UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ZOOTECNIA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS

DANNAYA JULLIETHY GOMES QUIRINO

**Estudo do extrato de própolis vermelha do Brasil e sua incorporação em
leveduras (*Saccharomyces cerevisiae*) residuais**

Pirassununga

2021

DANNAYA JULLIETHY GOMES QUIRINO

Estudo do extrato de própolis vermelha do Brasil e sua incorporação em leveduras (*Saccharomyces cerevisiae*) residuais

Versão corrigida.

Dissertação apresentada à Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Ciências da Engenharia de Alimentos.

Orientador(a): Profa. Dra. Carmen Sílvia Fávaro Trindade.

Pirassununga

2021

Ficha catalográfica elaborada pelo
Serviço de Biblioteca e Informação, FZEA/USP,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

G757e GOMES QUIRINO, DANNAYA JULLIETHY
Estudo do extrato de própolis vermelha do Brasil
e sua incorporação em leveduras (*Saccharomyces
cerevisiae*) residuais / DANNAYA JULLIETHY GOMES
QUIRINO ; orientador Carmen Silvia Fávaro
Trindade. -- Pirassununga, 2021.
86 f.

Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação
em Engenharia de Alimentos) -- Faculdade de
Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade
de São Paulo.

1. CA100. I. Silvia Fávaro Trindade, Carmen ,
orient. II. Título.

“A experiência é uma escola onde são caras as lições, mas em nenhuma outra os tolos podem aprender.” (Benjamin Franklin).

BIOGRAFIA

Dannaya Julliethy Gomes Quirino, filha de José Vicente Quirino e Maria Nilce Gomes Quirino, nasceu na cidade de Barbalha, no estado do Ceará, em 23 de março de 1989. Graduada em Tecnologia em alimentos pelo Instituto Centro de Ensino Tecnológico (FATEC- Cariri) e em Nutrição pela Faculdade do Juazeiro do Norte-CE (FJN). Durante a graduação realizou estágio na Usina alcoolquímica- Grupo JB, no controle de qualidade e no Hospital Regional do Cariri, na parte da nutrição clínica. Profissionalmente, trabalhou na Empresa Francisco Gustavo Brito e Cabral, no controle de qualidade de polpa de frutas e na RL Refeições Coletivas, na unidade de alimentação e nutrição (UAN).

No ano de 2019, Dannaya ingressou no programa de mestrado FZEA / USP em Ciência da Engenharia de Alimentos, com bolsa da CAPES. Durante o mestrado, no primeiro semestre cumpriu os 24 créditos exigidos para o depósito da dissertação e posteriormente trabalhou no laboratório de microencapsulação, onde realizou análises com o material biológico em estudo e pôde concluir o mestrado no prazo de 25 meses.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo seu infinito amor, bondade e misericórdia em minha vida, por colocar pessoas de luz no meu caminho que me inspiram e ensinam a fazer o certo e repreendem quando erro. Obrigada Senhor por fortalecer minhas forças e encorajar-me à seguir.

Meu sincero agradecimento pelo apoio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001, por ter favorecido a realização desse trabalho de pesquisa.

Aos meus pais, José e Nilce, minhas irmãs (ãos) e meu noivo por todo carinho, amor, preocupação, paciência e otimismo. Obrigada pelo apoio de vocês em cada decisão e “empurrões”, pois me fez florescer e crescer.

A minha orientadora, Carmen, pela oportunidade de realizar este trabalho. Obrigada pela paciência e disponibilidade de me orientar, por me guiar e mostrar os próximos passos da pós-graduação.

Ao professor Severino, por ter confiado a mim a realização desse projeto e disponibilizar a matéria-prima e demais itens para o experimento.

À Marcelo Thomazini, Fernanda Rubio e Ramon, pela disponibilidade em me auxiliar no meu projeto, vocês são um presente que Deus colocou em minha vida. Sou imensamente grata pelo tempo destinado a me ajudar, sempre atenciosos.

Também agradeço aos amigos, Elen, Samuel, Jéssica e aos demais do departamento, sou grata por toda forma de ajuda que recebi, pela companhia nos intervalos durante um café, pelas conversas e risadas.

A todos que de forma direta ou indireta contribuíram para a realização deste trabalho, muito obrigada!

RESUMO

QUIRINO, D. J. G. **Estudo do extrato de própolis vermelha do Brasil e sua incorporação em leveduras (*Saccharomyces cerevisiae*) residuais.** 2021. 85 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2021.

Espera-se que a própolis vermelha do “tipo 13” apresente propriedades antioxidante, antibacteriana, anticarcinogênica, anti-inflamatória, cicatrizante, antifúngica e antiparasitária. Células de leveduras *Saccharomyces cerevisiae* podem servir como agente encapsulante de compostos bioativos presente na própolis vermelha do Brasil. O presente trabalho propõe produzir, caracterizar e avaliar o potencial antioxidante e antimicrobiano do extrato da própolis vermelha, posteriormente realizar o processo de encapsulação do extrato em leveduras e produzir um pó com alto valor agregado e com potencial para aplicação nas áreas alimentícia e farmacêutica. Para tanto, foi preparado o extrato etanólico a 80%, para realizar sua caracterização em relação a umidade, compostos bioativos, atividade antioxidante pelo método de FRAP e ABTS, e atividade antimicrobiana pelas técnicas de CIM e CBM (*Salmonella enteritidis* e *Pseudomonas*). Para o processo de bioissorção foi realizado com álcool etílico (58° GL) incorporado em leveduras que serviu como controle e com extrato de própolis que também foi incorporado em leveduras. Para esse experimento foi feito dois tratamentos contendo 15% e 25% de leveduras para cada amostra. Ainda o extrato de própolis sem levedura passou pela bioissorção. A secagem em *spray dryer* foi realizada com as seguintes amostras: 1) extrato incorporado em leveduras que passaram por bioissorção e posteriormente secas por atomização; 2) extrato incorporado em leveduras que foram direto para atomização. Após a obtenção das micropartículas de própolis, foi realizado testes físico-químicos, MEV e o estudo de sua estabilidade. Em relação a caracterização do extrato de própolis vermelha, foi possível obter 81,9% de umidade, 228,0 mg AGE/g de fenólicos totais, 188 mg EQ/g de flavonoides e 40,1 mmol/100mg, 109,5 mmol/100mg para ABTS e FRAP, respectivamente. A própolis apresentou atividade antimicrobiana para as bactérias gram-negativas testadas. Com o processo de bioissorção, foi possível determinar o tempo de equilíbrio das amostras de 240 minutos para os dois tratamentos. As micropartículas de própolis apresentaram valores de A_w e umidade com variação de 0,16 – 0,28 e 4,22 – 5,64%, respectivamente. As fotomicrografias mostraram partículas com formato côncavo, tamanho irregular, aglomeradas, com superfície lisa e uniforme. Foi possível detectar maiores valores de concentração para fenólicos e flavonoides totais, FRAP e ABTS na amostra TU15 (micropartículas que passaram por ultraturrax com 15% de leveduras). Os tratamentos TB15 (micropartículas que passaram por banho agitado com 15% de leveduras) e TU15 apresentaram coloração mais intensa, com aspecto avermelhada. Assim, conclui-se que o extrato etanólico concentrado de própolis vermelha apresenta elevado teor de compostos bioativos, com poder antioxidante. A técnica de bioissorção do extrato de própolis vermelha em células de levedura seguida pela secagem *spray drying*, mostrou boa proteção aos compostos bioativos, apesar de ter ocorrido uma pequena redução nos teores de flavonoides durante o ensaio de estabilidade. Pode-se comprovar que o tratamento mais eficiente foi o da secagem das leveduras e o extrato de própolis pela atomização sem passar pelo processo de bioissorção.

Palavras-chave: *Dalbergia ecastophyllum*; *Spray drying*; Formononetina; Fenólicos; Flavonoides, Atividade antioxidante; Aspectos morfológicos, Estabilidade.

ABSTRACT

QUIRINO, D. J. G. **Study of red propolis extract from Brazil and its incorporation in residual yeasts (*Saccharomyces cerevisiae*)**. 2021. 85 f. (M.Sc) Dissertation– Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2021.

Red “type 13” propolis is expected to have antioxidant, antibacterial, anticarcinogenic, anti-inflammatory, healing, antifungal and antiparasitic properties. *Saccharomyces cerevisiae* yeast cells can serve as an encapsulating agent for bioactive compounds present in Brazilian red propolis. The present work proposes to produce, characterize and evaluate the antioxidant and antimicrobial potential of the red propolis extract, then carry out the encapsulation process of the extract in yeast and produce a powder with high added value and with potential for application in the food and pharmaceutical areas. For this purpose, an ethanol extract at 80% was prepared to perform its characterization in relation to moisture, bioactive compounds, antioxidant activity by the FRAP and ABTS method, and antimicrobial activity by the CIM and CBM (*Salmonella enteritidis* and *Pseudomonas*) techniques. The biosorption process was carried out with ethyl alcohol (58° GL) incorporated in yeasts, which served as a control, and propolis extract, which was also incorporated in yeasts. For this experiment, two treatments were carried out, containing 15% and 25% of yeast for each sample. Still the propolis extract without yeast underwent biosorption. Drying in a spray dryer was performed with the following samples: 1) extract incorporated in yeasts that underwent biosorption and subsequently dried by spray drying; 2) extract incorporated in yeast that went straight to atomization. After obtaining the propolis microparticles, physical-chemical tests, SEM and the study of their stability were performed. Regarding the characterization of the red propolis extract, it was possible to obtain 81.9% moisture, 228.0 mg AGE/g of total phenolics, 188 mg EQ/g of flavonoids and 40.1 mmol/100mg, 109.5 mmol /100mg for ABTS and FRAP, respectively. Propolis showed antimicrobial activity against the gram-negative bacteria tested. With the biosorption process, it was possible to determine the equilibrium time of the samples of 240 minutes for the two treatments. The propolis microparticles showed Aw and moisture values ranging from 0.16 – 0.28 and 4.22 – 5.64%, respectively. The photomicrographs showed particles with a concave shape, irregular size, agglomerated, with a smooth and uniform surface. It was possible to detect higher concentration values for total phenolics and flavonoids, FRAP and ABTS in the TU15 sample (microparticles that underwent ultraturrax with 15% yeast). Treatments TB15 (microparticles that underwent a shaken bath with 15% yeast) and TU15 showed more intense coloration, with a reddish appearance. Thus, it is concluded that the concentrated ethanol extract of red propolis has a high content of bioactive compounds, with antioxidant power. The technique of biosorption of red propolis extract in yeast cells followed by drying spray drying, showed good protection to bioactive compounds, although there was a small reduction in flavonoid contents during the stability test. It can be proven that the most efficient treatment was the drying of yeasts and the propolis extract by atomization without going through the biosorption process.

Keywords: *Dalbergia ecastophyllum*; Spray drying; Formononetine; Phenolics; Flavonoids, Antioxidant activity; Morphological aspects, Stability.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Própolis vermelha do Brasil.....	19
Figura 2 - Estruturas químicas dos bioativos: (A) isoflavonas, retusapurpurins A e B; (B) Formononetina; (C) Neovestitol e (D) Vestitol.....	21
Figura 3 - Estrutura do flavonoide.....	23
Figura 4 - Mecanismo de ação dos antioxidantes.....	24
Figura 5 - Estrutura fenólica dos antioxidantes sintéticos.....	25
Figura 6 - Antioxidantes naturais (tocoferol, carotenóides).....	25
Figura 7 - Morfologia das microcápsulas e microesferas.....	29
Figura 8 - Esquema gráfico do processo de secagem por atomização	32
Figura 9 - Microencapsulação de compostos bioativos de três variedades de própolis brasileira por spray drying.....	33
Figura 10 - Própolis vermelha fragmentada (a); Própolis vermelha triturada (b)	35
Figura 11 - Mistura de própolis vermelha triturada e álcool 80% (a); Extrato etanólico de própolis – EEP: pós banho-maria (b) e pós centrifugação (c); Extrato concentrado de própolis vermelha – EEPC (d).....	36
Figura 12 - Aparência da biomassa em cada etapa da lavagem	40
Figura 13 - Atomização das leveduras (a) e partículas de levedura em pó (b)	41
Figura 14 - Amostras e os respectivos intervalos de tempo (a), homogeneização das amostras no Turrax e no banho agitado (b)	42
Figura 15 - Pós contendo micropartículas de própolis vermelha encapsuladas com leveduras (Ultraturrax; 15 e 25% de levedura- duplicata) (a); Pós contendo micropartículas de leveduras livres encapsuladas com álcool etílico (58° GL) (Banho agitado; 15 e 25% de levedura- duplicata) (b) ...	44
Figura 16 - Sobrenadante obtido do processo de ruptura das respectivas amostras: (C1 (CB); C2 (CU); 1 e 5 (TB15); 2 e 6 (TB25); 3 e 7 (TU15); 4 e 8 (TU25)	45
Figura 17 - Controle de estabilidade das micropartículas de própolis e o controle em condições controladas, durante 0, 7 (a), 15 (b), 30 (c) e 60 (d) dias de armazenamento	48
Figura 18 - Cromatogramas obtidos por cromatografia líquida, onde A = padrão da formononetina em 19,6 min. (4 ug/mL); B = amostra contendo extrato etanólico da própolis vermelha e diluída 500 vezes em 19,6 min.	51
Figura 19 - CIM e CBM- Resultado da amostra diluída de extrato concentrado bruto de própolis na proporção 1:100 e 1:1000 contra Salmonella enteritidis (A) e Pseudomonas (B).....	55

Figura 20 - Gráfico de Pseudo-segunda ordem: (A) Fenólicos totais - 15%; (B) Fenólicos totais - 25%; (C) Flavonoides totais - 15%; (D) Flavonoides totais - 25%	56
Figura 21 - Pós contendo partículas atomizadas do extrato de própolis vermelha microencapsuladas incorporadas em leveduras: biossorvidas (TU15, TU25, TB15, TB25) e controles (CU, CB)	57
Figura 22 - Imagens microscópicas das micropartículas em leveduras de própolis vermelha atomizada: (a) Fotomicrografias óptica das micropartículas em levedura de solução alcóolica de 58° GL. (C1) CB; (C2) CU; (b) Fotomicrografias óptica do extrato puro de própolis vermelha incorporado em leveduras e atomizada. (A1) TB15; (A2) TB25; (A3) TU15; (A4) TU25	61
Figura 23 - Fotomicrografia de micropartículas atomizadas contendo leveduras com própolis vermelha, mostrando a topologia externa com ampliação original de 1500 ×: (a) Fotomicrografias de micropartículas atomizadas contendo leveduras com solução alcóolica de 58° GL. (C1) CB; (C2) CU; (b) Fotomicrografias do extrato puro de própolis vermelha atomizada com levedura. (A1) TB15; (A2) TB25; (A3) TU15; (A4) TU25	63
Figura 24 - Levedura controle <i>Saccharomyces cerevisiae</i> atomizada: (C1) CB; (C2) CU. Pós (A1) TB15; (A2) TB25; (A3) TU15; (A4) TU25 obtidos após encapsulamento de extratos de própolis em levedura	69

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Utilização de agentes encapsulantes para microencapsulação de própolis.	30
Tabela 2 - Caracterização do extrato de própolis vermelha concentrado quanto aos teores de fenólicos e flavonoides totais	51
Tabela 3 - Propriedade antioxidante do extrato etanólico de própolis vermelha	53
Tabela 4 - Concentração inibitória mínima- CIM e Concentração bactericida mínima- CBM (ug/mL).....	53
Tabela 5 – Parâmetros cinéticos do modelo de pseudo-segunda ordem de bioadsorção do extrato de própolis vermelha do Brasil em leveduras <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	55
Tabela 6 - Caracterização físico-química das micropartículas de extrato de própolis vermelha e do controle (leveduras livres).	58
Tabela 7 - Caracterização dos pós contendo as micropartículas de extrato de própolis vermelha e do controle (leveduras puras) obtidas pela secagem em spray-dryer: Eficiência de encapsulação (EE), Rendimento, Dispersibilidade e Higroscopicidade.....	59
Tabela 8 – Tamanho médio de micropartículas de própolis vermelha microencapsulada em leveduras.....	64
Tabela 9 - Propriedades antioxidante da própolis vermelha microencapsulada com leveduras.	65
Tabela 10 - Conteúdo de flavonoides totais em própolis vermelha durante a estocagem das micropartículas por 60 dias.....	66
Tabela 11 - Conteúdo de flavonoides totais em micropartículas contendo própolis vermelha estocadas por 60 dias.	68
Tabela 12 - Colorimetria em própolis vermelha.....	70

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

BHA -	Butil-hidroxianisol
BHT -	Butil-hidroxitolueno
PG -	Propil-galato
TBHQ -	Terc-butil-hidroquinona
CIM	Concentração Inibitória Mínima
MCB	Concentração bactericida mínima
EAG	Equivalente de ácido gálico
EQ	Equivalente de quercetina
FeSO₄	Solução de sulfato ferroso
NaCl	Cloreto de sódio
MgCl₂	Cloreto de magnésio
UR	Umidade relativa
ABTS	Capacidade de redução do radical ABTS
FRAP	Capacidade de redução de ferro
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
EEP	Extrato etanólico própolis
EPC	Extrato de própolis concentrado
EECPV	Extrato etanólico concentrado da própolis vermelha
TE -	Trolox Equivalente
UHPLC-	Ultra High Performance Liquid Chomatography
UR -	Umidade Relativa

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
2.1. Própolis vermelha	18
2.2 Compostos bioativos da própolis vermelha.....	20
2.2.1 Fenólicos.....	22
2.2.2 Flavonoides.....	22
2.2.2.1 Isoflavonoides.....	23
2.3 Capacidade antioxidante.....	24
2.4 Atividade antimicrobiana	26
2.5 Biossorção.....	27
2.6 Microencapsulação	28
2.6.1 Aspectos gerais	28
2.6.2 <i>Spray drying</i>	31
2.6.3 Levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	33
3 MATERIAL E MÉTODOS	35
3.1 Obtenção da própolis vermelha	35
3.2 Preparo do solvente	35
3.3 Preparação do extrato	35
3.4 Caracterização do extrato bruto de própolis vermelha.....	36
3.4.1 Teor de umidade.....	36
3.4.2 Determinação de formononetina por Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).....	36
3.4.3 Determinação de fenólicos totais	37
3.4.4 Determinação de flavonoides totais.....	37
3.4.5 Determinação da atividade antioxidante	38
3.4.5.1 Capacidade de redução de ferro (FRAP)	38
3.4.5.2 Capacidade de redução do radical ABTS (ABTS)	38
3.4.6 Determinação da atividade antimicrobiana	38
3.4.6.1 Microrganismos testados	38
3.4.6.2 Concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM)	39

3.5 Microencapsulação por <i>spray drying</i>	39
3.5.1 Tratamento e secagem das leveduras	39
3.5.2 Cinética de bioadsorção	41
3.5.3 Preparação das micropartículas por atomização	43
3.5.4 Condições operacionais da secagem no <i>spray dryer</i>	43
3.6 Extração dos compostos bioativos totais das micropartículas	45
3.7 Caracterização das micropartículas de própolis vermelha	46
3.7.1 Teor de umidade	46
3.7.2 Atividade de água	46
3.7.3 Higroscopicidade	46
3.7.4 Dispersibilidade	46
3.7.5 Morfologia	47
3.7.5.1 Análise Microscópica	47
3.7.5.2 Morfologia por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	47
3.7.6 Medida de tamanho de partícula	47
3.8 Estabilidade da própolis microencapsulada sob armazenamento	47
3.8.1 Colorimetria	48
3.9 Análise estatística dos resultados	49
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	50
4.1 Caracterização do extrato de própolis vermelha	50
4.1.1 Identificação de formononetina por Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)	50
4.1.2 Compostos bioativos	51
4.1.3 Capacidade antioxidante	52
4.1.4 Atividade antimicrobiana	53
4.2 Bioadsorção dos compostos bioativos	55
4.3 Caracterização das micropartículas de própolis vermelha	57
4.3.1 Umidade e atividade de água	57
4.3.2 Higroscopicidade e dispersibilidade	59
4.3.5 Tamanho médio de partículas	64
4.4 Estabilidade do material microencapsulado durante o armazenamento	64
4.4.1 Capacidade antioxidante	64
4.4.2 Retenção de fenólicos e flavonoides durante a estocagem das micropartículas	66
4.4.5 Colorimetria	69

5. CONCLUSÕES.....	71
REFERÊNCIAS	72

1. INTRODUÇÃO

A própolis é um produto de origem animal, coletado por abelhas de espécie *Apis mellifera* (GHISALBERTI, 1979), composta por uma mistura resinosa complexa (PARK et al., 2002) que compreende o produto seroso de diferentes partes das plantas que as abelhas coletam em conjunto com a secreção do metabolismo das mesmas (MARCUCCI & MARCUCCI, 1995). Nas colmeias, essa resina tem função protetora, por revestir favos de mel e impedir a entrada de invasores, sendo complementada com cera, formando uma colmeia de estrutura firme (MEYER, 1956; GREENAQWAY; SCARYSBROOK; WHATLEY, 1990). Além disso, é capaz de vedar orifícios (SEELEY & MORSE, 1976) e proteger contra bactérias, fungos, parasitas e vírus (BANKOVA, 2005).

