagem.

## REFERÊNCIAS

ACKERMANN, T. Fast chromatographic study of propolis crudes. **Food Chemistry**, v.42, n. 2, p. 135–138, 1991.

Alindo, M., Finn, E. (1992). Física. 6ª Edição. Lisboa, Escolar editora, pp. 11.

BANKOVA, V.; CASTRO, S. DE; MARCUCCI, M. Propolis : recent advances in chemistry and plant origin Review article Propolis : recent advances in chemistry and plant origin. **Apidologie**, v. 31, n. 1, p. 3–15, 2000.

BARBOSA, M. H. et al. Ação terapêutica da própolis em lesões cutâneas. **Acta Paulista de Enfermagem**, v. 22, n. 3, p. 318–322, 2009.

BARBOZA, Ana C. R. Nery; PAOLI, Marco A. de. Polipropileno Carregado com Microesferas Ocas de Vidro (Glass Bubbles™): Obtenção de Espuma Sintática. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, Campinas, Sp, v. 12, n. 2, p. 130–137, nov. 2002

BORRELLI, F. et al. Phytochemical compounds involved in the anti-inflammatory effect of propolis extract. **Fitoterapia**, v. 73, n. SUPPL. 1, 2002.

BRANDÃO, M. das G. L. Produção de chás e extratos de plantas medicinais. Fundação Centro Tecnológico de Minas Gerais-CETEC. Dossiê Técnico. 2007. Disponível em: <http://sbrt.ibict.br/dossie-tecnico/downloadsDT/MTc1>. Acessado em: 10 de janeiro de 2012.

**BRASIL. Ministério da Agricultura. Pecuária e do Abastecimento. Instrução Normativa nº 3**, de 19 de janeiro de 2001. Aprova os regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade de Apitoxina, Cera de Abelha, Geleia Real, Geleia Real Liofilizada, Pólen Apícola, Própolis e Extrato de Própolis. Brasília, 2001.

**BRPI0800363A2 artepelina C propolis verde.pdf**. , [s.d.].

BURDOCK, G. A. Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (propolis). **Food and Chemical Toxicology**, v. 36, n. 4, p. 347–363, 1998.

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

CASTALDO, S.; CAPASSO, F. Propolis, an old remedy used in modern medicine.

**Fitoterapia**, v. 73, n. SUPPL. 1, p. 1–6, 2002.

CASTRO, M. L. et al. Própolis do sudeste e nordeste do Brasil: Influência da sazonalidade na atividade antibacteriana e composição fenólica. **Química Nova**, v. 30, n. 7, p. 1512–1516, 2007.

Chang R., Goldsby, K. A. (2013). Química. 11ª Edição. New York, Mc Graw Hill, pp. 468-493.

CLSI. Metodologia dos Testes de Sensibilidade a Agentes Antimicrobianos por Diluição para Bactéria de Crescimento Aeróbico: Norma Aprovada - Sexta Edição. **ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária - Ministério da Saúde**, v. 23, n.2, p. 81, 2012.

Couto, A.G. et al. Granulação. *Cadernos de Farmácia*. V. 16, n. 1. p. 13-20, 2000.

DANESHMAND, A. et al. Evaluating complementary effects of ethanol extract of propolis with the probiotic on growth performance, immune response and serum metabolites in male broiler chickens. **Livestock Science**. Sanandaj, v. 178, p. 195- 201, Apr. 2015.

DE MENDONÇA, I. C. G. et al. Brazilian red propolis: Phytochemical screening, antioxidant activity and effect against cancer cells. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 15, n. 1, p. 1–12, 2015.

DIAS, J. A.. A análise sedimentar e o conhecimento dos sistemas marinhos. 2004. pp. 10-27. Disponível em: [http://w3.ualg.pt/~jdias/JAD/eb\\_Sediment.html](http://w3.ualg.pt/~jdias/JAD/eb_Sediment.html). Acessado em: 20 de dezembro de 2012.

DAUGSCH, A. et al. Própolis vermelha e sua origem botânica. **Mensagem Doce**. Campinas, n. 89. Nov. 2006 Disponível em: <http://www.apacame.org.br/mensagemdoce/89/msg89.htm>. Acesso em jun, 2018.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 5ª Ed.. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2010. v. 1, 523 p.

FONSECA, M. J. V. et al. Evaluation of the potential of Brazilian propolis against UV- induced oxidative stress. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2011, n. May 2014, 2011.

FROZZA, C. O. S. et al. Chemical Characterization, antioxidant and citotoxic activities of Brazilian red propolis. **Food and Chemical Toxicology**. Caxias do Sul, v. 52, p. 137-142, 2013.

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

GOMES, L.R. (2005). Biofísica para ciências da saúde.. Porto, Universidade

Fernandopessoa, pp. 34-36.

INFARMED. (2005 a). Farmacopeia Portuguesa VIII. I volume. Lisboa, Ministério da Saúde, pp. 32-33, 53, 269, 619.

INFARMED. (2005 b). Suplemento 2 da Farmacopeia Portuguesa VIII. Lisboa, Ministério da Saúde

LE HIR, A. Noções de farmácia galênica. 6. ed. rev. e ampl. São Paulo: Organização Andrei, 1997.

LU, L. C.; CHEN, Y. W.; CHOU, C. C. Antibacterial activity of propolis against *Staphylococcus aureus*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 102, n. 2, p.213–220, 2005.

LUSTOSA, S. R. et al. Propolis: Updates on chemistry and pharmacology. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 18, n. 3, p. 447–454, 2008.

MANI, F. et al. Propolis: Effect of different concentrations, extracts and intake period on seric biochemical variables. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 105, n. 1–2, p. 95–98, 2006.

