

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ZOOTECNIA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS

SAMUEL HENRIQUE GOMES DE SÁ

**Estudo da combinação das técnicas de *spray drying* e *spray chilling* para
encapsulação de extrato de própolis vermelha**

Pirassununga

2022

SAMUEL HENRIQUE GOMES DE SÁ

**Estudo da combinação das técnicas de *spray drying* e *spray chilling* para
encapsulação de extrato de própolis vermelha**

Versão Corrigida

Dissertação apresentada à Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Engenharia de Alimentos do Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos.

Área de Concentração: Ciências da Engenharia de Alimentos

Orientador: Profa. Dra. Carmen Sílvia Favaro Trindade

Pirassununga

2022

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

S111e Sá, Samuel Henrique Gomes
Estudo da combinação das técnicas de spray drying e spray chilling para encapsulação de extrato de própolis vermelha / Samuel Henrique Gomes Sá ; orientadora Carmen Sílvia Favaro Trindade. -- Pirassununga, 2022.
114 f.

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

1. Própolis vermelha. 2. Formononetina. 3. Microencapsulação. 4. Spray drying. 5. Spray chilling. I. Trindade, Carmen Sílvia Favaro , orient. II. Título.

“Não se pode ensinar nada a um homem; só é possível ajudá-lo a encontrar a coisa dentro de si.” (Galileu Galilei)

BIOGRAFIA

Samuel Henrique Gomes de Sá, filho de Marli Gomes e Milton Pereira de Sá, nasceu na cidade de Americana, no estado de São Paulo, em 19 de março de 1990. Em 2006 iniciou sua carreira na área de alimentos estagiando no laboratório de controle de qualidade da Sucos Del Valle do Brasil. No ano seguinte iniciou graduação em Tecnologia em alimentos pelo Fundação Hermínio Ometto – FHO (UNIARARAS). Profissionalmente, trabalhou na Empresa Vivo Sabor Alimentação, na unidade fabril de Americana e em outras empresas não relacionadas a área de alimentos.

Em 2014, Samuel iniciou sua graduação em Engenharia de Alimentos pela Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos (FZEA), localizada no campus USP Fernando Costa, em Pirassununga / SP. Durante a graduação realizou estágio nas áreas de ensino, sendo monitor da disciplina de Operações Unitárias II, pesquisa em análises microbiológicas de moluscos bivalves e extensão trabalhando na incubadora de empresas da FZEA, a UNICETEX.

Em 2019, ingressou no Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos da FZEA, com bolsa da CAPES. Durante o mestrado, no primeiro ano cumpriu os 24 créditos exigidos para o depósito da dissertação e posteriormente trabalhou no Laboratório de Encapsulação e Alimentos Funcionais (Lenalis), onde realizou análises com o composto em estudo e pôde concluir o mestrado no prazo de 36 meses.

AGRADECIMENTOS

Agradeço inicialmente 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.

Agradeço a minha família, mãe, irmãs, tios, tias, primos e primas e o amor maior de todos nós e que deu origem a essa família maravilhosa, meu avô Sebastião Gomes Filho e minha avó Tereza Pereira Gomes, muito obrigado por fazerem parte da minha vida.

A minha orientadora, professora e amiga Carmen Sílvia Favaro Trindade, pela honra de poder trabalhar contigo. Obrigada pela paciência e disponibilidade, pelos ensinamentos e pelo exemplo de professora, pesquisadora e pessoa que você é.

Agradeço ao professor Severino Matias De Alencar, por ter confiado a mim a matéria-prima para realização desse projeto, a Sofia e a todos seus orientados que de alguma forma ajudaram na realização de parte deste trabalho.

Agradeço à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo financiamento deste projeto.

Ao técnico Marcelo Thomazini, Lorena Pinho, Priscila Freitas, Priscilla Lima, Marluci Silva, Marluci Ghiraldi e a todos da equipe do LENALIS pela disponibilidade em me auxiliar no meu projeto. Ao colega Eduardo Chagas e a todos os professores e funcionários de Departamento de Engenharia de Alimentos (ZEA), sou imensamente grato a todos por cada segundo destinado a me ajudar em meu trabalho.

Agradeço imensamente a Tania Andreotti por todos esses anos de apoio e preocupação. Agradeço também aos amigos de graduação por terem me ajudado a ver na docência meu caminho para a vida e a todos que direta ou indiretamente me ajudaram ou torceram pelo meu sucesso.

RESUMO

SÁ, S. H. G. **Estudo da combinação das técnicas de *spray drying* e *spray chilling* para encapsulação de extrato de própolis vermelha.** 2021. 114 f. Dissertação (Mestrado) Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2021.