No Brasil, existem 12 tipos de própolis com características distintas, baseadas nas propriedades físico-químicas (cor, textura, composição química), região de origem (PARK; ALENCAR; AGUIAR, 2002) e florada do local de coleta (RUFATTO et al., 2017), ou seja, sua composição dependerá da biodiversidade (MACHADO et al., 2016). No ano de 2007, foi elucidado o 13º tipo de própolis, também conhecido como própolis vermelha (ALENCAR et al., 2007; FREIRES; DE ALENCAR; ROSALEN, 2016) devido a sua coloração intensa adquirida da resina da planta *Dalbergia ecastophyllum*. Esse tipo de própolis é amplamente encontrado em manguezais na região nordeste do Brasil, dos estados de Sergipe, Alagoas, Paraíba, Pernambuco e Bahia (ALENCAR et al., 2007; FREIRES et al., 2016).

Desde tempos antigos, a própolis é um produto utilizado na medicina popular, por destacáveis propriedades químicas e seu potencial terapêutico, evidenciados por sua ação antiinflamatória, antibactericida, anestésica, cicatrizante (KIM et al., 2008; GHISALBERTI, 1979), antimicrobiana (PARK et al., 1998; BANSKOTA; TEZUKA; KADOTA, 2001), anticarcinogênica (KIMOTO et al., 1998; FROZZA et al., 2017) e antioxidante (VIUDAMARTOS et al., 2008). Os compostos isolados de maior prevalência na própolis são os flavonoides e têm relação direta com a intensa cor vermelha da própolis e sua potencial ação biológica (CUSHNIE; LAMB, 2005; DE FRANCISCO et al., 2018; GHISALBERTI, 1979; ISLA et al., 2005; PICCINELLI et al., 2011).

Suas propriedades tornam a própolis um material interessante para uso tanto na indústria farmacêutica quanto na alimentícia. Entretanto, sua aplicação é limitada, pois apresenta aroma e sabor forte, além de ter baixa solubilidade em água (DA SILVA et al., 2011; NORI et al., 2011). Além disso, os compostos bioativos presentes no material apresentam baixa estabilidade frente a mudanças de pH, presença de oxigênio e exposição à luz. Por isso, a encapsulação pode

ser uma opção para minimizar atributos indesejáveis (FAVARO-TRINDADE; PINHEIRO; ROCHA, 2008; Silva et al., 2013), favorecer o prolongamento da vida de prateleira do produto e proteção do material contra diversas condições ambientais (FAVARO-TRINDADE et al., 2010) e proteger a atividade antioxidante (ANDRADE et al., 2018).

Stafussa et al. (2016), Young et al. (2017), Nguyen et al. (2018), Young & Nitin (2019) e Rubio et al. (2020) conduziram estudos em que foi testada a utilização de leveduras para incorporação e encapsulação de compostos bioativos provenientes de diferentes matérias-primas. Os autores afirmam que o material biológico é um agente com potencial aplicação para proteção de bioativos e pode ser uma boa escolha como material de parede, podendo estender a estabilidade dos compostos bioativos e conservar sua bioatividade. A *Saccharomyces cerevisiae* é uma espécie de levedura usada na fermentação na produção de cervejas e que, após algumas utilizações no processo, costuma ser descartada ou utilizada na alimentação animal. Entretanto, mesmo após utilização no processo cervejeiro, as leveduras ainda apresentam quantidades expressivas de proteínas e vitaminas do complexo B, além de alguns carboidratos, que tornam o material interessante para reutilização, além de apresentar baixo custo por se tratar de um subproduto (RUBIO et al., 2018; RUBIO et al., 2020).

A secagem em *spray-dryer* é muito popular e bastante utilizada para a microencapsulação de compostos bioativos (LIANG et al., 2013; RAY et al., 2016), bem como para secagem de microcápsulas e/ou micropartículas obtidas em meio com alto teor de umidade, como no caso da bioissorção. O pó obtido no processo de secagem por *spray-drying* apresenta boa estabilidade, facilidade para utilização, menor custo para estocagem e transporte, e isso justifica a sua ampla utilização (ASSADPOUR; JAFARI, 2019).

Diante do exposto, o presente trabalho teve como objetivos a obtenção do extrato da própolis vermelha, a caracterização deste extrato, bem como a avaliação de seus potenciais antioxidante e antimicrobiano, e a encapsulação do mesmo em células de leveduras *Saccharomyces cerevisiae* para produção de um pó incorporado com compostos bioativos e alto valor agregado.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Própolis vermelha

A própolis é um produto de origem animal, mas que apresenta substâncias obtidas dos vegetais, que são coletadas por abelhas de espécie *Apis mellifera* (GHISALBERTI, 1979). Sua composição química é variada, pela vasta heterogeneidade que existe no reino vegetal, para cada tipo de própolis pode-se encontrar compostos distintos (KUJUMGIEV et al. 1999; QUIROGA et al. 2006). Por isso, é importante a identificação dessa própolis para caracterizar sua origem. Segundo Ahmed et al. (2017), Anjum et al. (2019) e Burdock (1998), sua composição poderá ser compreendida em enzima salivar (β -glicosidase) das abelhas e cera das plantas, dando assim, um aspecto de resina, também chamada de “cola de abelha”. Sua principal função é de vedação, ao fechar orifícios da colmeia, protegendo a mesma contra a entrada de invasores.

As substâncias exsudadas coletadas para a produção da própolis são obtidas de materiais lipofílicos de folhas e brotos foliares, resinas, mucilagens e gomas (CRANE, 1988; ZABAIYOU et al., 2017), conferindo aspecto pegajoso (GHISALBERTI, 1979) e coloração variada (PARK; ALENCAR; AGUIAR, 2002). A composição da própolis é bastante diversificada por causa da heterogeneidade biológica de espécies de flores e condições climáticas, o que a torna distinta de uma região para outra (BANKOVA; DE CASTRO; MARCUCCI, 2000; BANKOVA, 2005; MARTINOTTI; RANZATO, 2015)

Para Burdock (1998), a composição bruta da própolis é 50 % de resina e bálsamo vegetal, 30% de cera, 10% de óleos essenciais e aromas, 5% de pólen e 5% de outras substâncias, sendo essas diversas e difíceis de mensurar (PRZYBYŁEK; KARPIŃSKI, 2019). Ainda, a própolis apresenta teores de flavonoides, ácidos fenólicos, ésteres (GÓMEZ-CARAVACA et al., 2006; PELLATI et al., 2011) e terpenos (ZABAIYOU et al., 2017). Para cada tipo de própolis (marrom, verde e vermelha), seus valores distinguirão (ANDRADE et al., 2017).

A própolis vermelha brasileira (Figura 1) é encontrada abundantemente no Nordeste do Brasil, contribuindo como um ativo comercial para os apicultores da região, sendo o mais recente tipo de própolis encontrado no mercado, o que faz classificá-la como o 13º tipo (SILVA et al., 2008; MOISE & BOBIŞ, 2020). A principal origem botânica da própolis vermelha é a espécie *Dalbergia ecastaphyllum* (L.) Taub. (Fabaceae) (CCANA-CCAPATINTA et al., 2020). A sua coloração avermelhada a diferencia dos outros 12 tipos de própolis (YONGKUN

et al., 2000; PICCINELLI et al., 2011). Sabe-se que o potencial biológico da própolis está diretamente relacionado com a presença de moléculas bioativas (FREIRES; DE ALENCAR; ROSALEN, 2016), sendo ainda necessário mais estudos que possam comprovar suas propriedades e composição química (ALENCAR et al., 2007).

Figura 1 - Própolis vermelha do Brasil

Própria autoria, 2020

A composição química da própolis é bastante distinta, ocasionada pela enorme variedade de espécies de plantas existentes, dificulta sua padronização (BANKOVA, 2005). Vale ressaltar que a identificação das substâncias ajuda a entender suas propriedades terapêuticas (LOPEZ et al., 2015). Os compostos com maior prevalência encontrados na própolis vermelha são os fenólicos. Neste grupo, os flavonoides se destacam por serem substâncias ativas encontradas na resina, auxiliando nos processos fisiológicos humanos (ALMEIDA et al., 2019), atuando, por exemplo, no controle do envelhecimento, interagindo com os radicais livres e expressando atividade antioxidante (BERRETTA et al., 2017). Ainda, os flavonoides são apontados como alguns dos compostos químicos responsáveis pela coloração da própolis (BURDOCK, 1998).

Neste sentido, as propriedades biológicas da própolis favorecem a comercialização no mercado interno e externo, sendo afirmado por Berretta et al., (2017), quando citam as diferentes formas de apresentação do produto, que pode ser encontrado como extrato em pó ou líquido ou em comprimidos, cápsulas, xaropes, vaporizadores ou cremes. O beneficiamento da própolis vermelha facilita sua exploração no segmento industrial, sendo proposto por Nascimento et al. (2019), ao citar a sua valorização nos produtos das indústrias farmacêuticas e cosméticas.

A população europeia, quando comparada com a americana, tem maior variedade de produtos com própolis a sua disposição, tais como cápsulas, fio e creme dental (BURDOCK,

1998), por exemplo. Entretanto, nas últimas décadas, vem crescendo seu uso no setor alimentício e farmacêutico (RIGHI et al., 2011) e isso pode estar associado às suas funções como agente antifúngico, antibacteriano, antiparasitário e cicatrizante (FASOLO et al., 2020; DEEGAN et al., 2019; MARTINS et al., 2019; SINOTT et al., 2019; SILVA et al., 2021; ZANCANELA et al., 2019). Ainda, por aliviar infecções gastrointestinais (NINA et al., 2015) e apresentar atividades antioxidante (ALMEIDA et al., 2019) e anticarcinogênica (MENDONÇA et al., 2015; Ren et al., 2003).

2.2 Compostos bioativos da própolis vermelha

As substâncias bioativas de fontes naturais vêm atraindo o consumidor, visto que podem agregar valor nutricional na elaboração de novos produtos e fazer parte da dieta humana, por terem características importantes que melhoram a eficiência do organismo e previnem o desenvolvimento de algumas doenças (KIELISZEK et al., 2018).

Estudos comprovam a presença de diversas substâncias que fazem parte da composição da própolis, entre estas, podemos citar: taninos, catequinas, chalconas, auronas, xantonas, triterpenóides pentacíclicos, gutiferonas, flavonóides (liquiritigenina, naringenina), isoflavonas (formononetina, biochanina A), isoflavanos (vestitol, neovestitol, 7-O-metilvestitol), pterocarpanos (medicarpina, homopterocarpina, vesticarpan), isoflavanos C30, isoliquiritigenina, benzofenonas poliisopreniladas (PPBs), gutiferona E/xantocimol, oblongifolina A, 3,8-dihidroxi-9-metoxipterocarpan, 3,4-dihidroxi-9-metoxipterocarpan e 3-hidroxi-8,9-dimetoxipterocarpan (MENDONÇA et al., 2015; PICCINELLI et al., 2011; CCANA-CCAPATINTA et al., 2020). Silveira Regueira-Neto et al. (2019), em sua pesquisa, comprovaram semelhança na resina *Dalbergia ecastaphyllum* com a própolis vermelha, afirmando assim, que ambas apresentam a mesma atividade biológica.

Ainda, Alencar et al. (2007) conseguiram identificar vinte tipos de compostos na própolis vermelha brasileira por GC-MS, citando: Ácido butanodioico, éster dimetílico; Ácido hidroxi-butanodioico, éster dimetílico; *m*-guaiacol; 1-metoxi-4- (1-propenil) -benzeno; Methyleugenol; metilo *o*-orsellinate; 1,2,3-Trimetoxi-5- (2-propenil) -benzeno; Methoxyeugenol; Ácido hexadecanóico, éster metílico; Ácido 10-octadecenóico, éster metílico; Abietato de metila; Ácido benzóico; Homopterocarpina; Medicarpin; 2,4,6-Trimetilfenol; 4',7-Dimetoxi-2'-isoflavonol; 7,4'-Diidroxiisoflavona; 2*H*-1-benzopiran-7-ol; 2,2,6-Beta-trimetil-biciclo (4.3.0) non-9 (1) -en-7.alpha.-ol; 1,1,2-Trimetil-3,5-bis (1-metiletenil) -, (2.alfa., 3.alfa., 5.beta.) – ciclohexano.

Em estudo realizado por Oldoni et al. (2011), foram identificados dois isoflavonoides (vestitol e neovestitol) na própolis vermelha brasileira e os autores comprovaram que o vestitol é um potente antioxidante. Os taninos flobafenos, catequinas, chalconas (isoliquiritigenina), auronas, flavononas (liquiritigenina, pinocembrina e naringenina), flavonóis, flavonas (galangina), xantonas, triterpenóides pentacíclicos, gutiferonas, isoflavonóides (formononetina, biochanina A, daidzeína, genisteína), pinocembrina, isoflavonas, ácidos fenólicos e pterocarpanos (medicarpina) também foram identificados (de MENDONÇA et al., 2015; LÓPEZ et al., 2014; da CRUZ ALMEIDA et al., 2017).

Os compostos químicos encontrados em maior prevalência e que servem como marcadores químicos na identificação da própolis vermelha são os compostos fenólicos, que incluem os flavonoides (catequinas- flavan-3-ol, chalconas, auronas, flavonas, flavonóis, isoflavonas- pterocarpanos, formononetina, biochanin A, pinocembrin, medicarpin), flobafeno taninos, xantonas e triterpenóides pentacíclicos (de MENDONÇA et al., 2015). Entre esses, pode ser destacada a formoneitina (PICCINELLI et al., 2011). Também o vestinol e neovestitol ganham destaque por ter ação terapêutica no processo inflamatório, estudadas isoladamente, ou seja, isso leva a própolis vermelha ser pesquisada por representar promissora fonte natural de compostos bioativos, favorecendo a busca para um método de produção e explicar a ação dos mecanismos de defesa que a elucidam como um produto natural tão rico (BUENO-SILVA et al., 2013).

As estruturas químicas de alguns compostos bioativos são representadas na Figura 2.

Figura 2 - Estruturas químicas dos bioativos: (A) isoflavonas, retusapurpurins A e B; (B) Formononetina; (C) Neovestitol e (D) Vestitol.

Fonte: (BERRETTA et al., 2017); (RÜFER; KULLING, 2006); (BUENO-SILVA et al., 2013).

2.2.1 Fenólicos

Os compostos fenólicos são caracterizados quimicamente por apresentarem anel aromático contendo uma ou mais hidroxilas, incluindo seus derivados (SHAHIDI; NACZK, 2004). Ainda esse composto forma o grupo de metabólitos secundários de plantas, que varia em tamanho, com estrutura simples de baixo peso molécula com um anel fenólico e até mesmo com alto peso molecular, compreendendo estruturas mais complexas (KUMAR et al., 2021).

Moniruzzaman e colaboradores (2014) conseguiram identificar compostos químicos, pertencentes dos fenólicos, que são divididos em flavonóides (catequina, naringina, miricetina, naringenina, hesperetina, kaempferol e apigenina) e ácidos fenólicos (ácido gálico, ácido clorogênico, ácido cafeico, ácido conífero, ácido benzóico e trans- ácido cinâmico). Os teores desses compostos podem variar em função do tipo de própolis, obtida de diferentes regiões, ou seja, o que dificulta a determinação da sua composição química (TEIXEIRA et al., 2010).

Amplamente, esses compostos são encontrados na natureza e apresentam papel importante para as células, no intuito de neutralizar o estresse oxidativo, possibilitando a prevenção da apoptose, isso é possível pela captação de espécies de oxigênio reativo (NOEL et al., 2000; DUMITRIU et al., 2015).

2.2.2 Flavonoides

A estrutura química dos flavonoides consiste na presença de 15 átomos de carbono ligados em três anéis (Figura 3), representado da seguinte forma: $C_6 - C_3 - C_6$. Entre algumas classes dos flavonoides, pode-se citar as flavonas, flavanonas, isoflavonas, flavonóis, flavonóis, flavan-3-ols e antocianidinas; biflavonas, chalconas, auronas e cumarinas (PIETTA, 2000). Os principais flavonóides compreendem em torno de 25 a 30% do extrato etanólico de própolis, comparando em base seca da mesma (HAVSTEEN, 1983).

Os flavonoides são polifenólicos amplamente encontrados em plantas e apresentam funcionalidade ativa (KAMILOGLU et al., 2020). Esses compostos químicos constituem a dieta humana e têm importância no controle de disbúrbios metabólicos (COOK, 1996; MARTINOTTI; RANZATO, 2015). Esses são derivados dos compostos fenólicos, têm baixo peso molecular e por apresentar dois anéis aromáticos que são ligados a uma ponte de três carbonos que formam um anel heterocíclico, quando ocorre alteração na sua fórmula padrão é possível que haja a substituição desse anel heterocíclico, podendo formar flavonóis, flavonóis,

flavonas, flavanonas, isoflavonas e antocianidinas (Figura 3) (MONIRUZZAMAN et al., 2014; BALASUNDRAM; SUNDRAM; SAMMAN, 2006).

Em estudo realizado com a própolis vermelha da região nordestina, foi constatado um elevado teor de flavonoides em sua composição (DAUGSCH et al., 2008). A presença dessa substância favorece benefícios à saúde humana, principalmente por apresentar poder antioxidante (KUMAR et al., 2021; MONIRUZZAMAN et al., 2014). De acordo com Abraham Domínguez-Avila et al. (2017) afirmam que uma alimentação rica em flavonóides podem atuar para a redução do desenvolvimento de patologias crônicas, como alguns tipos de câncer, diabetes tipo 2 e cardiovasculares.

Figura 3 - Estrutura do flavonoide

Fonte: (KAMILOGLU et al., 2020)

2.2.2.1 Isoflavonoides

Os isoflavonoides são obtidos através da via naringenina do processo de biossíntese dos flavonóides, que são classificados de dois tipos: isoflavonas e coumestanos (KUMAR et al., 2021). A daidzeína, genesteína e glicetina são incluídas no grupo das isoflavonas, já os coumestanos consistem em coumestrol (TURNER; THOMSON; SHAW, 2003).

As isoflavonas são constituídos por compostos químicos ditribuídos na natueza, especificamente nas plantas. Estudos demonstram o valor biológico dessa substância em formulações dietéticas e farmacêuticas, por apresentar ação antioxidante, antialérgico e de agente estrogênico, essas propriedades se dá pelas isoflavonas formarem um grupo de

substâncias químicas naturais e não esteróides. Com isso, esse composto têm a capacidade de retardar o envelhecimento celular, acelera a regeneração celular e participa da biossíntese do colágeno nos fibroblastos (MUNRO et al., 2003).

2.3 Capacidade antioxidante

O estresse oxidativo, causado por espécies ativas de oxigênio, acomete o envelhecimento celular e promove doenças degenerativas, como o câncer (NOGUCHI; NIKI, 2000), doenças cardiovasculares (MAQSOOD et al., 2020) e doenças neurodegenerativas (como Alzheimer e Parkinson) (KIM et al., 2015). No intuito de prevenir a oxidação, torna-se necessário o controle dos fatores externos (contato com o oxigênio, exposição a luz, temperatura alta e metais) que têm influência na formação de radicais livres (RIBEIRO; JORGE, 2017). Logo, os compostos antioxidantes apresentam como função combater a formação desses radicais, reduzir hidroperóxidos e peróxido de hidrogênio, no intuito de diminuir o dano celular (NOGUCHI; NIKI, 2000).

Ou seja, para o controle da produção dos radicais livres, os antioxidantes primários reagem com os radicais, cedendo um próton a um radical livre, culminando na formação de estruturas mais estáveis. Os antioxidantes secundários, também chamados de preventivos, reduzem a etapa de iniciação da cadeia (GORDON, 1990).

A Figura 4 expressa a sequência de reações entre o radical livre e o antioxidante.

Figura 4 - Mecanismo de ação dos antioxidantes

Fonte: (JORGE, 2009)

Os antioxidantes sintéticos que podem ser encontrados nos alimentos industrializados são os butil-hidroxianisol (BHA), butil-hidroxitolueno (BHT), propil-galato (PG) e terc-butil-hidroquinona (TBHQ) (Figura 5). Estes apresentam estruturas fenólicas, com isso, cedem um

próton para o radical livre, interrompendo a reação de oxidação e regenerando a molécula do acilglicerol (ZHANG; WU; WENG, 2004; JORGE, 2009).

Figura 5 - Estrutura fenólica dos antioxidantes sintéticos

Fonte: (JORGDE, 2009)

A busca da sociedade por produtos que melhorem a qualidade de vida, impulsiona o uso de substâncias bioativas de fontes naturais na indústria de processamento de alimentos, reduzindo a utilização dos antioxidantes sintéticos (RIBEIRO; JORGE, 2017; MIRA-SÁNCHEZ; CASTILLO-SÁNCHEZ; MORILLAS-RUIZ, 2020). Os carotenoides (STAHL; SIES, 2003), tocoferóis (vitamina E) (JORGE, 2009), ácido ascórbico (VASILAKI et al., 2019) e polifenóis (CURTI et al., 2019) são considerados exemplos de antioxidantes naturais (Figura 6).

Figura 6 - Antioxidantes naturais (tocoferol, carotenóides)

Fonte: (JORGE, 2009); (MAQSOOD et al., 2020)

Para identificar a atividade antioxidante dos extratos vegetais, os métodos DPPH (BRAND-WILLIAMS; CUVELIER; BERSET, 1995), ABTS (NENADIS et al., 2004), FRAP (BENZIE & STRAIN, 1996), ORAC (PRIOR et al., 2003), redução do reagente Folin-Ciocalteu (fenólicos totais) (WOISKY; SALATINO, 1998) e beta-caroteno (MILLER, 1971) podem ser utilizados.