MARCUCCI, M, C. Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity. **Apidologie**, v. 26, n. 1, p. 83 – 89, 1995.

MARCUCCI, M. **Biological and therapeutic properties of chemical propolis constituents**. **Web of Science**, 1996.

MARCUCCI, M. C. et al. Phenolic compounds from Brazilian propolis with pharmacological activities. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 74, n. 2, p. 105–112, 2001.

MARÍA, A. et al. Evaluación De La Capacidad Antioxidante Y Contenido De Compuestos Fenólicos En Recursos Vegetales Promisorios Evaluation of the Antioxidant Capacity and Content of Phenolics Compounds of Vegetable Promissory Resources. **Rev Soc Quím Perú**, v. 73, n. 3, p. 142–149, 2007.

MARQUELE, F. D. et al. Propolis extract release evaluation from topical formulations by chemiluminescence and HPLC. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 41, n. 2, p. 461–468, 2006.

MARUYAMA, H. et al. Antihypertensive effects of flavonoids isolated from Brazilian green propolis in spontaneously hypertensive rats. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 32, n. 7, p. 1244–1250, 2009.

MENDONÇA. PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE E AMBIENTE **Aspectos ambientais , químicos e biológicos relacionados à própolis vermelha** PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE E

**AMBIENTE Aspectos** ambientais , químicos e biológicos relacionados à própolis vermelha. [s.l: s.n.].

MISHIMA, S. et al. Two related cinnamic acid derivatives from Brazilian honey bee propolis, baccharin and drupanin, induce growth inhibition in allografted sarcoma S- 180 in mice. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 28, n. 6, p. 1025–1030, 2005.

NORI, M. et al. Microencapsulation of propolis extract by complex coacervation. **Lwt -Food Science and Technology**, v. 44, p. 429–435, 1 mar. 2011.

OLIVEIRA, K. A. DE M. et al. Atividade antimicrobiana e quantificação de Flavonoides e Fenóis totais em diferentes extratos de Própolis. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 33, n. 2, p. 211–222, 2013.

PAULINO, N. Padronizado De Própolis P1 E De Seu Principal Constituinte Ativo , Artepillin C ® Padronizado De Própolis P1 E De Seu Principal. 2005.

PEREIRA, A. DOS S.; SEIXAS, F. R. M. S.; DE AQUINO NETO, F. R. Própolis: 100

Anos de pesquisa e suas perspectivas futuras. **Quimica Nova**, v. 25, n. 2, p. 321–326, 2002.

PEREIRA, D. S. et al. Histórico e principais usos da própolis apícola. **Agropecuária Científica no Semi-árido**, v. 11, n. 2, p. 1–21, 2015.

PEZZIN, A. P. T.; MEIER, M. Microencapsulação: Inovação em diferentes áreas. n.July, 2015.

RAMOS, A. H. et al. Characteristics of Flour and Starch Isolated from Red Rice Subjected to Different Drying Conditions. **Starch/Staerke**, v. 71, n. 7–8, p. 1–8, 2019.

RÉ, M. I. Microencapsulação: Em busca de produtos inteligentes. **Ciência Hoje**, Rio de Janeiro, RJ, v. 27, n. 162, p. 24-29, jul. 2000.

RIGHI, A. A. Perfil químico de amostras de própolis brasileiras. p. 1–102, 2008.

RIGHI, A. A. et al. Brazilian red propolis: Unreported substances, antioxidant and antimicrobial activities. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 91, n. 13, p. 2363–2370, 2011.

SANTOS, T. P. R. et al. Effect of spray-drying and extrusion on physicochemical characteristics of sweet potato starch. **Journal of Food Science and Technology**, v.56, n. 1, p. 376–383, 2019

SCATOLINI, A. M. Antonio Márcio Scatolini. 2017.

SILVA, Rejane Pina Dantas; MACHADO, Bruna Aparecida Souza; BARRETO, Gabriele de Abreu; COSTA, Samantha Serra; ANDRADE, Luciana Nalone; AMARAL, Ricardo Guimarães; CARVALHO, Adriana Andrade; PADILHA, Francine Ferreira; BARBOSA, Josiane Dantas Viana; UMSZA-GUEZ, Marcelo Andres. Antioxidant, antimicrobial, antiparasitic, and cytotoxic properties of various Brazilian propolis extracts. **Plos One**, [S.L.], v. 12, n. 3, p. 0172585, 30 mar. 2017. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0172585>

SIMÕES. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6. ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS, 2010.

SILVA, L. R.; et al; Flavonóides: constituição química, ações medicinais e potencial tóxico **Acta Toxicol**. Argent, 2015.

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

SOUSA, J. P. L. D. M. et al. Chemical and antimicrobial potential study of brazilian propolis produced by different species of bees. **Revista Virtual de Química**, v. 11, n.5, p. 1480–1497, 2019.

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

**TOMAZZOLI**. [s.l: s.n.].

TANAKA, J. C. A. et al. Constituintes químicos de *Luehea divaricata* Mart. (Tiliaceae). **Química Nova**, v. 28, n. 5, p. 834–837, 2005.

VICENTINO, A. R. R.; MENEZES, F. DE S. Atividade antioxidante de tinturas vegetais, vendidas em farmácias com manipulação e indicadas para diversos tipos de doenças pela metodologia do DPPH. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 3, p. 384–387, 2007.

YAN, H.; ZHENGBIAO, G. U. Morphology of modified starches prepared by different methods. **Food Research International**, v. 43, n. 3, p. 767–772, 2010.

ZHANG, H. et al. Inhibitory Properties of Aqueous Ethanol Extracts of Propolis on Alpha-Glucosidase. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**. Beijing, v. 2015, 2015.