Uma das propriedades biológicas estudadas na própolis vermelha é seu poder antioxidante. Nascimento et al. (2019), Santos et al. (2019) e Papachristoforou et al. (2019) afirmam que todas as amostras de própolis vermelha analisadas apresentaram propriedade antioxidante. Assim, com suas ações biológicas, a mesma pode ser usada no beneficiamento de alimentos na indústria alimentícia como antioxidante.

2.4 Atividade antimicrobiana

Os microrganismos utilizados em análises microbiológicas, para averiguar a ação potencial dos compostos bioativos da própolis, que possam minimizar seu crescimento, são os Gram-positivos (*Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Listeria monocytogenes*, *Enterococcus faecalis*) e os Gram-negativos (*Enterobacter aerogenes*, *Salmonella typhimurium*, *Shigella flexneri*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Providencia rettgeri*, *Klebsiella pneumoniae*) (THAMNOPOULOS et al., 2018; SEIBERT et al., 2019; KLHAR et al., 2019).

A própolis surge como uma alternativa contra microrganismos deteriorantes, assim pode ser utilizada na indústria alimentícia como aditivo para conservação dos alimentos, controlando a proliferação microbiana e prolongando a vida de prateleira dos mesmos (TOSI et al., 2007; SEIBERT et al., 2019). Yang et al. (2017) e Santos et al. (2019) mostraram a utilização da própolis como um aditivo natural em suco de frutas e produtos lácteos, respectivamente.

Estudos realizados por Scatolini et al. (2018), Silva et al. (2019) e Letullier et al. (2020) afirmam que a atividade antibacteriana do extrato da própolis vermelha é mais eficiente contra bactérias Gram-positivas em relação às Gram-negativas, por apresentar elevado poder antibacteriano, mesmo quando utilizado menor concentração inibitória mínima (CIM) (CHEN et al., 2018). Esse poder antimicrobiano é atribuído à composição química da própolis, por apresentar flavonóides (quercetina e naringenina), que promovem modificações na membrana bacteriana e na sua mobilidade (MIRZOEVA; GRISHANIN; CALDER, 1997). Em contrapartida, (RUFATTO et al., 2018) conseguiram obter concentrações inibitórias mínimas (CIMs) contra *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas*

aeruginosa, isso pode ser justificado pelas diferentes concentrações de extrato de própolis utilizadas.

Esses compostos antimicrobianos naturais podem ser microencapsulados, no intuito de proteger os compostos bioativos e ainda favorecer a liberação controlada nos alimentos, sendo uma alternativa promissora para diminuir a interação com os compostos alimentares e aumentar a estabilidade dos mesmos no período de armazenamento (CASTRO-ROSAS et al., 2017).

2.5 Biossorção

O termo biossorção vem do prefixo “bio” mais “sorção”, que corresponde à ligação do soluto com uma matriz biológica, sendo um processo físico-químico onde uma substância é incorporada por outra, ou seja, por ocorrer adsorção (FOMINA; GADD, 2014). O termo “sorção” pode ser utilizado tanto para absorção ou adsorção, visto que esses são frequentemente confundidos. Michalak; Chojnacka; Witek-Krowiak (2013) e Gadd (2009) esclarecem que a absorção é a incorporação de substâncias em estado físico em outra com estado físico diferente, como sólidos ou gases. Em contrapartida, a adsorção é o contato físico de íons ou moléculas na superfície de um material na forma sólida.

A primeira publicação sobre biossorção data de 1951 e, a partir de então, pesquisas vem sendo realizadas na procura de biomateriais eficientes, econômicos e aplicáveis a princípio para o tratamento de água (MICHALAK; CHOJNACKA; WITEK-KROWIAK, 2013). Os materiais empregados como biossorbente podem ser, por exemplo, biomassas vegetais e materiais biológicos (WITEK-KROWIAK; HARIKISHORE KUMAR REDDY, 2013; VOLESKY, 2007).

Alguns autores que trabalharam com biossorção e utilizaram leveduras como biossorbente fizeram a captação de substâncias como corantes (MAHMOUD, 2016), chumbo e cádmio (HADIANI et al., 2018), urânio (ZHENG et al., 2018) e compostos fenólicos extraídos de matrizes vegetais (RUBIO et al., 2018; OLIVEIRA et al., 2019; RIBEIRO et al., 2019). No segmento alimentício, a proposta da biossorção pode ser atraente ao utilizar resíduos de fermentação, que se obtém com maior facilidade, por serem produtos que estão em uso e descarte contínuo, sendo considerados, por consequente, de baixo custo. Arief et al. (2008) reforçam que como a biossorção é seletiva, esta consegue concentrar compostos até em mínimas concentrações de solutos e por seu processo ser ecológico, não gera substâncias tóxicas.

No estudo de biossorção, a avaliação da cinética do processo é de extrema importância. Os modelos cinéticos de pseudo-primeira e segunda ordem, bastante utilizados, baseiam-se na hipótese de que a taxa de sorção será proporcional ao número de espaços livres na superfície do sorvente, com

base na concentração do soluto em um dado intervalo de tempo (MICHALAK; CHOJNACKA; WITEK-KROWIAK, 2013; KHAKPOUR; YOUNESI; MOHAMMADHOSSEINI, 2014). O modelo de pseudo-primeira ordem é um modelo cinético que melhor funcionará no rápido período de tempo do processo de biossorção (KIELISZEK et al., 2018). Já o modelo de pseudo-segunda ordem, expressa de melhor forma o comportamento cinético (RIBEIRO et al., 2019; REDDY; LEE; SESHIAIAH, 2012; REDDY et al., 2011; WITEK-KROWIAK, 2011). Neste modelo acontece dois tipos de reações, a primeira é rápida e alcança rapidamente o equilíbrio e a segunda é mais lenta, podendo acontecer por longo tempo, em paralelo ou em série (KHAKPOUR; YOUNESI; MOHAMMADHOSSEINI, 2014). Vale ressaltar também que o tempo de equilíbrio é importante para saber a eficiência do processo em determinado tempo, ou seja, indica o tempo de biossorção em que a amostra não consegue adsorver mais os compostos em questão, entrando em equilíbrio.

2.6 Microencapsulação

2.6.1 Aspectos gerais

A microencapsulação é uma técnica utilizada no intuito de aprisionar substâncias que possam apresentar funções benéficas para o organismo humano, como é o caso dos bioativos. De acordo com Desai & Park (2005), a microencapsulação em alimentos torna-se um meio de proteção para compostos sensíveis, diminuindo as perdas nutricionais, preservando ou mascarando aromas, sabores e prolongando sua estabilidade. Além da utilização do método de encapsulação para os compostos bioativos, pode ser utilizado também para aprisionar enzimas, microrganismos, minerais e corantes (SAMANTHA et al., 2015; BURGUT, 2021).

As partículas possuem propriedades importantes, que protegem e impedem a degradação dos compostos frente a fatores externos, como oxigênio, calor, luz, umidade (GOUIN, 2004; JYOTHI et al., 2010; DESAI & PARK, 2005). A microencapsulação é empregada na área alimentícia, farmacêutica e agroquímica por apresentar satisfatório efeito de encapsulação dos ingredientes, com elevado valor agregado (MADENE et al. 2006; PARAMERA et al., 2011); (UBBINK e KRÜGER, 2006), pois a qualidade sensorial do material que é encapsulado não pode ser alterada com a adição de substâncias encapsulantes, além de ter que resistir a ação do sistema digestivo (FAVARO-TRINDADE; PINHO; ROCHA, 2008). Ou seja, sua finalidade é de “empacotamento” do material ativo, estando na forma sólida, líquida ou gasosa, sendo envolvido por uma ampla gama de materiais de parede, para formar

partículas pequenas, chamadas de microcápsulas (NAZZARO et al., 2012; RAY et al., 2016; FÁVARO-TRINDADE; PINHO; ROCHA, 2008).

Desta forma, com a obtenção das partículas é possível determinar sua morfologia, em microcápsulas ou microesferas (Figura 7). A microcápsula, possui forma esférica, apresentando uniformidade em sua parede (material de membrana, revestimento ou concha), que recobre o núcleo (fase interna). A mesma pode apresentar mais de uma parede e de um núcleo, e este pode ser uma partícula adsorvente irregular, emulsão, material cristalino, suspensão de sólidos ou de microcápsulas menores. Já a microesfera é composta por uma matriz polimerizada homogênea, na qual o material ativo se encontra disperso em uma rede de matriz e por toda a estrutura da partícula (GHARSALLAOUI et al., 2007; NESTERENKO et al., 2013).

Figura 7 - Morfologia das microcápsulas e microesferas

Fonte: (GHARSALLAOUI et al., 2007); (SILVA et al., 2003); (MATTÉ; DA ROSA, 2013)

O tamanho dessas partículas pode ser inferior a 1 μm , conhecidas por serem nanopartículas, nanocápsulas ou nanoesferas (REMUÑÁN; ALONSO, 1997), também podem apresentar diâmetro entre 3-800 μm , classificadas como micropartículas, microcápsulas ou microesferas. Já as que possuem 1000 μm são macropartículas (THIES, 1996).

O material de revestimento para realizar o processo de encapsulação é muito importante, pois influencia na eficiência de encapsulação e estabilidade da microcápsula (RAY; RAYCHAUDHURI; CHAKRABORTY, 2016). Para Desai & Park (2005) o material de revestimento precisa apresentar as seguintes características: capacidade de dispersar ou

emulsionar, facilidade de trabalhar durante o encapsulamento, capacidade de selar e reter o material ativo, capacidade de fornecer proteção máxima ao material ativo, capacidade de liberar completamente o solvente. Em adição, Castro-Rosas et al. (2017) afirmam que esses materiais devem ter baixo custo e não podem ser tóxicos. Possíveis agentes incluem os polissacarídeos (amidos, maltodextrinas, xaropes de milho, goma arábica, pectinas, sacarose, celulose, ágar e carragenina), lipídios (ácido esteárico, mono e diglicerídeos) e proteínas (gelatina, caseína, soro de leite, soja e trigo) (GIBBS et al., 1999; SAMANTHA et al., 2015; JANISZEWSKA-TURAK, 2017).

A Tabela 1 cita os tipos de agentes encapsulantes que foram utilizados no processo de microencapsulação por *spray drying* de alguns tipos de própolis estudados.

Tabela 1 - Utilização de agentes encapsulantes para microencapsulação de própolis.

Própolis	Agente encapsulante	Método de Encapsulação	Referências
Própolis da Sulawesi-Indonésia	Maltodextrina; Goma arábica	<i>Spray dryer</i>	(SUKRI et al., 2020)
Própolis <i>tetragonula</i> spp.	Maltodextrina; Goma arábica	Pulverização	(PRATAMI et al., 2019)
Própolis de Mogi Guaçu- SP	Pectina Genu; Proteína isolada de soja	Coacervação complexa	(NORI et al., 2011)
Própolis de Maringá-Paraná	Gelatina	<i>Spray dryer</i>	(BRUSCHI et al., 2003)
Própolis <i>Tetragonula</i> spp.	Maltodextrina; Goma arábica	<i>Spray dryer</i>	(PRATAMI et al., 2020)
Própolis do Rio Grande- RS	Proteína de ervilha	Atomização	(JANSEN-ALVES et al., 2019)
Própolis do Tigre	Maltodextrina; Goma arábica	Atomização	(BUSCH et al., 2017)
Própolis vermelha	Maltodextrina; Goma xantana; Amido	<i>Spray dryer</i>	(DO NASCIMENTO et al., 2019)
Própolis do Rio Grande- RS	Proteínas de arroz; Ervilha; Soja; Ovoalbumina	<i>Spray dryer</i>	(JANSEN-ALVES et al., 2018)

Própolis da Turquia	Carboidratos: maltodextrina; lactose; goma arábica. Proteína: gelatina; caseinato de Na	Liofilização; Pulverização	(BAYSAN et al., 2021)
---------------------	---	-------------------------------	--------------------------

Em conclusão, Nori et al. (2011) relatam que para facilitar a comercialização e utilização da própolis no seguimento alimentício, esta precisa ser revestida com algum tipo de agente veicular que mascare suas características sensoriais, diminuindo seu sabor intenso e favorecendo resistir as condições ambientais, para preservar os compostos bioativos. Baysan et al. (2021), ao estudarem vários tipos de revestimentos (carboidratos, maltodextrina, lactose, goma arábica, gelatina, caseinato de Na, proteína de soro de leite, poliricinoleato de poliglicerol, óleo de girassol) para incorporação de própolis, revelaram a importância da encapsulação na proteção da atividade antioxidante do material, além de prolongar sua via útil e favorecer a utilização.

2.6.2 *Spray drying*

A técnica de secagem por atomização ou *spray drying* é considerada como uma das mais comuns, de baixo custo e alta eficiência para encapsulação. Consiste na conversão de estado líquido da amostra em sólido, em forma de pó, tornando assim uniforme, fácil para manuseio, transporte e armazenamento (BAYSAN et al., 2021; BÖGER; GEORGETTI; KUROZAWA, 2018). Mas para que o material encapsulado tenha características desejáveis após a obtenção em forma de pó, as condições operacionais precisam ser determinadas (MAROOF et al., 2020).

Para encapsulação por *spray drying*, o material ativo é disperso, solubilizado ou emulsionado em um polímero, posteriormente é pulverizado dentro do secador, que entra em contato com uma corrente de ar quente. Com o processo de troca de calor, a água evapora, transformando suas gotículas em micropartículas, com isso, os compostos bioativos ficam aprisionados na parede dessas micropartículas que são ocas (BANSODE et al., 2010). Com uma ampla aplicabilidade, essa técnica proporciona proteção dos compostos ativos, dos microrganismos, das enzimas e dos corantes, que venham sofrer durante o processamento (SERRA COSTA et al., 2015).

Para Shahidi; Han (1993) e Mendonsa et al. (2020), esse método é baseado em etapas fundamentais, compostas por: atomização de líquido, interação entre líquido e gás de secagem, evaporação do líquido da solução e separação das partículas secas do gás de secagem. Ou seja,

o *spray dryer* é um equipamento onde é realizada a técnica onde um líquido (solução, emulsão ou suspensão) passa por uma corrente de gás (ar ou nitrogênio) quente para obtenção de um pó fino (GHARSALLAOUI et al., 2007).

A Figura 8 representa o processo básico de secagem por atomização.

Fonte: (ARPAGAUS et al., 2018)

Várias formulações alimentícias podem ser preparadas no intuito de encapsular por *spray drying*, usando ingredientes tais como óleos, emulsões, compostos voláteis, probióticos, compostos ricos em açúcar, moléculas bioativas, enzimas e agentes antimicrobianos. Após a escolha da formulação, o que será alterado é a alimentação e os parâmetros do processo para obtenção de pós distintos (ASSADPOUR; JAFARI, 2019).

Andrade et al. (2018), conseguiram obter pós de própolis brasileira marrom, verde e vermelha (Figura 9), encapsuladas com goma arábica e maltodextrina e secas em *spray drying*, utilizando os seguintes parâmetros: temperatura de alimentação de 135 °C para entrada de ar de secagem e 70 °C para saída de ar, sistema de alimentação de 0,40 L/h, fluxo de ar comprimido de 30 L/minuto e uma vazão do ar de secagem em 4 m³. min⁻¹. Com a escolha dos agentes encapsulantes, os autores conseguiram promover a secagem do material e as micropartículas apresentaram com características típicas pelo método de secagem empregada.

Figura 9 - Microencapsulação de compostos bioativos de três variedades de própolis brasileira por *spray drying*

Fonte: (ANDRADE et al., 2018)

Desse modo, novos veículos de transportes podem ser testados em extratos de própolis para certificar sua eficiência e comparar com outros estudos que utilizam distintos materiais encapsulantes, dessa forma, poderá possibilitar a escolha do melhor ingrediente encapsulante e técnica de secagem, para favorecer a comercialização dos pós ricos em bioativos, que poderá ser atrelado a novos produtos ou aos já existentes na indústria alimentar.

2.6.3 Levedura *Saccharomyces cerevisiae*

Os agentes carreadores, transportadores ou veiculares são bastante utilizados para a microencapsulação, pois possibilitam a obtenção de produtos com características que conferem proteção ao material encapsulado, além da facilidade do manuseio. Salari et al. (2015), Zuhrotun et al. (2016), Sultana et al. (2017) e Young; Rai; Nitin (2020) utilizaram cepas de leveduras para microencapsulação em substituição a outros agentes encapsulantes.

A *Saccharomyces cerevisiae* é uma espécie de levedura usada na fabricação de vários produtos alimentícios, encontrada em célula inativa ou intacta, como ainda em extratos (YOUNG et al., 2017). Além disso, é uma alternativa para microencapsulação, pois pode servir como material de parede para os compostos bioativos presentes na própolis. Normand et al.

(2005), Dardelle et al. (2007) e Paramera et al. (2011) afirmam que a utilização de células de leveduras misturada em água para incorporar material ativo, torna-se um processo simples e econômico de microencapsulação. Portanto, a levedura se mostra uma alternativa para a microencapsulação e esse agente transportador é bastante promissor para promover uma solução natural, de boa encapsulação e diminuir custos para uso em alimentos funcionais e bebidas (YOUNG et al., 2017).

As características das células das leveduras as tornam um bom material de membrana para envolver ingredientes hidrofílicos e hidrofóbicos, permitindo a difusão de moléculas (NAKHAE MOGHADAM; KHAMENEH; FAZLY BAZZAZ, 2019). Ainda, torna-se importante determinar a concentração desse resíduo para a incorporação do extrato, visto que, poderá afetar diretamente na concentração dos compostos bioativos, pois Sukri et al. (2020) obtiveram oscilações nas concentrações dos compostos químicos analisados, caracterizados pelo teor do agente encapsulante utilizado.

O presente estudo propõe utilizar leveduras residuais da indústria cervejeira, servindo como agente para biossorção, bem como transportador para secagem pela técnica de *spray drying*. A levedura *Saccharomyces cerevisiae* é uma opção que pode ser útil para encapsulação, por servir como um agente transportador alternativo para obtenção de produtos de própolis secos por atomização. Portanto, a microencapsulação por atomização de compostos bioativos do extrato de própolis vermelha utilizando leveduras residuais poderá ser mais uma alternativa metodológica para obtenção de resultados que complementem os já existentes, pois de acordo com Da Silva et al. (2011) a secagem de própolis por *spray drying* reduz os danos que os compostos fenólicos presentes na amostra possam sofrer.

Tendo em vista que a própolis vermelha é uma nova variedade encontrada no Brasil e não é bem aceita por algumas populações, como a do Japão, por não consumirem alimentos com teor alcoólico, indubitavelmente é importante averiguar se a técnica de microencapsulação em leveduras promoverá a preservação dos compostos biologicamente ativos, que os tornam atrativos para serem consumidos, podendo assim, elucidar suas propriedades biológicas e proporcionar funções terapêuticas. Ademais, Silva et al. (2013) enfatizam que atualmente diversas indústrias alimentícias buscam por ingredientes naturais que possam servir como aditivos alimentares para a elaboração de produtos funcionais, por isso, as características antioxidantes e antimicrobianas da própolis são de grande valia no setor alimentício, por proporcionar controle da oxidação lipídica, da estabilidade do produto e estender a vida de prateleira.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Obtenção da própolis vermelha

Neste trabalho, foi utilizada uma variedade de própolis vermelha do “tipo 13”, obtida de colônias de abelhas da espécie *Apis mellifera*. A própolis foi adquirida em junho de 2020, de apicultores da cidade de Maceió, estado de Alagoas, na região Nordeste do Brasil, localidade de maior produção da mesma. A própolis vermelha foi triturada em liquidificador (modelo RI 1710, Walita, Philips, Brasil), para obtenção de fragmentos menores (Figura 10) e posterior utilização no preparo do extrato.

Figura 10 - Própolis vermelha fragmentada (a); Própolis vermelha triturada (b)

Própria autoria, 2020

3.2 Preparo do solvente

Foi preparado álcool etílico 80% (v/v) através da diluição de etanol absoluto (Êxodo Científica Química Ltda, Sumaré, SP, Brasil) com água ultrapura (Merck Millipore, Direct-Q3).

3.3 Preparação do extrato

A preparação do extrato etanólico de própolis vermelha foi realizada seguindo uma proporção de 30 g de própolis para 100 mL de etanol a 80%, segundo método proposto por Nori et al. (2011), com algumas modificações. A mistura foi colocada em banho-maria (Ultra Cleaner 1400, Unique) a 50 °C com agitação mecânica de 800 rpm (Marconi, modelo MA 085, Brasil) por 30 minutos. Transcorrido esse período, as amostras foram centrifugadas à temperatura de 25 °C e 4500 g por 10

minutos, para remoção dos sólidos e obtenção do extrato etanólico (EEP), que em seguida foi concentrado até 40% do volume inicial em rotaevaporador (TE-211, Tecnal, Piracicaba, Brasil), na temperatura de 45 °C. Neste trabalho, o extrato de própolis concentrado será identificado pela sigla EPC. Como é considerado um material bioativo, foi armazenado em frasco hermeticamente fechado de vidro, protegido da incidência de luz e mantido sob refrigeração até sua utilização.

Figura 11 - Mistura de própolis vermelha triturada e álcool 80% (a); Extrato etanólico de própolis – EEP: pós banho-maria (b) e pós centrifugação (c); Extrato concentrado de própolis vermelha – EEPC (d)

Própria autoria, 2020

3.4 Caracterização do extrato bruto de própolis vermelha

3.4.1 Teor de umidade

Para a determinação do teor de umidade, foi utilizado um analisador de umidade (Ohaus, MB35, EUA) equipado com lâmpada de aquecimento de halogênio e radiação infravermelha.

3.4.2 Determinação de formononetina por Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

Formononetina foi a substância presente na própolis utilizada como marcador para avaliação da estabilidade do material. Para determinação de formononetina foi usado um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (Shimadzu, Prominence; Kyoto, Japão) com detector de fluorescência e coluna analítica em fase reversa (Shimadzu, Shim-Pack Gist, 5 µm de C18 com 250 (L) mm x 4,6 (d.i.) mm; Kyoto, Japão). A fase móvel, com fluxo de 0,8 ml/min, foi modificada a partir de Tomás-Barberán et al (1993) e composta de água ultrapura (Merck Millipore, Direct-Q3; Darmstadt, Alemanha) acidificada com ácido fórmico (Sigma-Aldrich; Missouri, EUA) até pH 3,0 (A) e metanol (Honeywell; North Carolina, EUA) (B), com gradiente em B feito da seguinte forma: início em 30%,

de 0-25 min (rampa até 80%), em 25 min (30%), de 25-30 min (30%). O forno da coluna foi mantido a 30°C com injeção de 5 µl da amostra. Os cromatogramas foram adquiridos com excitação em 338 nm e emissão em 488 nm (Wen et al, 2018) e os dados coletados via software LC Solution, versão 1.21 (Shimadzu; Kyoto, Japão). A quantificação foi realizada por padronização externa usando o método dos mínimos quadrados (Microsoft, Excel; Washington, EUA) para relacionar as respectivas médias aritméticas de áreas obtidas de 5 diferentes concentrações em duplicata de formononetina (Sigma-Aldrich; Missouri, EUA) entre 1 a 7 µg/mL. Os resultados foram expressos em mg/g de amostra.

3.4.3 Determinação de fenólicos totais

O teor de fenólicos totais foi determinado pelo método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu (WOISKY; SALATINO, 1998). O método consistiu na realização prévia de uma curva padrão com concentração que variou de 1 a 7 mL de solução padrão de ácido gálico (200 µg.mL). Na realização da análise, uma mistura de 0,5 mL do extrato etanólico de própolis vermelha e 2,5 mL de reagente Folin-Ciocalteu na proporção de 1:10 foi agitada e deixada em repouso no escuro durante 5 minutos. Em seguida, 2 mL de carbonato de sódio a 4% foram adicionados e a mistura foi deixada novamente em repouso na ausência de luz durante 45 minutos, para a oxidação dos fenóis, sendo possível observar a mudança de tonalidade do esverdeado para o azul, após o tempo decorrido do experimento. A leitura foi realizada em 740 nm em espectrofotômetro (Biochrom Libra S22 - Cambridge, Inglaterra), em triplicata. O ácido gálico serviu como substância de referência e os resultados expressos em miligrama de equivalente de ácido gálico (mg EAG) por g de amostra.

3.4.4 Determinação de flavonoides totais

Para a quantificação de flavonoides totais, foi utilizado o método colorimétrico descrito por Park et al. (1995). A curva padrão foi obtida com variações de concentrações de 0,4 a 6,4 mL de solução padrão de quercetina a 200 µg.mL diluída em álcool a 80%. Resumidamente, 0,50 mL do extrato etanólico de própolis vermelha foram misturados com 4,3 mL de álcool a 80%, 0,1 mL de nitrato de alumínio 10% e 0,1 mL de acetato de potássio a 1M. A mistura foi agitada e deixada em repouso por 40 minutos, em proteção da luz. A leitura das amostras foi realizada em 415 nm em espectrofotômetro (Biochrom Libra S22 - Cambridge, Inglaterra), após a leitura do branco, que consistiu em uma solução com todos os reagentes citados anteriormente, exceto a amostra, sendo substituída por álcool a 80%. A quercetina serviu como substância padrão e os resultados foram

expressos em miligrama de equivalente de quercetina (mg EQ) por g de amostra. A leitura foi realizada em triplicata.

3.4.5 Determinação da atividade antioxidante

3.4.5.1 Capacidade de redução de ferro (FRAP)

A capacidade antioxidante em relação ao poder de redução de ferro foi determinado de acordo com Benzie & Strain (1996), com algumas alterações. Foram utilizados 90 μ L do extrato etanólico de própolis vermelha e adicionados 270 μ L de água ultra pura e 2,7 mL do reagente FRAP, que consiste na mistura das soluções de TPTZ (2,4,6-tri(2-piridil)-1,3,5-triazina) 10 nM, cloreto férrico 20 mM e tampão acetato 0,3 M. A curva padrão foi realizada com variação de concentração de 0,40 a 5,0 mL de solução de sulfato ferroso 2 mM (Correção FeSO_4). A mistura contendo a amostra foi homogeneizada e incubada a 37 °C em banho térmico, durante 30 minutos, sob proteção da luz. A absorbância da amostra foi medida em comprimento de onda de 595 nm em espectrofotômetro (Biochrom Libra S22 - Cambridge, Inglaterra) em triplicata e os resultados foram expressos em mmol de equivalente de FeSO_4 por 100 mg de amostra.

3.4.5.2 Capacidade de redução do radical ABTS (ABTS)

Para a determinação da capacidade redutora do radical ABTS (2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin) 6-ácido sulfônico), foi utilizada a metodologia segundo Re et al. (1999), e consistiu na obtenção prévia de uma curva de calibração de 0,5 a 10,0 mL da solução de Trolox (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromo-2-ácido carboxílico). A solução ABTS* foi preparada com a solução de persulfato de potássio (140 Mm) e ABTS (7 mM), que foi deixada reagir por 16 horas em proteção da luz. O preparo da amostra foi feito com 3,0 mL do radical ABTS e 30,0 μ L do extrato etanólico de própolis vermelha, seguido da agitação e repouso por 6 minutos, sob ausência de luz. A leitura das amostras foi realizada em espectrofotômetro (Biochrom Libra S22 - Cambridge, Inglaterra), a absorbância foi medida em comprimento de onda de 734 nm e os resultados expressos em mmol de equivalente de Trolox (mmol ET) por 100 mg de amostra. A análise foi realizada em triplicata.

3.4.6 Determinação da atividade antimicrobiana

3.4.6.1 Microrganismos testados

A atividade antimicrobiana foi testada utilizando as bactérias Gram-negativas *Salmonella enteritidis* CCT 4475 e *Pseudomonas* ATCC 15442. As culturas utilizadas no presente trabalho foram doadas pelo Laboratório Multiusuário de Microbiologia e Higiene Zootécnica, da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos (FZEA).

3.4.6.2 Concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM)

Para o procedimento de determinação da concentração inibitória mínima (CIM), foi utilizado o método de microdiluição em caldo BHI (HiMedia, Mumbai, Índia) em microplacas de 96 poços, descrito por CLSI (2009), com algumas alterações. A suspensão microbiana foi padronizada usando a escala de McFarland para padronizar em 1 a 2×10^5 UFC.mL⁻¹. Posteriormente, foram realizadas as diluições seriadas nos dez primeiros poços, contendo dois tipos de concentrações (1:100 e 1:1000) da formulação do extrato etanólico concentrado de própolis vermelha. Foi preparado o controle positivo para inibição, utilizando antibiótico padrão (55 µL do caldo BHI e 45 µL de Clorafenicol [2,5 mg/mL]) e o controle negativo para inibição sem antibiótico, contendo 95 µL do caldo BHI. O volume final em cada poço foi de 100 µL. As microplacas foram incubadas a 37 °C por 24 horas. Posteriormente, foram adicionados 45 µL de corante 1 mg/mL (I8377- Sigma) em todos os poços, sendo incubados durante 3 horas. Após, foi realizada a leitura para averiguar o controle negativo, onde ocorre o crescimento bacteriano e o controle positivo, onde não existe o crescimento bacteriano.

Para a determinação da concentração bactericida mínima (CBM), foram utilizados 100 µL de cada poço sem evidência de turbidez semeados em placas de Petri contendo BHI (HiMedia, Mumbai, Índia), seguindo a incubação a 37 °C por 24 horas. O CBM corresponde à menor concentração em que não apresenta o crescimento de colônias na superfície do meio de cultura, ou seja, aqueles poços em que não ocorreu crescimento bacteriano, e simboliza a morte do agente patogênico (CABRAL et al., 2009). Todo o experimento foi realizado em duplicata para cada diluição analisada.

3.5 Microencapsulação por *spray drying*

3.5.1 Tratamento e secagem das leveduras

Biomassa de leveduras *Saccharomyces cerevisiae* (S-33, Fermentis Safbrew, cidade país) de descarte foi fornecida gentilmente pela empresa cervejeira Hausen Bier (Araras, SP,

Brasil). Para viabilizar o uso dessa biomassa foi necessário realizar etapas de purificação da mesma, utilizando o procedimento descrito por Rubio et al. (2018), com algumas modificações. O material biológico passou por lavagens sucessivas em água ultrapura até a completa eliminação dos resíduos em suspensão e a separação dos sobrenadantes por decantação. A quantidade de lavagens foi determinada de acordo com o resíduo de levedura obtido, onde o mesmo apresentou pouca sujidade advinda do processo de fabricação industrial, totalizando oito lavagens (Figura 12).

Figura 12 - Aparência da biomassa em cada etapa da lavagem

Própria autoria, 2020

As leveduras lavadas foram diluídas em água destilada (1:3), homogeneizadas, filtradas em peneira doméstica (17 mm) para facilitar a dispersão, evitando assim, sólidos em suspensão e obstrução do bico do atomizador. As leveduras suspensas em água, foram mantidas em agitação mecânica (Marconi, modelo MA 085, Brasil) de 365 rpm constante, antes da entrada no atomizador e durante a secagem em *spray dryer* (MSD 1.0, Labmaq do Brasil Ltda., Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil), evitando que as mesmas decantassem. O *spray dryer* foi operado a uma temperatura de entrada e saída de ar de 140 ± 5 °C e 100 ± 5 °C, respectivamente, taxa de alimentação de $11,66 \text{ mL min}^{-1}$, fluxo de ar de secagem de 2,5 m/s (WEG- CFW8), vazão do compressor de 40 L/min e pressão de atomização de 50 psi e diâmetro do bico atomizador de 1,2 mm (Figura 13a).

As partículas em pó de leveduras foram coletadas do ciclone e acondicionadas a vácuo em embalagem de vidro, hermeticamente fechada, com proteção da luz e congelada a -18°C , até a realização das subseqüentes análises (Figura 13b).

Figura 13 - Atomização das leveduras (a) e partículas de levedura em pó (b)

Própria autoria, 2020

3.5.2 Cinética de bioadsorção

Para o procedimento de bioadsorção, foi realizado em dois tipos de tratamentos, com 15% e 25% de leveduras por extrato de própolis, sendo fixado o volume de extrato e o volume final para todos os tratamentos. As cepas das leveduras atomizadas foram incorporadas ao extrato etanólico concentrado da própolis vermelha (EECPV), essa mistura foi homogeneizada em ultra-turrax (IKA T18 de base), com rotação de 10.000 rpm por 1 minuto, em tubos de ensaio. Seguidamente, os tubos foram tampados com tampa rosqueável, vedados com parafilm e colocados em banho agitado orbital (Marconi, MOD. MA098, Piracicaba, SP) a 140 rpm e 35°C nos períodos de 360, 240, 120, 60 e 1 minutos. Ainda, foram utilizados dois tipos de amostras controle: a) constituída por leveduras e álcool etílico (58°GL) e b) apenas por extrato etanólico concentrado de própolis vermelha (EECPV), onde passaram pelos mesmos parâmetros abordados anteriormente. A Figura 14 ilustra o processo realizado. Os dados de concentração de fenólicos totais e flavonoides foram ajustados ao modelo de pseudo-segunda ordem (Equação 1). O ajuste do modelo foi avaliado por meio do coeficiente de determinação.

$$\frac{t}{q} = \frac{1}{k_2 q_e^2} + \frac{t}{q_e} \quad (1)$$

onde: q = capacidade de sorção (mg/g) no tempo t ; q_e = capacidade de sorção (mg/g) no equilíbrio; e K_2 é a constantes de velocidade.

Figura 14 - Amostras e os respectivos intervalos de tempo (a), homogeneização das amostras no Turrax e no banho agitado (b)

No intervalo de cada tempo, as leveduras carregadas foram centrifugadas a 4500 g por 10 minutos, em temperatura de 25 °C e o sobrenadante foi colhido para a realização da análise de fenólicos totais em triplicata. O experimento foi realizado com duas repetições e o melhor tratamento do processo de bioadsorção, foi submetido à secagem em *spray drying*.

A codificação das amostras foi feita da seguinte forma: E15 e E25 são extratos etanólicos concentrados de própolis vermelha para o tratamento 15% e 25%, respectivamente. O EL15 e EL25 são respectivamente, suspensões feitas com extrato etanólico concentrado de própolis vermelha e 15% e 25% de levedura. AL15 e AL25 são suspensões feitas com álcool etílico e 15% e 25% de levedura, respectivamente.

3.5.3 Preparação das micropartículas por atomização

O método de atomização foi realizado nas amostras preparadas com duas formulações, de 15% e 25% de leveduras em relação ao peso inicial do extrato (m/m). Todas as formulações passaram por homogeneização em ultra-turrax (IKA T18 de base), com agitação mecânica de 10.000 rpm, durante 1 minuto. Porém, após este processo, as suspensões foram submetidas a dois tipos de tratamento: a) secagem por atomização e b) prévia bioadsorção em banho agitado orbital (Marconi, MOD. MA098, Piracicaba, SP) durante 4 horas e posterior secagem por atomização. As amostras controles foram preparadas com leveduras e álcool etílico (58° GL) na proporção de 1:4 e foram conduzidas aos dois tipos de tratamento citados acima, totalizando dez amostras.

As amostras foram identificadas da seguinte forma: Tratamento bioadsorção- 15% (TB15), Tratamento bioadsorção-25% (TB25), Tratamento ultraturrax-15% (TU15), Tratamento ultraturrax-25% (TU25), Controle bioadsorção (CB) e Controle ultraturrax (CU).

3.5.4 Condições operacionais da secagem no *spray dryer*

A secagem por atomização foi realizada segundo o procedimento descrito por Silva et al. (2013), com algumas modificações. Esse experimento foi realizado em duplicata. As amostras foram bombeadas até o bico atomizador para a nebulização das partículas em *spray dryer* (modelo MSD 1.0, Labmaq do Brasil Ltda, Ribeirão Preto, Brasil), sendo mantidas sob temperatura ambiente e agitação magnética, evitando a separação da fase líquida e sólida. As condições de secagem foram operadas com fluxo do ar de secagem de 2,5 m/s (WEG- CFW8), fluxo de alimentação de 10 mL min⁻¹, vazão do compressor de 40 L/min, pressão de atomização

de 50 psig, temperatura do ar de entrada e saída de 120 °C e 100 ± 5 °C, respectivamente, utilizando bico do atomizador de 1,2 mm.

Ao término da secagem, os pós foram coletados do ciclone e armazenados em embalagens de vidro, fechadas, cobertas com folhas de alumínio, mantidas sob refrigeração até a separação das amostras para estabilidade (Figura 15).

Figura 15 - Pós contendo micropartículas de própolis vermelha encapsuladas com leveduras (Ultraturrax; 15 e 25% de levedura- duplicata) (a); Pós contendo micropartículas de leveduras livres encapsuladas com álcool etílico (58° GL) (Banho agitado; 15 e 25% de levedura- duplicata) (b)

Própria autoria, 2020

3.6 Extração dos compostos bioativos totais das micropartículas

Para a determinação da atividade antioxidante (ABTS e FRAP), fenólicos e flavonoides totais, foi realizado a extração dos compostos totais das micropartículas de própolis. Aproximadamente 50 mg das micropartículas foram misturados com 1 mL de etanol (80 °GL) e agitado em um misturador de tubo de vórtice (MX-S, Biobase, Shandong, China) por cerca de 2 minutos. Essa mistura passou cinco minutos no ultrassom (Unique Model USC, 25 kHz, 150 W) para aumentar a permeabilidade. Em seguida, as amostras foram centrifugadas (Eppendorf, 5810R) a 6000 g por 10 minutos, a uma temperatura de 25 °C. Esse procedimento foi feito cinco vezes para obtenção dos sobrenadantes em cada lavagem, sendo possível observar que o precipitado perdeu a sua coloração, removendo ao máximo dos compostos aprisionados para quantificá-los.

Figura 16 - Sobrenadante obtido do processo de ruptura das respectivas amostras: (C1 (CB); C2 (CU); 1 e 5 (TB15); 2 e 6 (TB25); 3 e 7 (TU15); 4 e 8 (TU25))

Própria autoria, 2020

3.7 Caracterização das micropartículas de própolis vermelha

3.7.1 Teor de umidade

A determinação do teor de umidade dos pós foi realizada por meio de um analisador de umidade (MB35 - Ohaus, Switzerland), utilizando radiação infravermelha de uma fonte de halogênio. A análise foi realizada em triplicata e os resultados foram expressos em porcentagem.

3.7.2 Atividade de água

A atividade de água (aw) dos pós foi analisada utilizando o equipamento Aqualab Pre Water Activity Analyzer (Decagon Devices, Pullman, USA), em uma temperatura de 25 °C. A análise foi realizada em triplicata.

3.7.3 Higroscopicidade

Para a determinação da higroscopicidade foi utilizado o método proposto por Cai; Corke (2000) com adaptações. As amostras foram acondicionadas em placa de Petri a 25 °C contendo alíquotas de 0,2 g das amostras e colocadas em dessecador contendo solução saturada de NaCl (UR de 75,3%). Após uma semana, as amostras foram pesadas e a higroscopicidade foi expressa usando a seguinte fórmula: massa (g) de água absorvida / 100 g de matéria seca.

3.7.4 Dispersibilidade

A dispersibilidade foi analisada pelo método gravimétrico, segundo Eastman e Moore (1984) e modificado por COMUNIAN et al. (2011). Foi adicionado 0,20g da amostra em um erlenmeyer contendo 20 mL de água ultrapura, seguidamente, foi realizada a homogeneização com auxílio de uma mesa agitadora orbital tipo shaker (modelo TE-420, TECNAL, Piracicaba, Brasil) à 100 rpm por 30 minutos, em temperatura ambiente. A solução foi centrifugada a 3000 rpm, em temperatura ambiente de 25°C, por 5 minutos. Após, será retirada uma alíquota de 25 mL do sobrenadante que será colocada em estufa a 105 °C, até atingir peso constante. A dispersibilidade será calculada pela diferença de peso e o resultado será expresso em porcentagem.

3.7.5 Morfologia

3.7.5.1 Análise Microscópica

A morfologia das micropartículas de própolis vermelha foi observada por microscopia ótica (LEICA DM500), com câmera digital (LEICA ICC50 W) (LEICA MICROSYSTEMS).

3.7.5.2 Morfologia por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Após a obtenção das partículas, as mesmas foram avaliadas por meio da microscopia eletrônica de varredura (MEV) (Tabletop Microscope, Hitachi TM300) a uma tensão de aceleração de 15 Kv.

3.7.6 Medida de tamanho de partícula

A análise foi determinada utilizando quantidade mínima das micropartículas para serem suspensas em água ultra pura, até ser completamente dispersa. Posteriormente, a mistura foi colocada em uma cubeta, o tamanho de partícula foi mensurado por um analisador de partículas por difração a laser em equipamento Laser scattering (modelo SALD/201V, Shimadzu, Kyoto, Japão), para obter seu diâmetro médio e a distribuição das partículas, com monitoração durante a medição para cada leitura até obter-se uma constante, em faixa de medição entre 0,5 a 500 micrômetros. O resultado foi expresso como $D[4,3]$ para o tamanho de partícula e o diâmetro médio sobre a distribuição de volume.

3.8 Estabilidade da própolis microencapsulada sob armazenamento

As amostras secas em *spray drying* foram distribuídas em frascos pequenos de vidro, com proteção de luz e colocados em recipientes de vidro com tampa de borracha hermeticamente fechados, contendo solução saturada de $MgCl_2$ (UR de 32,3%) (Figura 17) e armazenados à temperatura de 25 °C.

A estabilidade dos materiais encapsulados em comparação aos puros foi avaliada nos tempos de 0, 7, 15, 30 e 60 dias de estocagem, empregando as análises de fenólicos e flavonoides totais, ABTS e FRAP, realizadas em triplicata. Apenas a análise de colorimetria foi realizada no

tempo 0 e 60 dias, também em triplicata. Para cada período de análise, foi utilizado um frasco das respectivas amostras, com a finalidade de preservar as demais.

Figura 17 - Controle de estabilidade das micropartículas de própolis e o controle em condições controladas, durante 0, 7 (a), 15 (b), 30 (c) e 60 (d) dias de armazenamento

Própria autoria, 2020

3.8.1 Colorimetria

As micropartículas foram colocadas em uma célula de vidro contra uma fonte de luz e os parâmetros de cor instrumental foram mensurados em colorímetro (Mini Scan XE, HunterLab, Reston, EUA). Antes da leitura, o instrumento foi calibrado com duas placas de calibração, uma na cor preta e outra na cor branca e os resultados expressos de acordo com o sistema de cor CIELAB (L^* , a^* e b^*).

3.9 Análise estatística dos resultados

Os resultados foram analisados estatisticamente utilizando o teste de média Tukey, com intervalo de confiança de 95% ($p < 0,05$), para a determinação de diferenças significativas entre as amostras. Os procedimentos estatísticos foram realizados utilizando o pacote estatístico STATISTICA 7.1 software (StatSoft, Tulsa, OK, USA).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Caracterização do extrato de própolis vermelha

Em relação à umidade, o extrato apresentou um teor de 81,9% em base úmida e 18,13% em base seca.

4.1.1 Identificação de formononetina por Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

A análise por CLAE do EEPV foi usada para a identificação e quantificar a formononetina, composto químico considerado como um dos marcadores da própolis vermelha, a concentração encontrada no extrato de própolis vermelha foi de $10,3 \pm 0,4$ mg/g. Essa substância vem sendo estudada por apresentar propriedades biológicas importantes, que pode atuar no controle de células tumorais e não tumorais, das lesões neurológicas, associada à inibição da inflamação celular e do estresse oxidativo, apresentando efeitos neuroprotetores e atuando na proteção de lesões pulmonares (SILVA FROZZA et al., 2013; FROZZA et al., 2017; LI et al., 2014; LIANG et al., 2014; MA et al., 2013).

A Figura 18A representa o pico do padrão de formononetina e a Figura B demonstra que o extrato em estudo apresentou um pico da substância em questão, a qual eluiu com tempo de retenção de aproximadamente 19,6 minutos (Figura 18C). A formononetina também foi identificada na pesquisa de Fernández et al. (2008), Lima Cavendish et al. (2015), Piccinelli et al. (2011), Cruz Almeida et al., (2017), mas em contraste com Alencar et al. (2007), que não conseguiram identificar a mesma. Ou seja, o perfil químico da própolis se mostra variado, de acordo com a área geográfica em que é coletada, havendo assim, uma correlação com a vegetação nativa. Ainda vale salientar, que o mesmo tipo de própolis, sendo esta obtida de regiões distintas, pode não apresentar composição química padronizada (PARK et al., 2000; PARK et al., 2002; CHRISTOV et al., 2006; ALENCAR et al., 2007).

Figura 18 - Cromatogramas obtidos por cromatografia líquida, onde A = padrão da formononetina em 19,6 min. (4 ug/mL); B = amostra contendo extrato etanólico da própolis vermelha e diluída 500 vezes em 19,6 min.

4.1.2 Compostos bioativos

A Tabela 2 apresenta o teor de fenólicos e flavonoides totais do extrato etanólico concentrado de própolis vermelha (EECPV), em base seca.

Tabela 2 - Caracterização do extrato de própolis vermelha concentrado quanto aos teores de fenólicos e flavonoides totais

Solução hidroalcoólica concentrada	Fenólicos totais (mg EAG/g de extrato seco)	Flavonoides totais (mg EQ/g de extrato seco)
Extrato de Própolis Vermelha	228,0 ± 9,0	188,0 ± 4,0

*Média de três repetições. Diluição realizada na proporção de 1:1000 (m/m)

Utilizando-se de solução hidroalcóolica, foi possível obter um extrato cujo teor fenólico determinado foi de 228,0 mg EAG/g de EECPV, expresso em base seca. O resultado obtido para essa classe de bioativos está próximo ao reportado por Hatano et al. (2012), de 292,7 mg AGE/g de extrato, determinado no extrato de própolis vermelha proveniente de Alagoas, Brasil. Contudo, Machado et al. (2016), conseguiram caracterizar dois tipos de própolis vermelha de origens diferentes e utilizaram dois métodos de extração, obtendo assim, valores variáveis (300,36 mg AGE/g, 198,77 mg AGE/g, 157,43 mg AGE/g, 157,16 mg AGE/g), tanto em relação ao tipo de extração, quanto à origem da própolis. Já para De Oliveira Reis et al. (2019), todas as suas amostras obtiveram concentrações mais elevadas para fenólicos (277,81-380,48 mg AGE/g⁻¹).

Os flavonoides apresentaram valor inferior, quando comparados aos fenólicos, de 188 mg EQ/g de extrato, também em base seca, sendo importante ressaltar que os flavonoides estão compreendidos na classe dos compostos fenólicos. Hatano et al. (2012), caracterizou o mesmo tipo de própolis deste estudo e obteve valor inferior, de 140,2 mg/g. Resultados divergentes foram obtidos por Machado et al. (2016), de 57,60 mg EQ/g e 58,19 mg EQ/g, para própolis vermelha de Sergipe e Alagoas, respectivamente, cujos extratos foram obtidos pelo método de extração convencional, com etanol em baixa pressão. Já para o método de extração supercrítico-SCO₂, os valores foram de 25,46 mg EQ/g e 40,65 mg EQ/g, para as variedades obtidas de Sergipe e Alagoas, respectivamente. Também pode-se analisar os resultados de Oliveira Reis et al. (2019), em que em seu experimento trabalharam com 6 amostras de própolis vermelha, obtendo extratos por meio de extração convencional etanólica e assistida por ultrassom. Os dados apresentam uma notória variação de concentração dos compostos em questão (42,00-108,02 mg EQ/g).

O resultado determinado para flavonoides nesse trabalho foi substancialmente superior aos demais reportados na literatura. A discrepância de valores dos compostos bioativos encontrados pode ser explicada pela variedade das amostras, isso comprova a biodiversidade existente no reino vegetal, já que a composição da própolis está relacionada com o tipo de resina que é coletada das plantas. Ademais, o valor obtido ressalta o potencial biológico da própolis.

4.1.3 Capacidade antioxidante

A Tabela 3 representa os valores da avaliação da capacidade antioxidante (ABTS⁺ e FRAP) realizadas no extrato etanólico da própolis vermelha.

Tabela 3 - Propriedade antioxidante do extrato etanólico de própolis vermelha

Parâmetros	Solução hidroalcóolica concentrada
	Própolis Vermelha
ABTS (mmol Trolox/100 mg própolis)	400,9±7
FRAP (mmol FeSO ₄ /100 mg própolis)	365,1±7

*Média de três repetições. Diluição realizada na proporção de 1:1000 (m/m)

Para todas as análises realizadas no presente estudo, o extrato de própolis vermelha demonstrou atividade antioxidante expressiva no método de FRAP. Seu poder antioxidante também é demonstrado nos estudos de Andrade et al. (2017), com concentrações de 291 mmol/100g (ABTS⁺) e 63,32 mmol/100g (FRAP), ambas inferiores aos resultados apresentados no presente estudo.

Os valores para a atividade antioxidante da própolis do presente trabalho, quando comparada com resultados de outros autores, mostra uma grande diferença. Além disso, como o teor de fenólicos e flavonoides também foi bastante variável, espera-se diferença na atividade antioxidante, já que ela se deve principalmente à presença desses compostos na amostra. De fato, de acordo com Ren et al. (2003) o poder antioxidante pode estar correlacionado com a concentração de flavonoides.

4.1.4 Atividade antimicrobiana

Para a atividade antimicrobiana foi estudado a redução da viabilidade celular (concentração inibitória mínima – CIM) e também foi avaliado o potencial de inativação total das células estudadas (concentração bactericida mínima - CBM), como demonstrado na Figura 19. Todos os resultados correspondentes a este tópico são apresentados na Tabela 4.

Tabela 4 - Concentração inibitória mínima- CIM e Concentração bactericida mínima- CBM (ug/mL)

Amostras	Bactérias			
	1		2	
	CIM	CBM	CIM	CBM
EECPV 1:100	103,21	412,86	6,45	25,80
EECPV 1:1000	20,68	41,36	5,17	20,68

1: *Salmonella enteritidis*; 2: *Pseudomonas*; **EECPV**: Extrato etanólico concentrado de própolis vermelha.

As diluições testadas do extrato etanólico de própolis vermelha apresentaram inibição para o crescimento de *Salmonella enteritidis* (CCT 4475) e *Pseudomonas* (ATCC 15442), mostrando maior potencial de inibição para *Pseudomonas*, mesmo baixas concentrações de sólidos da própolis no extrato de maior diluição foi capaz de inibir o seu crescimento. Para efeito confirmativo, o CBM apresentou efeito bactericida em concentrações diferentes de 412,86 e 41,36 ug/mL para *S. enteritidis* e 25,80 e 20,68 ug/mL para *Pseudomonas*. Isso demonstra a ação antimicrobiana em concentrações baixas de sólidos da própolis no meio para bactérias Gram-negativas.

Esses resultados são divergentes dos estudos de Nori et al. (2011) e Ristivojević et al. (2016) pois *S. enteritidis* (ATCC 13076) não foi afetada pela ação do extrato de própolis utilizado em seus experimentos. Em contrapartida, no trabalho de Nina et al. (2015) o extrato de própolis apresentou efeito inibitório para *S. enteritidis*. Para as *Pseudomonas*, estudos comprovam ação para CIM com valores que oscilaram de 100 a 800 µg/mL (TIVERON et al., 2016). Daraghmeh & Imtara (2020) obtiveram valores de CIM variados de 2500 e 5000 µg/mL e o MBC foi 5000 µg/mL.

A variação existente para CIM neste trabalho e nos demais autores, pode ser explicado pelo fracionamento da própolis, formulação do extrato aquoso ou hidroalcólico e a origem da própolis, que ocasiona uma menor ou maior concentração de compostos antimicrobianos. Cada tipo de própolis leva em sua composição uma característica química particular, a forma de extração também compromete essa variação e, portanto, a sua atividade antimicrobiana será distinta.

Contudo, o extrato etanólico de própolis vermelha comprovou ser eficaz contra *S. enteritidis* e *Pseudomonas*, isso possibilita sua utilização como bio-conservante natural para produtos alimentícios. Estudos futuros ainda precisam ser realizados para analisar as características sensoriais e microbiológicas da aplicabilidade desse extrato em produtos, tais como cárneos, de panificação, de confeitaria e derivados de leite. Apesar que Pobiega et al. (2020) confirmam ser um extrato mais testado em várias aplicações de caráter industrial. Lopez et al. (2015) e Santos et al. (2020) certificam que sua aplicação pode servir para fins de segurança alimentar, atuando como agente conservante.

Figura 19 - CIM e CBM- Resultado da amostra diluída de extrato concentrado bruto de própolis na proporção 1:100 e 1:1000 contra *Salmonella enteritidis* (A) e *Pseudomonas* (B)

Própria autoria, 2020

4.2 Bioissorção dos compostos bioativos

A Tabela 5 apresenta os parâmetros cinéticos obtidos pelo ajuste dos dados de bioissorção ao modelo de pseudo-segunda ordem para o extrato de própolis vermelha incorporada em leveduras *Saccharomyces cerevisiae*.

Tabela 5 – Parâmetros cinéticos do modelo de pseudo-segunda ordem de bioissorção do extrato de própolis vermelha do Brasil em leveduras *Saccharomyces cerevisiae*.

Parâmetros cinéticos	Extrato de própolis vermelha			
	Fenólicos Totais		Flavonoides Totais	
	T– 15%	T – 25%	T– 15%	T – 25%
q_e exp. (mg/g)	22,96	15,19	36,53	25,42
q_e (mg/g)	23,04	15,27	37,04	28,41
K_2 (g/mg.min) $\times 10^4$	3,59	0,21	1,06	0,06
Coefficiente de determinação (R^2)	0,998	0,999	0,999	0,998
Tempo de equilíbrio (min.)	240	240	240	240

Onde q_e é a capacidade de sorção no tempo t e no equilíbrio, experimental e obtida pelo modelo, e K_2 é a constante de taxa do modelo de pseudo-segunda ordem.

Por meio do experimento desse estudo, foi possível determinar a capacidade de adsorção do bioissorvente, onde os gráficos de pseudo-segunda ordem (t/q_e por t) forneceram uma relação

linear (Figura 20). O estudo cinético é a informação preliminar mais importante sobre a performance de um modelo de bioadsorção (VOLESKY, 2007).

Figura 20 - Gráfico de Pseudo-segunda ordem: (A) Fenólicos totais - 15%; (B) Fenólicos totais - 25%; (C) Flavonoides totais - 15%; (D) Flavonoides totais - 25%

A capacidade de adsorção calculada para o extrato de própolis (q_e), de acordo com a cinética de pseudo-segunda ordem ficou próximo do valor experimental ($q_e \text{ exp.}$), indicando que o modelo foi capaz de descrever o comportamento cinético. O teor de fenólicos e flavonoides totais bioadsorvidos durante o teste de cinética pela biomassa de levedura aumentou no decorrer do tempo, foi quando atingiu o seu ponto de equilíbrio em 240 minutos, ou seja, quando não houve mais alteração na concentração de compostos bioadsorvidos. O tratamento 15% foi o que representou maior adsorção dos compostos bioativos, isso porque havia uma quantidade inferior de leveduras em relação ao total de extrato, em comparação com o tratamento com 25%. Entretanto, a uma certa quantidade de leveduras, pode ocorrer uma saturação dos seus sítios ativos e as mesmas podem não conseguir adsorver uma quantidade maior de compostos.

O equilíbrio dinâmico e a capacidade de sorção de compostos químicos podem variar de acordo com a composição do extrato, o pH do meio, a agitação, temperatura, tipo de bioadsorvente e

se foi realizado algum tipo de modificação do material. Ribeiro et al. (2019), por exemplo, ao adsorverem compostos fenólicos de chá verde em leveduras *S. cerevisiae*, obtiveram tempo de equilíbrio de 60 minutos ao modificar o pH do meio para 6,77 e de 120 minutos em meio com pHs 3 e 10. As capacidades de sorção obtidas foram de 3,06, 4,37 e 6,36 mg g⁻¹, respectivamente. Rubio et al. (2018) obtiveram capacidades de sorção entre 62,1 e 98,49 mg g⁻¹ ao realizarem a bio sorção de compostos fenólicos de bagaço de uva das variedades Bordeaux e Cabernet Sauvignon, respectivamente, e alcançaram o equilíbrio em 360 minutos. Já Oliveira et al. (2019), alcançaram tempo de equilíbrio igual ao do presente estudo ao adsorverem compostos fenólicos de bagaço de uva das variedades Merlot e Tannat em leveduras *Saccharomyces cerevisiae*, porém, diferentes capacidades de sorção, variando entre 40,20 e 82,80 mg g⁻¹. Pensando no setor industrial, quanto menor o tempo de cinética obtido, menor custo terá sua aplicação.

Portanto, com base no experimento de bio sorção, foi possível determinar o tempo prévio de bio sorção, de 240 minutos, para todas amostras analisadas, que posteriormente foram secas em *spray dryer*.

4.3 Caracterização das micropartículas de própolis vermelha

4.3.1 Umidade e atividade de água

A própolis vermelha microencapsulada em leveduras por *spray dryer* resultou em um pó fino e com coloração avermelhada, como é mostrada na Figura 21.

Figura 21 - Pós contendo partículas atomizadas do extrato de própolis vermelha microencapsuladas incorporadas em leveduras: bio sorvidas (TU15, TU25, TB15, TB25) e controles (CU, CB)

Própria autoria, 2020

Os resultados para umidade e atividade de água dos pós obtidos são mostrados na Tabela 6. As mesmas condições de secagem foram realizadas para todos os tratamentos.

Tabela 6 - Caracterização físico-química das micropartículas de extrato de própolis vermelha e do controle (leveduras livres).

Micropartículas	Parâmetros	
	Umidade (%)	Aw
CB	4,84 ^{ab} ±0,13	0,16 ^b ±0,005
CU	5,64 ^a ±0,11	0,18 ^b ±0,004
TB15	4,71 ^b ±0,44	0,27 ^a ±0,070
TU15	4,60 ^b ±0,32	0,28 ^a ±0,032
TB25	4,47 ^b ±0,35	0,25 ^a ±0,005
TU25	4,22 ^b ±0,37	0,25 ^a ±0,023

Os resultados acima são a média ± desvio padrão (n = 6).

Letras iguais na mesma coluna indicam que não houve diferença significativa entre amostras (p>0,05).

CB (álcool com levedura, tratada em banho agitado); CU (álcool com levedura, tratada no ultraturrax); TB15 (extrato com 15% de levedura, tratada em banho agitado); TU15 (extrato com 15% de levedura, tratada no ultraturrax); TB25 (extrato com 25% de levedura, tratada em banho agitado); TU25 (extrato com 15% de levedura, tratada no ultraturrax).

Todos os pós apresentaram um teor de umidade com variação entre 4,22 - 5,64%. O tratamento CU diferiu significativamente dos TB15, TU15, TB25, TU25, mas não houve diferença para o CB. Por outro lado, a atividade de água dos pós não apresentou diferença significativa e seus valores se assemelham. Houve diferença significativa entre o controle e os pós com própolis. Os valores obtidos neste trabalho se assemelham aos encontrados por Rubio et al. (2020), que expressam valores de umidade entre 5,60% para leveduras controle e 6,40-7,10% ao encapsularem compostos fenólicos de bagaços de uva em *S. cerevisiae*. Em relação ao valor de atividade de água, obtiveram valores entre 0,166 e 0,289 para levedura controle e micropartículas, respectivamente.

Para Silva et al. (2013), quanto menor o valor de umidade encontrado nas partículas, maior a garantia de estabilidade do material em questão, com o objetivo de reduzir a aglomeração das partículas na parede do recipiente, ou até mesmo seu endurecimento e, conseqüentemente, não comprometer as propriedades das partículas atomizadas. Teores reduzidos da atividade de água nas partículas são discutidas por Souza et al. (2014), o que as tornam estáveis, já que valores elevados de atividade de água de umidade e atividade de água acarretam a degradação de alimentos por várias reações. Ainda, baixos valores de atividade de água e umidade nos pós tem relação direta com a atividade microbiológica, favorecendo o prolongamento da estabilidade dos pós, para controlar o crescimento e proliferação de microrganismos.

4.3.2 Higroscopicidade e dispersibilidade

A Tabela 7 expressa os valores de higroscopicidade dos tratamentos realizados nesta pesquisa, onde as amostras controle (CB e CU) diferem entre si e dos demais tratamentos. No entanto, os pós contendo própolis não diferiram entre si, exceto para as amostras TB15 e TU25. Estas, por sua vez, apresentam tratamentos e teores de leveduras diferentes. A higroscopicidade baixa pode ser considerada uma característica favorável para o armazenamento das partículas produzidas, pois estas não serão pegajosas, este fato pode favorecer a estabilidade física e sua aplicação como um aditivo, por facilitar sua manipulação.

Rubio et al. (2020) também utilizaram leveduras para incorporar os compostos de seu extrato do bagaço de uva, conseguindo obter 13,70 e 13,71 g de água/100 g para higroscopicidade para seus pós.

Ao analisar a dispersibilidade de todos os tratamentos, observa-se que os controles e as amostras obtiveram valores próximos de dispersibilidade, não existindo diferença significativa ($p>0,05$), logo, é possível que não haja própolis na superfície das leveduras, ou, em havendo, essa não interferiu na capacidade de dispersar os pós obtidos. Essa baixa dispersibilidade era esperada, pois a levedura permanece em suspensão, uma vez que não é rompida. Isso também pode ser justificado pelo fato que alguns compostos presentes na própolis vermelha são pouco ou insolúveis em água, dificultando assim a absorção de água.

Tabela 7 - Caracterização dos pós contendo as micropartículas de extrato de própolis vermelha e do controle (leveduras puras) obtidas pela secagem em spray-dryer: Eficiência de encapsulação (EE), Rendimento, Dispersibilidade e Higroscopicidade.

Micropartículas	Parâmetros	
	Dispersibilidade (%)	Higroscopicidade (g de água/100g de pó)
CB	9,2 ^a ±0,3	8,55 ^a ±0,03
CU	9,3 ^a ±0,1	7,52 ^b ±0,01
TB15	8,2 ^a ±1,3	3,84 ^d ±0,14
TU15	8,5 ^a ±0,4	4,39 ^{cd} ±0,15
TB25	9,1 ^a ±0,6	4,02 ^{cd} ±0,31
TU25	9,5 ^a ±1,0	4,69 ^c ±0,29

Os resultados acima são a média ± desvio padrão (n = 6).

Letras iguais na mesma coluna indicam que não houve diferença significativa entre amostra ($p>0,05$).

CB (álcool com levedura, tratada em banho agitado); CU (álcool com levedura, tratada no ultraturrax); TB15 (extrato com 15% de levedura, tratada em banho agitado); TU15 (extrato com 15% de levedura, tratada no ultraturrax); TB25 (extrato com 25% de levedura, tratada em banho agitado); TU25 (extrato com 15% de levedura, tratada no ultraturrax).

4.3.3 Microscopia óptica

A Figura 22 (C1 e C2) mostra que os dois controles apresentaram características típica da levedura, com aspecto oval, superfície lisa e variação de tamanho. Nas micropartículas contendo própolis (Figuras 10- A1, A2, A3, A4), independente do tratamento, percebe-se a formação de dupla camada, estando a própolis possivelmente mais aderida na superfície externa da levedura, produzindo grande aglomeração das mesmas.

Esses resultados são controversos com os de Mendanha et al. (2009) e Nori et al. (2011), onde a presença da própolis encontra-se aparentemente dentro do material encapsulante, todavia, esses autores utilizaram a técnica de encapsulação por coacervação complexa, que difere totalmente da bioadsorção. Essa diferença de interação entre a própolis dependerá das características do agente encapsulante utilizado para a encapsulação, ao observar seu comportamento frente a incorporação dos compostos.

Figura 22 - Imagens microscópicas das micropartículas em leveduras de própolis vermelha atomizada: (a) Fotomicrografias óptica das micropartículas em levedura de solução alcóolica de 58° GL. (C1) CB; (C2) CU; (b) Fotomicrografias óptica do extrato puro de própolis vermelha incorporado em leveduras e atomizada. (A1) TB15; (A2) TB25; (A3) TU15; (A4) TU25

CB (álcool com levedura, tratada em banho agitado); CU (álcool com levedura, tratada no ultraturrax); TB15 (extrato com 15% de levedura, tratada em banho agitado); TU15 (extrato com 15% de levedura, tratada no ultraturrax); TB25 (extrato com 25% de levedura, tratada em banho agitado); TU25 (extrato com 15% de levedura, tratada no ultraturrax).

4.3.4 Morfologia das partículas por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A fotomicrografia permitiu avaliar a morfologia externa de todas as partículas. A Figura 23-A1, A2, A3 e A4 mostra que todas as partículas apresentaram os mesmos aspectos em relação ao tamanho irregular e em formato de conchas, ou seja, pequenas concavidades. Alguns autores afirmam que esse tipo de aparência pode ser influenciada pela evaporação rápida de gotículas líquidas durante o processo de secagem em spray (Rosenberg et al., 2006). Mas ainda, como as leveduras se destacam por ter células rígidas e possuírem formato esférico, tendo um papel importante no encapsulamento eficiente, por envolver características como massa, meio de cultura e a forma de preparo para a promoção do transporte dos ingredientes que tenham boa qualidade alimentar (NAKHAEE MOGHADAM; KHAMENEH; FAZLY BAZZAZ, 2019).

Em nenhuma amostra foi observada fragmentação das partículas, as superfícies aparecem lisas e uniformes. Para Tonon et al. (2009), as partículas com esses aspectos promovem uma melhor cobertura para envolver os compostos, dificultando reações de degradação, como a oxidação. Rubio et al. (2018) e Oliveira et al. (2019) apresentam leveduras mais ovaladas e enrugadas, resultados divergentes quando comparados à análise de MEV das micropartículas de própolis do presente trabalho, o que era esperado uma vez que os mesmos utilizaram materiais diferentes para encapsulação, leveduras modificadas por métodos físicos e químicos e as amostras não foram secas por atomização.

Ainda, foi possível observar que as micropartículas aparecem aglomeradas, provavelmente em decorrência da natureza resinosa da própolis, não sendo muito evidente nas partículas de leveduras puras, que apresentam menos aglomeração (Figura 8-C1 e C2). Ao comparar as micropartículas contendo apenas as leveduras controle com as que tem extrato de própolis incorporado e secas por *spray dryer*, é visto que estas são mais côncavas e encolhidas, enquanto os controles apresentam formato ovalado.

Ainda, para Andrade et al. (2018), a aglomeração é também uma característica típica da secagem por atomização das partículas obtidas.

Figura 23 - Fotomicrografia de micropartículas atomizadas contendo leveduras com própolis vermelha, mostrando a topologia externa com ampliação original de 1500 ×: (a) Fotomicrografias de micropartículas atomizadas contendo leveduras com solução alcóolica de 58° GL. (C1) CB; (C2) CU; (b) Fotomicrografias do extrato puro de própolis vermelha atomizada com levedura. (A1) TB15; (A2) TB25; (A3) TU15; (A4) TU25

CB (álcool com levedura, tratada em banho agitado); CU (álcool com levedura, tratada no ultraturrax); TB15 (extrato com 15% de levedura, tratada em banho agitado); TU15 (extrato com 15% de levedura, tratada no ultraturrax); TB25 (extrato com 25% de levedura, tratada em banho agitado); TU25 (extrato com 15% de levedura, tratada no ultraturrax).

4.3.5 Tamanho médio de partículas

Ao analisar todos os tratamentos do extrato de própolis vermelha, incorporado com leveduras, ambas apresentaram diâmetro semelhante, não havendo diferença significativa entre os tratamentos. O diâmetro das micropartículas carregadas com própolis apresentou uma faixa de 6,94 - 7,55 μm (Tabela 8), estando de acordo com o tamanho apresentado nas imagens microscópicas.

Tabela 8 – Tamanho médio de micropartículas de própolis vermelha microencapsulada em leveduras.

Propriedades	Micropartículas			
	TB15	TU15	TB25	TU25
Tamanho de Partículas (μm)	6,94 ^a ±1	7,29 ^a ±1	7,55 ^a ±1	7,20 ^a ±1

CB (álcool com levedura, tratada em banho agitado); CU (álcool com levedura, tratada no ultraturrax); TB15 (extrato com 15% de levedura, tratada em banho agitado); TU15 (extrato com 15% de levedura, tratada no ultraturrax); TB25 (extrato com 25% de levedura, tratada em banho agitado); TU25 (extrato com 15% de levedura, tratada no ultraturrax).

Pesquisas de outros autores que também trabalharam com leveduras, para encapsulação de seus extratos e analisaram a distribuição das partículas por difração a laser, obtiveram valores de diâmetro médio ligeiramente superiores, com variação de 9,42 - 11,45 μm (RUBIO et al., 2020) e com oscilação de 4,8 - 9,1 μm (SULTANA et al., 2017). Desta forma, os valores obtidos para as micropartículas de própolis vermelha da presente análise possivelmente possam servir para serem utilizados como um novo ingrediente em alimentos processados, mas estudos detalhados precisam ser realizados para comprovar essa aplicação.

4.4 Estabilidade do material microencapsulado durante o armazenamento

4.4.1 Capacidade antioxidante

A capacidade antioxidante das micropartículas foi determinada através de dois métodos diferentes, cujos valores foram expressos na Tabela 9.

Os resultados dos tratamentos das micropartículas para o método FRAP expressaram uma variação de 1653,6 – 2144,5 $\mu\text{mol FeSO}_4/\text{g}$ em concentração das micropartículas de própolis vermelha durante o estudo de estabilidade. Quando observado o primeiro ponto da estabilidade, ocorreu diferença significativa pelo teste de Tukey para todos os tratamentos

($p>0,05$), mas no decorrer do tempo, foi possível notar que as amostras não diferiram entre si, como é o caso das TB25 e TU25 (T- 7 dias); TB15 e TU15 (T- 15 dias); TB15 e TU15, TB25 e TU25 (T- 30 e 60 dias).

A atividade antioxidante pelo método ABTS demonstrou que não existiu diferença significativa pelo teste de tukey ($p>0,05$), mantendo de forma sequencial nos seguintes tempos: 7, 15 e 30 dias de armazenamento, para os tratamentos TB25 e TU25. Ainda, no tempo de 60 dias nenhum dos tratamentos diferiram entre si.

Tabela 9 - Propriedades antioxidante da própolis vermelha microencapsulada com leveduras.

Atividade antioxidante	Tempo	AMOSTRAS			
		TB15	TU15	TB25	TU25
FRAP ($\mu\text{mol FeSO}_4/\text{g}$ de micropartícula)	0	2085,3 ^{Ab} ±19	2144,5 ^{Aa} ±20	1776,0 ^{ABd} ±19	1898,3 ^{Ac} ±18
	7	2079,3 ^{Aa} ±12	1932,8 ^{Cb} ±46	1785,3 ^{Ac} ±43	1823,1 ^{ABc} ±46
	15	2040,8 ^{Aa} ±19	2007,9 ^{Ba} ±37	1666,6 ^{ABc} ±42	1764,8 ^{BCb} ±37
	30	1857,8 ^{Ba} ±17	1935,2 ^{BCa} ±25	1653,6 ^{Bb} ±89	1787,6 ^{Aab} ±24
	60	1855,7 ^{Ba} ±28	1874,9 ^{Ca} ±19	1658,4 ^{ABb} ±27	1693,9 ^{Cb} ±24
ABTS ($\mu\text{mol Trolox/g}$ de micropartícula)	0	2718,3 ^{Ac} ±23	2964,4 ^{Aa} ±23	2688,7 ^{Ac} ±49	2833,5 ^{Ab} ±35
	7	2519,8 ^{Bb} ±23	2620,1 ^{Ba} ±48	2347,2 ^{Bc} ±40	2328,4 ^{Bc} ±14
	15	1831,7 ^{Cb} ±21	2031,7 ^{Ca} ±49	1641,5 ^{Cc} ±49	1730,1 ^{Cbc} ±36
	30	1894,9 ^{Cb} ±61	2037,6 ^{Ca} ±59	1689,7 ^{Cc} ±23	1790,4 ^{Cbc} ±59
	60	1060,2 ^{Dc} ±30	1432,6 ^{Da} ±51	828,8 ^{Dd} ±44	1170,2 ^{Db} ±63

Letras maiúsculas iguais na mesma linha e minúsculas iguais na mesma coluna indicam que não houve diferença significativa entre as amostras ($p>0,05$).

TB15 (extrato com 15% de levedura, tratada em banho agitado); TU15 (extrato com 15% de levedura, tratada no ultraturrax); TB25 (extrato com 25% de levedura, tratada em banho agitado); TU25 (extrato com 15% de levedura, tratada no ultraturrax).

Para Andrade et al. (2018), ao estudar as micropartículas produzidas pela técnica de *spray dryer*, utilizando os agentes encapsulantes goma arábica e as com maltodextrina, chegaram a valores superiores aos representados pela presente pesquisa, de 10.623,48 e 12.994,33 $\mu\text{mol Trolox/g}$ de micropartícula, respectivamente, para a análise de ABTS. Para o método de FRAP, essas mesmas amostras se comportaram de forma diferente aos valores da Tabela 06, obtendo médias inferiores, de 326,39 e 235,61 $\mu\text{mol Trolox/g}$ de micropartícula.

De acordo com Reis et al. (2017), suas micropartículas de própolis apresentaram concentrações de 71,84 $\mu\text{mol Trolox/g}$, para ABTS, e 3,39 $\mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{g}$, para FRAP. Já para outros autores, essa concentração foi de 25,0 – 431,8 $\mu\text{mol Trolox/g}$ (ABTS), e variou de 34,14 a 129,31 $\mu\text{mol Trolox/g}$ (FRAP) (MOHTAR et al., 2020; JANSEN-ALVES et al., 2019). Observa-se que sempre existirá oscilação entre os valores de concentração dos radicais puras em todos os métodos analisados, independente da origem e do tipo de amostra, pois se deve

levar em consideração a forma na qual a mesma foi extraída, a concentração e o tipo de secagem a que foi submetida.

O estudo da estabilidade para avaliar o poder antioxidante das micropartículas em questão, que tende a decrescer ao longo do dos dias, comprovou por FRAP e ABTS que suas concentrações oscilaram ao longo do tempo, diminuindo até o último ponto. Os resultados de FRAP mostraram que em todos os dias para a TB25 não houve diferença significativa e todos os tratamentos para ABTS não apresentaram diferença significativa nos períodos de 15 e 30 dias.

Desta forma, ao comparar o estudo da literatura com os resultados obtidos dessa pesquisa, pode-se afirmar que a própolis de coloração avermelhada apresenta poder antioxidante e quando utilizado o método de encapsulação, influencia na proteção dos compostos bioativos, presentes na composição química da amostra em questão, pois se o extrato de própolis estivesse livre, provavelmente a atividade antioxidante seria menor ao final de 60 dias. Desta forma, as micropartículas poderiam ser utilizadas para retardar a oxidação lipídica em alimentos, por exemplo.

4.4.2 Retenção de fenólicos e flavonoides durante a estocagem das micropartículas

Os teores dos compostos fenólicos totais obtidos durante a estocagem das micropartículas de própolis vermelha são apresentados na Tabela 10.

Tabela 10 - Conteúdo de flavonoides totais em própolis vermelha durante a estocagem das micropartículas por 60 dias.

Micropartículas	Fenólicos totais (mg AGE/g de micropartícula)				
	0 dias	7 dias	15 dias	30 dias	60 dias
TB15	131,2 ^{Ab} ±6,7	132,3 ^{Ab} ±6,7	101,6 ^{Bb} ±6,5	100,0 ^{Bb} ±9,1	100,5 ^{Bb} ±1,5
TU15	145,1 ^{Aa} ±5,2	144,7 ^{Aa} ±5,4	117,5 ^{Ba} ±6,9	112,6 ^{Ba} ±7,2	112,1 ^{Ba} ±1,0
TB25	117,1 ^{Ac} ±10,2	117,5 ^{Ac} ±2,8	93,4 ^{Bb} ±9,5	89,5 ^{Bb} ±1,1	89,8 ^{Bc} ±8,1
TU25	120,9 ^{Abc} ±6,5	120,9 ^{Ac} ±6,7	105,5 ^{Bab} ±8,8	91,7 ^{Cb} ±3,0	92,1 ^{Cbc} ±3,4

Letras maiúsculas iguais na mesma linha e minúsculas iguais na mesma coluna indicam que não houve diferença significativa entre as amostras ($p>0,05$).

TB15 (extrato com 15% de levedura, tratada em banho agitado); TU15 (extrato com 15% de levedura, tratada no ultraturrax); TB25 (extrato com 25% de levedura, tratada em banho agitado); TU25 (extrato com 15% de levedura, tratada no ultraturrax).

Com o estudo da estabilidade das micropartículas para o método de fenólicos, TU25 não difere de forma significativa pelo teste de tukey ($p>0,05$) dos tratamentos TB15 e TB25 no

tempo zero. Ao longo dos dias, ainda permanece sem diferença significativa para os TB25-TU25 (T- 7 dias), TB15-TB25-TU25 (T- 15 dias), TB15-TB25-TU25 (T- 30 dias) e TB25-TU25 (T- 60 dias).

Conforme esperado, as amostras com menor concentração de biomassa de levedura (15%), apresentaram mais teores de fenólicos e flavonoides, tanto para o tratamento onde se promoveu também a bio sorção – que ficou em banho maria, sob agitação, como para o que passou apenas no ultraturrax, pois o teor de leveduras era menor na mistura, portanto havia mais extrato e logo mais fenólico e flavonoides que nas amostras com 25% de levedura, sendo que os teores superiores foram mantidos também no decorrer de sua estabilidade e para todas as amostras.

Ao comparar o TB15 com o TU15, a amostra que passou no ultraturrax foi a que obteve valor maior em sua média de conteúdo de fenólicos e de flavonoides. Este resultado pode ser atribuído a dois fatores: é possível que a exposição do extrato no banho maria promoveu a degradação de parte desses compostos, porém, o mais provável é que tenha havido bio sorção de parte desses compostos, que ficaram retidos no interior das células das leveduras de forma que não puderam ser extraídos ou liberados para sua quantificação.

Também quando verificamos a estabilidade dos tratamentos comparando com cada tempo estudado, todos não diferiram entre si significativamente entre o período de 0 a 7 dias e para 15, 30 e 60 dias, exceto para o tratamento TU25, onde o teor de flavonoides não diferiu significativamente ao longo do período de estocagem estudado.

A pesquisa realizada por Andrade et al. (2018), demonstrou valores inferiores de 39,51 e 45,94 mg GAE/g de micropartículas, quando encapsularam o extrato de própolis vermelha com goma arábica e maltodextrina, respectivamente, utilizando o método de atomização.

Para a utilização de pó de própolis vermelha em produtos alimentícios é necessário verificar sua estabilidade e funcionalidade durante o período de armazenamento. Desta forma, foram expressas as concentrações de flavonoides durante a vida de prateleira das amostras, respeitando os respectivos tempos de 0, 7, 15, 30 e 60 dias (Tabela 11).

Tabela 11 - Conteúdo de flavonoides totais em micropartículas contendo própolis vermelha estocadas por 60 dias.

Micropartículas	Flavonoides totais (mg quercetina/g de micropartícula)				
	0 dias	7 dias	15 dias	30 dias	60 dias
TB15	66,3 ^{Ab} ±7,7	65,8 ^{ABb} ±3,3	64,1 ^{ABb} ±4,7	59,1 ^{ABb} ±5,8	56,8 ^{Bb} ±2,9
TU15	77,6 ^{Aa} ±4,6	70,7 ^{ABa} ±1,5	70,7 ^{ABa} ±2,5	66,1 ^{Ba} ±3,8	64,8 ^{Ba} ±3,6
TB25	53,8 ^{Ac} ±4,5	53,4 ^{Ad} ±2,5	53,6 ^{Ad} ±0,8	49,2 ^{Ad} ±3,2	48,6 ^{Ac} ±2,6
TU25	59,6 ^{Abc} ±2,4	59,6 ^{Ac} ±1,7	60,7 ^{Abc} ±0,8	54,7 ^{Bbc} ±3,0	53,8 ^{Bb} ±1,5

Letras maiúsculas iguais na mesma linha e minúsculas iguais na mesma coluna indicam que não houve diferença significativa entre as amostras ($p>0,05$)

TB15 (extrato com 15% de levedura, tratada em banho agitado); TU15 (extrato com 15% de levedura, tratada no ultraturrax); TB25 (extrato com 25% de levedura, tratada em banho agitado); TU25 (extrato com 15% de levedura, tratada no ultraturrax).

Foi possível observar que não houve diferença significativa pelo teste de Tukey entre as amostras nos respectivos tempos 0 (TB15, TB25, TU25), 15 (TB15, TU25), 30 (TB15, TU25) e 60 (TB15, TU25) dias, para o teor de flavonóides totais. No tempo zero do TU15 foi possível obter maior valor de flavonoides totais (77,6 mg quercetina/g de micropartículas). Esses resultados mostram ser superiores quando comparados aos de Andrade et al. (2018) com variação de 1,34 – 2,88 (mg quercetina/g de micropartícula), pela técnica de atomização.

De uma forma geral, foi possível notar uma diminuição no conteúdo de flavonoides totais ao longo do tempo. Houve diferença significativa no conteúdo de flavonoides entre os dias 0 e 60, com exceção da amostra TB25.

O TU15 obteve resultados superiores em todos os pontos de estabilidade. Isto ainda pode ser explicado pela quantidade de leveduras suspensas no extrato, ou seja, ao apresentar maior teor de extrato e menor de leveduras, maior a concentração dos compostos bioativos nas amostras. Por isso, todos os tratamentos com 25% de leveduras apresentaram menor concentração de flavonoides e fenólicos.

A atomização logo após o tratamento com ultraturrax se mostrou melhor no que diz respeito à retenção de fenólicos e flavonoides nas micropartículas, comparando com o tratamento de biossorção. Isso pode ser justificado pela exposição do extrato ao tempo prolongado, mesmo que em temperatura controlada e em proteção da luz ou porque não foi possível quantificar parte dos compostos que ficaram retidos no interior das células.

Vale ressaltar que o processo da microencapsulação por atomização dos fenólicos e flavonóides favoreceu a proteção destes compostos, que são responsáveis por parte das propriedades funcionais da própolis. Ou seja, as leveduras podem ser consideradas como um ingrediente inovador para a técnica de microencapsulação, por apresentar um papel

fundamental no aprisionamento do material ativo presente na própolis e por favorecer a estabilidade durante o armazenamento em condições variadas, facilitando o controle da degradação dos compostos.

De maneira similar, Rubio et al. (2020) demonstraram que a atomização de bagaço de uva utilizando levedura como veículo resultou em boa estabilidade para os compostos fenólicos.

4.4.5 Colorimetria

Ao observar a Figura 24, visualmente o pó obtido da mistura de levedura em álcool etílico apresenta-se mais claro quando comparado com os compostos bioativos da própolis vermelha, que apresentam coloração avermelhada. Esses por sua vez, são mais atrativos para serem utilizados no seguimento industrial, como um pigmento natural.

Figura 24 - Levedura controle *Saccharomyces cerevisiae* atomizada: (C1) CB; (C2) CU. Pós (A1) TB15; (A2) TB25; (A3) TU15; (A4) TU25 obtidos após encapsulamento de extratos de própolis em levedura

CB (álcool com levedura, tratada em banho agitado); CU (álcool com levedura, tratada no ultraturrax); TB15 (extrato com 15% de levedura, tratada em banho agitado); TU15 (extrato com 15% de levedura, tratada no ultraturrax); TB25 (extrato com 25% de levedura, tratada em banho agitado); TU25 (extrato com 15% de levedura, tratada no ultraturrax).

A Tabela 12, expressa os valores para L^* , a^* e c^* que representam os parâmetros de cor das amostras atomizadas, corroborando com o aspecto visual da figura 24.

Tabela 12 - Colorimetria em própolis vermelha

Amostras	Colorimetria					
	L*(t=0)	a*(t=0)	b*(t=0)	L*(t=60)	a*(t=60)	b*(t=60)
CB	69,5 ^{Ba} ±0,1	1,5 ^{Ad} ±0,1	16,4 ^{Ae} ±0,1	73,3A ^a ±0,48	1,6 ^{Ad} ±0,13	16,3 ^{Ae} ±0,45
CU	72,6 ^{Aa} ±9	1,3 ^{Bd} ±0,1	15,6 ^{Be} ±0,05	73,7 ^{Aa} ±0,21	1,5 ^{Ad} ±0,05	15,8A ^e ±0,1
TB15	35,1 ^{Ad} ±1	24,2 ^{Bb} ±0,5	34,4 ^{Ad} ±1	34,0 ^{Be} ±1,1	26,0 ^{Ab} ±0,45	33,8 ^{Ad} ±1,2
TU15	38,1 ^{Ac} ±1	26,0 ^{Ba} ±0,3	38,0 ^{Aa} ±0,45	37,5 ^{Ad} ±1,4	27,1 ^{Aa} ±0,3	38,0 ^{Aa} ±0,5
TB25	39,5 ^{Abc} ±0,5	23,0 ^{Bc} ±0,7	35,9 ^{Ac} ±0,45	39,3 ^{Ac} ±1	24,8 ^{Ac} ±1	35,9 ^{Ac} ±1
TU25	42,0 ^{Ab} ±1	23,5 ^{Bc} ±1	37,3 ^{Ab} ±0,47	41,0 ^{Bb} ±1	25,0 ^{Ac} ±1	37,1 ^{Ab} ±1

Letras maiúsculas iguais na mesma linha e minúsculas iguais na mesma coluna indicam que não houve diferença significativa entre as amostras ($p>0,05$). t=0 é o dia de produção das partículas e t=60 é o tempo de 60 dias, final da estabilidade.

CB (álcool com levedura, tratada em banho agitado); CU (álcool com levedura, tratada no ultraturrax); TB15 (extrato com 15% de levedura, tratada em banho agitado); TU15 (extrato com 15% de levedura, tratada no ultraturrax); TB25 (extrato com 25% de levedura, tratada em banho agitado); TU25 (extrato com 15% de levedura, tratada no ultraturrax).

Ao analisar o parâmetro colorimétrico das micropartículas durante o primeiro e o último ponto da estabilidade, observa-se que as amostras controles diferem significativamente dos demais tratamentos, apresentando maior L*, menor a* e menor b*, com aspecto claro. Em contrapartida, os tratamentos TB15, TU15, TB25 e TU25 apresentaram coloração um pouco distintas, sendo TB15 e TU15 com menor L*, maior a* e TU15 com maior b*, para ambos os tempos. Esses dados sugerem que a intensidade de coloração escura, com cor avermelhada e baixa coloração amarelada se dá ao TU15.

Ou seja, sendo mais representativa para o tratamento que obteve menor teor de agente incorporado ao extrato e ser diretamente seca em *spray dryer*, isso pode ser explicado pela maior retenção dos compostos bioativos que conferem a coloração avermelhada ao extrato em questão. Ainda, esses parâmetros corroboram com os resultados de fenólicos e flavonoides dessas mesmas amostras, pois esse mesmo tratamento apresentou teores elevados dos compostos bioativos.

As amostras que passaram pelo processo de biossorção houve menor retenção de compostos, o que provavelmente culminou nas mudanças de coloração. Ao comparar as amostras em relação a cada tratamento, percebe-se que a TB15 é mais escura em relação a TB25, como a TU15 para a TU25, isso é justificado pela proporção de leveduras incorporadas nas amostras, sendo as micropartículas mais claras aquelas que continham maior teor de leveduras.

5. CONCLUSÕES

Com a utilização de etanol como solvente foi possível obter um material com altas concentrações de compostos fenólicos e flavonoides, com a substância formononetina, poder antioxidante e a atividade antimicrobiana contra as bactérias gram-negativas (*Salmonella enteritidis* e *Pseudomonas*).

A técnica de microencapsulação do extrato de própolis vermelha em levedura, por *spray drying*, comprova ser um método viável. As micropartículas mostraram morfologia com característica esperada para o tipo de técnica de encapsulação empregada. Houve diferença na concentração de compostos fenólicos e flavonoides totais ao comparar os dois tratamentos empregados, não necessitando realizar a etapa de bioadsorção, o que reduzirá o tempo de processo e diminuição de recurso financeiro. Ainda a quantidade menor de levedura possibilita pós com maior teor de bioativos.

Nesse sentido, pode-se concluir que a utilização da própolis vermelha poder servir como matéria-prima para ser explorada no segmento alimentício ou cosmético, como ingrediente que possibilite melhorar as características nutricionais do produto final.

Ainda, a escolha das leveduras para representar o veículo no processo de microencapsulação do extrato de própolis vermelha, apresentou com um potencial utilização para a encapsulação de materiais de qualidade alimentar, por torná-los preservados e estender sua vida útil. Portanto, as micropartículas elaboradas nesse trabalho, podem ainda ser consideradas como um material com propriedades funcionais, na prevenção de doenças. Assim, com obtenção desses resultados possivelmente, as micropartículas poderão ser utilizadas como ingrediente funcional para a elaboração de novos produtos, ou ainda, ser adicionado a outros já existentes no intuito de potencializar suas características.

REFERÊNCIAS

- ABRAHAM DOMÍNGUEZ-AVILA, J. et al. Gastrointestinal interactions, absorption, splanchnic metabolism and pharmacokinetics of orally ingested phenolic compounds. **Food & Function**, v. 8, n. 1, p. 15–38, 25 jan. 2017.
- AHMED, R. et al. Antioxidant properties and cardioprotective mechanism of Malaysian propolis in rats. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2017, 2017.
- ALENCAR, S. M. et al. Chemical composition and biological activity of a new type of Brazilian propolis: Red propolis. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 113, n. 2, p. 278–283, 5 set. 2007.
- ALMEIDA, W. A. D. S. et al. Photoprotective activity and increase of SPF in sunscreen formulation using lyophilized red propolis extracts from Alagoas. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 29, n. 3, p. 373–380, 1 maio 2019.
- ANDRADE, J. K. S. et al. Evaluation of bioactive compounds potential and antioxidant activity of brown, green and red propolis from Brazilian northeast region. **Food Research International**, v. 101, p. 129–138, 1 nov. 2017.
- ANDRADE, J. K. S. et al. Development and characterization of microencapsules containing spray dried powder obtained from Brazilian brown, green and red propolis. **Food Research International**, v. 109, p. 278–287, 1 jul. 2018.
- ANJUM, S. I. et al. Composition and functional properties of propolis (bee glue): A review. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 26, n. 7, p. 1695–1703, 1 nov. 2019.
- ARIEF, V. O. et al. Recent Progress on Biosorption of Heavy Metals from Liquids Using Low Cost Biosorbents: Characterization, Biosorption Parameters and Mechanism Studies. **CLEAN - Soil, Air, Water**, v. 36, n. 12, p. 937–962, 1 dez. 2008.
- ARPAGAU, C. et al. **Nano spray drying for encapsulation of pharmaceuticals** *International Journal of Pharmaceutics* Elsevier B.V., , 30 jul. 2018.
- ASSADPOUR, E.; JAFARI, S. M. **Advances in Spray-Drying Encapsulation of Food Bioactive Ingredients: From Microcapsules to Nanocapsules** *Annual Review of Food Science and Technology* Annual Reviews Inc., , 25 mar. 2019. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30649963/>>. Acesso em: 29 jan. 2021
- BALASUNDRAM, N.; SUNDRAM, K.; SAMMAN, S. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. **Food Chemistry**, v. 99, n. 1, p. 191–203, 1 jan. 2006.
- BANKOVA, V. **Recent trends and important developments in propolis research** *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine* Hindawi Limited, , mar. 2005. Disponível em: <[/pmc/articles/PMC1062152/?report=abstract](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/162152/)>. Acesso em: 16 jan. 2021

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

BANSKOTA, A. H.; TEZUKA, Y.; KADOTA, S. Recent progress in pharmacological research of propolis. **Phytotherapy Research**, v. 15, n. 7, p. 561–571, 1 nov. 2001.

BANSODE, S. S. et al. **MICROENCAPSULATION : A REVIEW**. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <www.globalresearchonline.net>. Acesso em: 2 abr. 2021.

BAYSAN, U. et al. The effect of coating material combination and encapsulation method on propolis powder properties. **Powder Technology**, v. 384, p. 332–341, 1 maio 2021.

BENZIE, I. F. F.; STRAIN, J. J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: The FRAP assay. **Analytical Biochemistry**, v. 239, n. 1, p. 70–76, 15 jul. 1996.

BERRETTA, A. A. et al. Functional Properties of Brazilian Propolis: From Chemical Composition Until the Market. In: **Superfood and Functional Food - An Overview of Their Processing and Utilization**. [s.l.] InTech, 2017.

BÖGER, B. R.; GEORGETTI, S. R.; KUROSZAWA, L. E. Microencapsulation of grape seed oil by spray drying. **Food Science and Technology**, v. 38, n. 2, p. 263–270, 1 abr. 2018.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. **Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity** LWT - Food Science and Technology Academic Press, , 1 jan. 1995.

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

BUENO-SILVA, B. et al. Anti-inflammatory and antimicrobial evaluation of neovestitol and vestitol isolated from brazilian red propolis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, n. 19, p. 4546–4550, 15 maio 2013.

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, 6 abr. 1998.

BURGUT, A. Growth inhibition of foodborne pathogens by co-microencapsulation of lactobacilli cell free and propolis extracts. **Journal of Food Safety**, v. 41, n. 1, p. e12863, 7 fev. 2021.

BUSCH, V. M. et al. Propolis encapsulation by spray drying: Characterization and stability. **LWT - Food Science and Technology**, v. 75, p. 227–235, 2017.

CAI, Y. Z.; CORKE, H. Production and Properties of Spray-dried Amaranthus Betacyanin Pigments. **Journal of Food Science**, v. 65, n. 7, p. 1248–1252, 1 out. 2000.

CASTRO-ROSAS, J. et al. **Recent advances in microencapsulation of natural sources of antimicrobial compounds used in food - A review** Food Research International Elsevier

Ltd., 1 dez. 2017.

CCANA-CCAPATINTA, G. V. et al. *Dalbergia ecastaphyllum* (L.) Taub. and *Symphonia globulifera* L.f.: The Botanical Sources of Isoflavonoids and Benzophenones in Brazilian Red Propolis. **Molecules**, v. 25, n. 9, p. 2060, 28 abr. 2020.

CHEN, Y. W. et al. Antibacterial activity of propolins from Taiwanese green propolis. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 26, n. 2, p. 761–768, 1 abr. 2018.

CHRISTOV, R. et al. Chemical composition of propolis from Canada, its antiradical activity and plant origin. **Natural Product Research**, v. 20, n. 6, p. 531–536, 20 maio 2006.

CIANCIOSI, D. et al. Phenolic compounds in honey and their associated health benefits: A review. **Molecules** MDPI AG, 11 set. 2018. Disponível em: <www.mdpi.com/journal/molecules>. Acesso em: 27 mar. 2021

COMUNIAN, T. A. et al. Assessment of production efficiency, physicochemical properties and storage stability of spray-dried chlorophyllide, a natural food colourant, using gum Arabic, maltodextrin and soy protein isolate-based carrier systems. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 46, n. 6, p. 1259–1265, 1 jun. 2011.

COOK, N. Flavonoids? Chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. **Journal of the European Ceramic Society**, v. 7, n. 2, p. 66–76, 1 fev. 1996.

CURTI, V. et al. Bioavailability and in vivo antioxidant activity of a standardized polyphenol mixture extracted from brown propolis. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 5, 1 mar. 2019.

CUSHNIE, T. P. T.; LAMB, A. J. **Antimicrobial activity of flavonoids** *International Journal of Antimicrobial Agents* Elsevier, , 1 nov. 2005.

DA CRUZ ALMEIDA, E. T. et al. Chemical and microbiological characterization of tinctures and microcapsules loaded with Brazilian red propolis extract. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, v. 7, n. 5, p. 280–287, 1 out. 2017.

DA SILVA, F. C. et al. Physicochemical properties, antioxidant activity and stability of spray-dried propolis. **Journal of ApiProduct and ApiMedical Science**, v. 3, n. 2, p. 94–100, 2011.

DA SILVA, F. C. et al. Assessment of production efficiency, physicochemical properties and storage stability of spray-dried propolis, a natural food additive, using gum Arabic and OSA starch-based carrier systems. **Food and Bioproducts Processing**, v. 91, n. 1, p. 28–36, 1 jan. 2013.

DA SILVA FROZZA, C. O. et al. Chemical characterization, antioxidant and cytotoxic activities of Brazilian red propolis. **Food and Chemical Toxicology**, v. 52, p. 137–142, 1 fev. 2013.

DARAGHMEH, J.; IMTARA, H. In Vitro Evaluation of Palestinian Propolis as a Natural Product with Antioxidant Properties and Antimicrobial Activity against Multidrug-Resistant

Clinical Isolates. **Journal of Food Quality**, v. 2020, 2020.

DARDELLE, G. et al. Flavour-encapsulation and flavour-release performances of a commercial yeast-based delivery system. **Food Hydrocolloids**, v. 21, n. 5–6, p. 953–960, 1 jul. 2007.

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

DE FRANCISCO, L. et al. Evaluation of radical scavenging activity, intestinal cell viability and antifungal activity of Brazilian propolis by-product. **Food Research International**, v. 105, p. 537–547, 1 mar. 2018.

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. 357, 14 out. 2015.

DE OLIVEIRA REIS, J. H. et al. Evaluation of the antioxidant profile and cytotoxic activity of red propolis extracts from different regions of northeastern Brazil obtained by conventional and ultrasound-assisted extraction. **PLoS ONE**, v. 14, n. 7, p. e0219063, 1 jun. 2019.

DEEGAN, K. R. et al. Susceptibility of *Malassezia pachydermatis* Clinical Isolates to Allopathic Antifungals and Brazilian Red, Green, and Brown Propolis Extracts. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 6, 13 dez. 2019.

DESAI, K. G. H.; PARK, H. J. **Recent developments in microencapsulation of food ingredients** *Drying Technology* Taylor & Francis Group, , 2005. Disponível em: <<https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1081/DRT-200063478>>. Acesso em: 27 mar. 2021

DO NASCIMENTO, T. G. et al. Modified release microcapsules loaded with red propolis extract obtained by spray-dryer technique: Phytochemical, thermal and physicochemical characterizations. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 138, n. 5, p. 3559–3569, 2019.

DUMITRIU, D. et al. Grape pomace extract improves the in vitro and in vivo antioxidant properties of wines from sun light dried Pedro Ximénez grapes. **Journal of Functional Foods**, v. 17, p. 380–387, 1 ago. 2015.

FASOLO, D. et al. Topical delivery of antifungal Brazilian red propolis benzophenones-rich extract by means of cationic lipid nanoemulsions optimized by means of Box-Behnken Design. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 56, p. 101573, 1 abr. 2020.

FAVARO-TRINDADE, C. S. et al. The use of spray drying technology to reduce bitter taste of casein hydrolysate. **Food Hydrocolloids**, v. 24, n. 4, p. 336–340, 1 jun. 2010.

FERNÁNDEZ, M. C. et al. GC-MS determination of isoflavonoids in seven red Cuban propolis samples. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 21, p. 9927–9932, 12 nov. 2008.

FOMINA, M.; GADD, G. M. Biosorption: Current perspectives on concept, definition and application. **Bioresource Technology**, v. 160, p. 3–14, 1 maio 2014.

FREIRES, I. A.; DE ALENCAR, S. M.; ROSALEN, P. L. **A pharmacological perspective on the use of Brazilian Red Propolis and its isolated compounds against human diseases***European Journal of Medicinal Chemistry*Elsevier Masson SAS, , 2016a. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26840367/>>. Acesso em: 29 jan. 2021

FREIRES, I. A.; DE ALENCAR, S. M.; ROSALEN, P. L. **A pharmacological perspective on the use of Brazilian Red Propolis and its isolated compounds against human diseases***European Journal of Medicinal Chemistry*Elsevier Masson SAS, , 3 mar. 2016b.

FROZZA, C. O. DA S. et al. Antitumor activity of Brazilian red propolis fractions against Hep-2 cancer cell line. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 91, p. 951–963, 1 jul. 2017.

GADD, G. M. Biosorption: critical review of scientific rationale, environmental importance and significance for pollution treatment. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 84, n. 1, p. 13–28, 1 jan. 2009.

GHARSALLAOUI, A. et al. **Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: An overview***Food Research International*Elsevier, , 1 nov. 2007.

GHISALBERTI, E. L. Propolis: A Review. **Bee World**, v. 60, n. 2, p. 59–84, jan. 1979.

GIBBS, B. F. et al. Encapsulation in the food industry: A review. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v. 50, n. 3, p. 213–224, 1999.

GÓMEZ-CARAVACA, A. M. et al. Advances in the analysis of phenolic compounds in products derived from bees. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 41, n. 4, p. 1220–1234, 16 jun. 2006.

GORDON, M. H. The Mechanism of Antioxidant Action in Vitro. In: **Food Antioxidants**. [s.l.] Springer Netherlands, 1990. p. 1–18.

GOUIN, S. **Microencapsulation: Industrial appraisal of existing technologies and trends**. Trends in Food Science and Technology. **Anais...**Elsevier, 1 jul. 2004

HADIANI, M. R. et al. Biosorption of low concentration levels of Lead (II) and Cadmium (II) from aqueous solution by *Saccharomyces cerevisiae*: Response surface methodology. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 15, p. 25–34, 1 jul. 2018.

HATANO, A. et al. **Antioxidant Activity and Phenolic Constituents of Red Propolis from Shandong, China***Food Sci. Technol. Res.* [s.l.: s.n.].

HAVSTEEN, B. Flavonoids, a class of natural products of high pharmacological potency. **Biochemical Pharmacology**, v. 32, n. 7, p. 1141–1148, 1 abr. 1983.

ISLA, M. I. et al. Some chemical composition and biological activity of northern Argentine propolis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 4, p. 1166–1172, 23 fev. 2005.

JANISZEWSKA-TURAK, E. Carotenoids microencapsulation by spray drying method and supercritical micronization. **Food Research International**, v. 99, p. 891–901, 1 set. 2017.

JANSEN-ALVES, C. et al. Microencapsulation of Propolis in Protein Matrix Using Spray Drying for Application in Food Systems. **Food and Bioprocess Technology** 2018 11:7, v. 11, n. 7, p. 1422–1436, 24 maio 2018.

JANSEN-ALVES, C. et al. Propolis microparticles produced with pea protein: Characterization and evaluation of antioxidant and antimicrobial activities. **Food Hydrocolloids**, v. 87, p. 703–711, 1 fev. 2019.

JYOTHI, N. V. N. et al. **Microencapsulation techniques, factors influencing encapsulation efficiency** *Journal of Microencapsulation* Taylor & Francis, , 2010. Disponível em: <<https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.3109/02652040903131301>>. Acesso em: 2 abr. 2021

KESKİN, M. Chemical characterization of Arabic gum- chitosan-propolis beads and determination of α -amylase inhibition effect. **Progress in Nutrition**, v. 22, n. 2, p. 562–567, 12 jun. 2020.

KAMILOGLU, S. et al. Effect of food matrix on the content and bioavailability of flavonoids. **Trends in Food Science & Technology**, 29 out. 2020.

KHAKPOUR, H.; YOUNESI, H.; MOHAMMADHOSSEINI, M. Two-stage biosorption of selenium from aqueous solution using dried biomass of the baker's yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 2, n. 1, p. 532–542, 1 mar. 2014.

KIELISZEK, M. et al. **Pollen and bee bread as new health-oriented products: A review** *Trends in Food Science and Technology* Elsevier Ltd, , 1 jan. 2018.

KIM, D.-M. et al. Preparation of Propolis Nanofood and Application to Human Cancer. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 31, n. 9, p. 1704–1710, 1 set. 2008.

KIM, G. H. et al. **The Role of Oxidative Stress in Neurodegenerative Diseases** *Experimental Neurobiology* Korean Society for Neurodegenerative Disease, , 2015. Disponível em: <[pmc/articles/PMC4688332/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34688332/)>. Acesso em: 1 abr. 2021

KIMOTO, T. et al. Apoptosis and suppression of tumor growth by Artepillin C extracted from Brazilian propolis. **Cancer Detection and Prevention**, v. 22, n. 6, p. 506–515, 1998.

KLHAR, G. T. et al. Antimicrobial activity of the ethanolic extract of propolis against bacteria that cause mastitis in cattle. **Biotemas**, v. 32, n. 1, p. 1–10, 25 fev. 2019.

KUJUMGIEV, A. et al. Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 64, n. 3, p. 235–240, 1 mar. 1999.

KUMAR, M. et al. Recent trends in extraction of plant bioactives using green technologies: A review. **Food Chemistry**, v. 353, p. 129431, 15 ago. 2021.

LETULLIER, C. et al. Comparison of the antibacterial efficiency of propolis samples from different botanical and geographic origins with and without standardization. **Journal of Apicultural Research**, v. 59, n. 1, p. 19–24, 1 jan. 2020.

LI, Z. et al. Formononetin protects TBI rats against neurological lesions and the underlying mechanism. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 338, n. 1–2, p. 112–117, 15 mar. 2014.

LIANG, K. et al. Formononetin mediates neuroprotection against cerebral ischemia/reperfusion in rats via downregulation of the Bax/Bcl-2 ratio and upregulation PI3K/Akt signaling pathway. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 344, n. 1–2, p. 100–104, 15 set. 2014.

LIANG, R. et al. Effect of relative humidity on the store stability of spray-dried beta-carotene nanoemulsions. **Food Hydrocolloids**, v. 33, n. 2, p. 225–233, dez. 2013.

LIMA CAVENDISH, R. et al. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of Brazilian red propolis extract and formononetin in rodents. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 173, p. 127–133, 30 jul. 2015.

LOPEZ, B. G.-C. et al. Antimicrobial and cytotoxic activity of red propolis: an alert for its safe use. **Journal of Applied Microbiology**, v. 119, n. 3, p. 677–687, 1 set. 2015.

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

MA, Z. et al. Formononetin inhibited the inflammation of LPS-induced acute lung injury in mice associated with induction of PPAR gamma expression. **Inflammation**, v. 36, n. 6, p. 1560–1566, 2 dez. 2013.

MACHADO, B. A. S. et al. Chemical composition and biological activity of extracts obtained by supercritical extraction and ethanolic extraction of brown, green and red propolis derived from different geographic regions in Brazil. **PLoS ONE**, v. 11, n. 1, p. e0145954, 8 jan. 2016.

MADENE, A. et al. Flavour encapsulation and controlled release - a review. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 41, n. 1, p. 1–21, 1 jan. 2006.

MAHMOUD, M. S. Decolorization of certain reactive dye from aqueous solution using Baker's Yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) strain. **HBRC Journal**, v. 12, n. 1, p. 88–98, 17 abr. 2016.

MAQSOOD, S. et al. **Bioactive compounds from date fruit and seed as potential nutraceutical and functional food ingredients** Food Chemistry Elsevier Ltd, , 5 mar. 2020.

MARCUCCI, M.; MARCUCCI, M. **Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <<https://hal.archives-ouvertes.fr/hal-00891249>>. Acesso em: 16 jan. 2021.

MAROOF, K. et al. Microencapsulation of propolis by spray drying: A review. **Drying Technology**, 2020.

MARTINOTTI, S.; RANZATO, E. Propolis: a new frontier for wound healing? **Burns & Trauma**, v. 3, 1 dez. 2015.

MARTINS, M. L. et al. Cytotoxic and antibacterial effect of a red propolis mouthwash, with or without fluoride, on the growth of a cariogenic biofilm. **Archives of Oral Biology**, v. 107, 1 nov. 2019.

MATTÉ, G. M.; DA ROSA, S. A TECNOLOGIA DA MICROENCAPSULAÇÃO ATRAVÉS DAS MICROESFERAS DE QUITOSANA **Rev. Iberoam. Polim.** [s.l: s.n.].

MENDANHA, D. V. et al. Microencapsulation of casein hydrolysate by complex coacervation with SPI/pectin. **Food Research International**, v. 42, n. 8, p. 1099–1104, 1 out. 2009.

MENDONSA, N. et al. **Manufacturing strategies to develop amorphous solid dispersions: An overview** **Journal of Drug Delivery Science and Technology** Editions de Sante, , 1 fev. 2020.

MICHALAK, I.; CHOJNACKA, K.; WITEK-KROWIAK, A. State of the art for the biosorption process - A review. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 170, n. 6, p. 1389–1416, 12 jul. 2013.

MILLER, H. E. A simplified method for the evaluation of antioxidants. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v. 48, n. 2, p. 91–91, 1971.

MIRA-SÁNCHEZ, M. D.; CASTILLO-SÁNCHEZ, J.; MORILLAS-RUIZ, J. M. Comparative study of rosemary extracts and several synthetic and natural food antioxidants. Relevance of carnosic acid/carnosol ratio. **Food Chemistry**, v. 309, p. 125688, 30 mar. 2020.

MIRZOEVA, O. K.; GRISHANIN, R. N.; CALDER, P. C. Antimicrobial action of propolis and some of its components: The effects on growth, membrane potential and motility of bacteria. **Microbiological Research**, v. 152, n. 3, p. 239–246, 1 set. 1997.

MOHTAR, L. G. et al. Comparative study of different methodologies for the determination the antioxidant activity of Venezuelan propolis. **Microchemical Journal**, v. 158, p. 105244, 1 nov. 2020.

MOISE, A. R.; BOBIŞ, O. Baccharis dracunculifolia and Dalbergia ecastophyllum, Main Plant Sources for Bioactive Properties in Green and Red Brazilian Propolis. **Plants**, v. 9, n. 11, p. 1619, 21 nov. 2020.

MONIRUZZAMAN, M. et al. Identification of phenolic acids and flavonoids in monofloral honey from bangladesh by high performance liquid chromatography: Determination of antioxidant capacity. **BioMed Research International**, v. 2014, 2014.

MUNRO, I. C. et al. Soy Isoflavones: a Safety Review. **Nutrition Reviews**, v. 61, n. 1, p. 1–33, 1 jan. 2003.

NAKHAEE MOGHADAM, M.; KHAMENEH, B.; FAZLY BAZZAZ, B. S. **Saccharomyces**

cervisiae as an Efficient Carrier for Delivery of Bioactives: a Review

Food Biophysics Springer New York LLC, , 15 set. 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s11483-019-09584-0>>. Acesso em: 28 jan. 2021

NENADIS, N. et al. Estimation of scavenging activity of phenolic compounds using the ABTS .+ assay. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 15, p. 4669–4674, 28 jul. 2004.

NESTERENKO, A. et al. **Vegetable proteins in microencapsulation: A review of recent interventions and their effectiveness** **Industrial Crops and Products** Elsevier, , 1 mar. 2013.

NGUYEN, T. T. et al. Encapsulation of Hibiscus sabdariffa L. anthocyanins as natural colours in yeast. **Food Research International**, v. 107, p. 275–280, 1 maio 2018.

NINA, N. et al. Antibacterial Activity, Antioxidant Effect and Chemical Composition of Propolis from the Región del Maule, Central Chile. **Molecules**, v. 20, n. 10, p. 18144–18167, 6 out. 2015.

NOGUCHI, N.; NIKI, E. **Phenolic antioxidants: A rationale for design and evaluation of novel antioxidant drug for atherosclerosis**. Free Radical Biology and Medicine. **Anais...** Pergamon, 15 maio 2000

NORI, M. P. et al. Microencapsulation of propolis extract by complex coacervation. **LWT - Food Science and Technology**, v. 44, n. 2, p. 429–435, 2011.

NORMAND, V. et al. Flavor encapsulation in yeasts: Limonene used as a model system for characterization of the release mechanism. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 19, p. 7532–7543, 21 set. 2005.

OLDONI, T. L. C. et al. Isolation and analysis of bioactive isoflavonoids and chalcone from a new type of Brazilian propolis. **Separation and Purification Technology**, v. 77, n. 2, p. 208–213, 20 fev. 2011.

OLIVEIRA, A. L. M. S. et al. *Saccharomyces cerevisiae* biosorbed with grape pomace flavonoids: adsorption studies and *in vitro* simulated gastrointestinal digestion. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 54, n. 4, p. 1413–1422, 7 abr. 2019.

PARAMERA, E. I.; KONTELES, S. J.; KARATHANOS, V. T. Microencapsulation of curcumin in cells of *Saccharomyces cerevisiae*. **Food Chemistry**, v. 125, n. 3, p. 892–902, 1 abr. 2011.

PARK, Y. et al. Survey of some components of propolis which were collected by *Apis mellifera* in Brazil. **Web of Science**, 1995.

PARK, Y. K. et al. Antimicrobial activity of propolis on oral microorganisms. **Current Microbiology**, v. 36, n. 1, p. 24–28, 1998.

PARK, Y. K.; ALENCAR, S. M.; AGUIAR, C. L. Botanical origin and chemical composition of Brazilian propolis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 9, p. 2502–2506, 24 abr. 2002.

PELLATI, F. et al. HPLC-DAD and HPLC-ESI-MS/MS methods for metabolite profiling of propolis extracts. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 55, n. 5, p. 934–948, 15 jul. 2011.

PICCINELLI, A. L. et al. Cuban and Brazilian red propolis: Botanical origin and comparative analysis by high-performance liquid chromatography-photodiode array detection/ electrospray ionization tandem mass spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, n. 12, p. 6484–6491, 22 jun. 2011.

PIETTA, P. G. **Flavonoids as antioxidants**. *Journal of Natural Products* American Chemical Society , , 2000. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/sharingguidelines>>. Acesso em: 27 mar. 2021

POBIEGA, K. et al. Prolonging the Shelf Life of Cherry Tomatoes by Pullulan Coating with Ethanol Extract of Propolis During Refrigerated Storage. **Food and Bioprocess Technology**, v. 13, n. 8, p. 1447–1461, 1 ago. 2020.

PRATAMI, D. K. et al. **Total phenolic content and antioxidant activity of spray-dried microcapsules propolis from Tetragonula species**. AIP Conference Proceedings. *Anais...American Institute of Physics Inc.*, 21 mar. 2019. Disponível em: <<http://aip.scitation.org/doi/abs/10.1063/1.5095018>>. Acesso em: 27 mar. 2021

PRATAMI, D. K. et al. Microencapsulation optimization of propolis ethanolic extract from *Tetragonula* spp using response surface methodology. **International Journal of Applied Pharmaceutics**, v. 12, n. 4, p. 197–206, 1 jul. 2020.

PRIOR, R. L. et al. Assays for hydrophilic and lipophilic antioxidant capacity (oxygen radical absorbance capacity (ORACFL)) of plasma and other biological and food samples. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 11, p. 3273–3279, 21 maio 2003.

PRZYBYŁEK, I.; KARPÍŃSKI, T. M. **Antibacterial properties of propolis**. *Molecules* MDPI AG, , 2019. Disponível em: <[pmc/articles/PMC6600457/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31244441/)>. Acesso em: 1 abr. 2021

QUIROGA, E. N. et al. Propolis from the northwest of Argentina as a source of antifungal principles. **Journal of Applied Microbiology**, v. 101, n. 1, p. 103–110, 1 jul. 2006.

RAY, S.; RAYCHAUDHURI, U.; CHAKRABORTY, R. **An overview of encapsulation of active compounds used in food products by drying technology**. *Food Bioscience* Elsevier Ltd, , 1 mar. 2016.

RE, R. et al. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 26, n. 9–10, p. 1231–1237, 1 maio 1999.

REDDY, D. H. K. et al. Biosorption of Ni(II) from aqueous phase by *Moringa oleifera* bark, a low cost biosorbent. **Desalination**, v. 268, n. 1–3, p. 150–157, 1 mar. 2011.

REDDY, D. H. K.; LEE, S. M.; SESHIAIAH, K. Biosorption of toxic heavy metal ions from water environment using honeycomb biomass-an industrial waste material. **Water, Air, and Soil Pollution**, v. 223, n. 9, p. 5967–5982, 20 nov. 2012.

REIS, A. S. DOS et al. Physico-chemical characteristics of microencapsulated propolis co-product extract and its effect on storage stability of burger meat during storage at -15°C . **LWT - Food Science and Technology**, v. 76, p. 306–313, 1 mar. 2017.

REN, W. et al. **Flavonoids: Promising anticancer agents** *Medicinal Research Reviews* John Wiley & Sons, Ltd, , 1 jul. 2003. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/med.10033>>. Acesso em: 16 jan. 2021

RIBEIRO, E. F.; JORGE, N. Oxidative stability of soybean oil added to coffee husk extract (*Coffea arabica* L.) under accelerated storage conditions. **Food Science and Technology**, v. 37, n. Special Issue, p. 5–10, 1 dez. 2017.

RIBEIRO, V. R. et al. Improvement of phenolic compound bioaccessibility from yerba mate (*Ilex paraguariensis*) extracts after biosorption on *Saccharomyces cerevisiae*. **Food Research International**, v. 126, p. 108623, 1 dez. 2019.

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, out. 2011.

RISTIVOJEVIĆ, P. et al. Antimicrobial Activity of Serbian Propolis Evaluated by Means of MIC, HPTLC, Bioautography and Chemometrics. **PLOS ONE**, v. 11, n. 6, p. e0157097, 7 jun. 2016.

ROSENBERG, M.; KOPELMAN, I. J.; TALMON, Y. A Scanning Electron Microscopy Study of Microencapsulation. **Journal of Food Science**, v. 50, n. 1, p. 139–144, 25 ago. 2006.

RUBIO, F. T. V. et al. Enrichment of waste yeast with bioactive compounds from grape pomace as an innovative and emerging technology: Kinetics, isotherms and bioaccessibility. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 45, n. September 2017, p. 18–28, 2018.

RUBIO, F. T. V. et al. Utilization of grape pomaces and brewery waste *Saccharomyces cerevisiae* for the production of bio-based microencapsulated pigments. **Food Research International**, v. 136, p. 109470, out. 2020.

RUFATTO, L. C. et al. **Red propolis: Chemical composition and pharmacological activity** *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* Hainan Medical University, , 1 jul. 2017.

RUFATTO, L. C. et al. Brazilian red propolis: Chemical composition and antibacterial activity determined using bioguided fractionation. **Microbiological Research**, v. 214, p. 74–82, 1 set. 2018.

RÜFER, C. E.; KULLING, S. E. Antioxidant activity of isoflavones and their major metabolites using different in vitro assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 8, p. 2926–2931, 19 abr. 2006.

- SALARI, R. et al. Characterization of Encapsulated Berberine in Yeast Cells of *Saccharomyces cerevisiae*. **Iranian journal of pharmaceutical research : IJPR**, v. 14, n. 4, p. 1247–56, 2015.
- SAMANTHA, S. C. et al. Drying by spray drying in the food industry: Micro-encapsulation, process parameters and main carriers used. **African Journal of Food Science**, v. 9, n. 9, p. 462–470, 30 set. 2015.
- SANTOS, M. S. et al. Probiotic Yogurt with Brazilian Red Propolis: Physicochemical and Bioactive Properties, Stability, and Shelf Life. **Journal of Food Science**, v. 84, n. 12, p. 3429–3436, 21 dez. 2019.
- SANTOS, M. S. et al. Rheological and sensorial evaluation of yogurt incorporated with red propolis. **Journal of Food Science and Technology**, v. 57, n. 3, p. 1080–1089, 1 mar. 2020.
- SCATOLINI, A. M. et al. Evaluation of the antimicrobial activity and cytotoxic effect of hydroxyapatite containing Brazilian propolis. **Biomedical Materials (Bristol)**, v. 13, n. 2, p. 25010, 29 jan. 2018.
- SEELEY, T. D.; MORSE, R. A. The nest of the honey bee (*Apis mellifera* L.). **Insectes Sociaux**, v. 23, n. 4, p. 495–512, dez. 1976.
- SEIBERT, J. B. et al. Development of propolis nanoemulsion with antioxidant and antimicrobial activity for use as a potential natural preservative. **Food Chemistry**, v. 287, n. October 2018, p. 61–67, 2019.
- SERRA COSTA, S. et al. African Journal of Food Science Drying by spray drying in the food industry: Micro-encapsulation, process parameters and main carriers used. v. 9, n. 9, p. 462–470, 2015.
- SHAHIDI, F.; HAN, X. Q. Encapsulation of Food Ingredients. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 33, n. 6, p. 501–547, 1 jan. 1993.
- SHENG, P. X.; TING, Y. P.; CHEN, J. P. **Biosorption of heavy metal ions (Pb, Cu, and Cd) from aqueous solutions by the Marine Alga Sargassum sp. in single- And multiple metal systems**. Industrial and Engineering Chemistry Research. **Anais...** American Chemical Society, 11 abr. 2007. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/sharingguidelines>>. Acesso em: 1 abr. 2021
- SILVA, B. B. et al. Chemical composition and botanical origin of red propolis, a new type of Brazilian propolis. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 5, n. 3, p. 313–316, set. 2008.
- SILVA, C. et al. **Administração oral de peptídeos e proteínas: II. Aplicação de métodos de microencapsulação** *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas* **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**. [s.l: s.n.].
- SILVA, F. R. G. et al. Phytochemical screening and in vitro antibacterial, antifungal, antioxidant and antitumor activities of the red propolis Alagoas. **Brazilian Journal of Biology**, v. 79, n. 3, p. 452–459, 2019.

SILVA, M. P. et al. Brazilian red propolis exhibits antiparasitic properties in vitro and reduces worm burden and egg production in an mouse model harboring either early or chronic *Schistosoma mansoni* infection. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 264, p. 113387, 10 jan. 2021.

SILVEIRA REGUEIRA-NETO, M. et al. Comparative Analysis of the Antibacterial Activity and HPLC Phytochemical Screening of the Brazilian Red Propolis and the Resin of *Dalbergia ecastaphyllum*. **Chemistry & Biodiversity**, v. 16, n. 9, 20 set. 2019.

SINOTT, F. A. et al. Essential oil from Brazilian Red Propolis exhibits anthelmintic activity against larvae of *Toxocara cati*. **Experimental Parasitology**, v. 200, p. 37–41, 1 maio 2019.

SOUZA, V. B. DE et al. Functional properties and stability of spray-dried pigments from Bordo grape (*Vitis labrusca*) winemaking pomace. **Food Chemistry**, v. 164, p. 380–386, 2014.

STAFUSSA, A. P. et al. Biosorption of anthocyanins from grape pomace extracts by waste yeast: kinetic and isotherm studies. **Journal of Food Engineering**, v. 169, p. 53–60, 1 jan. 2016.

STAHL, W.; SIES, H. **Antioxidant activity of carotenoids** *Molecular Aspects of Medicine* Elsevier Ltd, , 1 dez. 2003.

SUKRI, N. et al. Effect of maltodextrin and Arabic gum ratio to physicochemical characteristic of spray dried propolis microcapsules. **International Journal of Food Engineering**, 2020.

SULTANA, A. et al. Microencapsulation of flavors by spray drying using *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Food Engineering**, v. 199, p. 36–41, 1 abr. 2017.

TEIXEIRA, É. W. et al. Seasonal variation, chemical composition and antioxidant activity of brazilian propolis samples. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 7, n. 3, p. 307–315, 2010.

THAMNOPOULOS, I. A. I. et al. Inhibitory activity of propolis against *Listeria monocytogenes* in milk stored under refrigeration. **Food Microbiology**, v. 73, n. February, p. 168–176, 2018.

TIVERON, A. P. et al. Chemical characterization and antioxidant, antimicrobial, and anti-inflammatory activities of South Brazilian organic propolis. **PLoS ONE**, v. 11, n. 11, 1 nov. 2016.

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

TOSI, E. A. et al. Food preservative based on propolis: Bacteriostatic activity of propolis polyphenols and flavonoids upon *Escherichia coli*. **Food Chemistry**, v. 104, n. 3, p. 1025–1029, 1 jan. 2007.

TURNER, N. J.; THOMSON, B. M.; SHAW, I. C. Bioactive Isoflavones in Functional Foods: The Importance of Gut Microflora on Bioavailability. **Nutrition Reviews**, v. 61, n. 6, p. 204–213, 1 jun. 2003.

VASILAKI, A. et al. A natural approach in food preservation: Propolis extract as sorbate alternative in non-carbonated beverage. **Food Chemistry**, v. 298, p. 125080, 15 nov. 2019.

VIUDA-MARTOS, M. et al. Functional Properties of Honey, Propolis, and Royal Jelly. **Journal of Food Science**, v. 73, n. 9, p. R117–R124, 1 nov. 2008.

VOLESKY, B. **Biosorption and meWater Research**Elsevier Ltd, , 1 out. 2007.

WITEK-KROWIAK, A. Analysis of influence of process conditions on kinetics of malachite green biosorption onto beech sawdust. **Chemical Engineering Journal**, v. 171, n. 3, p. 976–985, 15 jul. 2011.

WITEK-KROWIAK, A.; HARIKISHORE KUMAR REDDY, D. Removal of microelemental Cr(III) and Cu(II) by using soybean meal waste - Unusual isotherms and insights of binding mechanism. **Bioresource Technology**, v. 127, p. 350–357, 1 jan. 2013.

WOISKY, R. G.; SALATINO, A. Analysis of propolis: Some parameters and procedures for chemical quality control. **Journal of Apicultural Research**, v. 37, n. 2, p. 99–105, 1998.

YANG, W. et al. Preservation of orange juice using propolis. **Journal of Food Science and Technology**, v. 54, n. 11, p. 3375–3383, 1 out. 2017.

YONGKUN, P. et al. Evaluation of Brazilian propolis by both physicochemical methods and biological activity. **Honeybee Science**, v. 21, n. 2, p. 85–90, 2000.

YOUNG, S.; DEA, S.; NITIN, N. Vacuum facilitated infusion of bioactives into yeast microcarriers: Evaluation of a novel encapsulation approach. **Food Research International**, v. 100, p. 100–112, 1 out. 2017.

YOUNG, S.; NITIN, N. Thermal and oxidative stability of curcumin encapsulated in yeast microcarriers. **Food Chemistry**, v. 275, p. 1–7, 1 mar. 2019.

YOUNG, S.; RAI, R.; NITIN, N. Bioaccessibility of curcumin encapsulated in yeast cells and yeast cell wall particles. **Food Chemistry**, v. 309, p. 125700, 30 mar. 2020.

YUAN, Y. et al. The Phenolic Compounds, Metabolites, and Antioxidant Activity of Propolis Extracted by Ultrasound-Assisted Method. **Journal of Food Science**, v. 84, n. 12, p. 3850–3865, 21 dez. 2019.

ZABAIYOU, N. et al. **Biological properties of propolis extracts: Something new from an ancient product****Chemistry and Physics of Lipids**Elsevier Ireland Ltd, , 1 out. 2017.

ZANCANELA, D. C. et al. Natural rubber latex membranes incorporated with three different types of propolis: Physical-chemistry and antimicrobial behaviours. **Materials Science and Engineering C**, v. 97, p. 576–582, 1 abr. 2019.

ZHANG, C. X.; WU, H.; WENG, X. C. Two novel synthetic antioxidants for deep frying oils. **Food Chemistry**, v. 84, n. 2, p. 219–222, 1 fev. 2004.

ZHENG, X. Y. et al. Effect of pH on uranium(VI) biosorption and biomineralization by *Saccharomyces cerevisiae*. **Chemosphere**, v. 203, p. 109–116, 1 jul. 2018.

ZUHROTUN, A. et al. Isolation of bioactive compound of *Michelia champaca* L. bark and its activity test using mechanism-based yeast bioassay. **Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research**, v. 9, n. 5, p. 158–161, 1 set. 2016.