Própolis é uma resina natural complexa produzida por abelhas operárias. O último tipo de própolis identificado foi encontrado na região Nordeste e classificado como própolis vermelha brasileira. Tal material é de grande interesse comercial, todavia, para sua aplicação em alimentos, a presença do álcool é indesejável, bem como características sensoriais muito marcantes. Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi microencapsular extrato de própolis vermelha utilizando as técnicas de *spray drying* e *spray chilling* e, em seguida, combinar as técnicas recobrando parte das partículas obtidas por *spray drying* utilizando a técnica de *spray chilling*. Os pós, produzidos por ambas as técnicas e pela associação delas, foram avaliados quanto ao tamanho e distribuição das partículas, microscopia eletrônica de varredura, cor instrumental, estabilidade de fenólicos, flavonoides e a formononetina durante 60 dias de armazenamento e estudo da liberação da formononetina em meio gastrointestinal simulado. Os resultados obtidos para distribuição de tamanho mostraram partículas obtidas por *spray drying* com diâmetros médios de volume variando de 21,88 a 66,03 μm , partículas obtidas por *spray chilling* variando entre 222,53 e 286,74 μm e partículas recobertas com diâmetros de volume entre 146,56 e 215,15 μm , dependendo da proporção do coadjuvante utilizado. A microscopia eletrônica de varredura evidenciou que todas as partículas apresentaram característica do tipo matriz, com formatos variados entre os tratamentos e que frações das partículas obtidas por *spray drying* não foram devidamente recobertas pela combinação das técnicas. A avaliação da cor mostrou que a diferença de cor ao longo do período estudado foi menor nas partículas recobertas e maior nas partículas obtidas por *spray chilling*. O ensaio de estabilidade demonstrou que a microencapsulação do extrato de própolis vermelha pelas técnicas estudadas é eficiente na proteção dos compostos fenólicos, flavonoides totais e a formononetina do extrato ao longo do período analisado. Já o estudo da

liberação em meio gastrointestinal simulado mostrou perfis de liberação bem distintos entre as partículas nas três fases analisadas (oral, gástrica e intestinal), com as partículas obtidas por *spray drying* tendo a liberação de formononetina concentrada na fase oral, enquanto que as partículas obtidas por *spray chilling* mostraram liberação concentrada na fase intestinal e as partículas recobertas mostrando liberação crescente ao longo do ensaio com o máximo na fase intestinal. Como conclusão, tem-se que a utilização das técnicas de microencapsulação por *spray drying*, *spray chilling* e a combinação delas resultam em partículas com características, níveis de proteção durante armazenagem e perfil de liberação dos compostos encapsulados bem distintos entre si, abrindo, para cada uma delas, um leque de possibilidades de aplicações na indústria alimentícia ou farmacêutica.

Palavras-chave: Própolis vermelha; Fenólicos; Flavonoides; Formononetina; Microencapsulação; Spray drying; Spray chilling; Estabilidade.

ABSTRACT

SÁ, S. H. G. **Stability study of microencapsulated red propolis extract by spray drying and spray chilling.** 2021. 114 f. (M.Sc) Dissertation- Faculty of Animal Science and Food Engineering, University of São Paulo, Pirassununga, 2021.

Propolis is a complex natural resin produced by worker bees. The last type of propolis identified was found in the Northeast region and classified as Brazilian red propolis. Such material is of great commercial interest, however, for its application in food, the presence of alcohol is undesirable, as well as very striking sensory characteristics. In this context, the objective of this work was to microencapsulate red propolis extract using spray drying and spray chilling techniques and then combine the techniques by covering part of the particles obtained by spray drying using the spray chilling technique. The powders produced by both techniques and their association were evaluated for particle size and distribution, scanning electron microscopy, instrumental color, stability of phenolics, flavonoids and formononetin during 60 days of storage and to study the release of formononetin under simulated gastrointestinal conditions. The results obtained for size distribution showed particles obtained by spray drying with average volume diameters ranging from 21.88 to 66.03 μm , particles obtained by spray chilling ranging between 222.53 and 286.74 μm and coated particles with diameters volume between 146.56 and 215.15 μm , depending on the proportion of adjuvant used. Scanning electron microscopy showed that all particles presented a matrix type characteristic, with different formats between treatments and that fractions of particles obtained by spray drying were not properly covered by the combination of techniques. The color evaluation showed that the color difference over the period studied was smaller in the coated particles and greater in the particles obtained by spray chilling. The stability assay showed that the microencapsulation of the red propolis extract by the studied techniques is efficient protecting the phenolic compounds, total flavonoids and the formononetin of the extract throughout the analyzed period. The study of the release under simulated gastrointestinal conditions showed very different release profiles between the particles in the three analyzed phases (oral, gastric and

intestinal), with the particles obtained by spray drying having the release of concentrated formononetin in the oral phase, while the particles obtained by spray drying obtained by spray chilling showed concentrated release in the intestinal phase and the coated particles showing increasing release throughout the assay with the maximum in the intestinal phase. In conclusion, the use of microencapsulation techniques by spray drying, spray chilling and their combination results in particles with characteristics, levels of protection during storage and release profile of the encapsulated compounds that are very different from each other, opening, for each one of them, a range of application possibilities in the food or pharmaceutical industry.

Keywords: Red propolis; Phenolics; Flavonoids; Formononetine; Microencapsulation; Spray drying; Spray chilling; Stability.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura de alguns flavonoides importantes	30
Figura 2 - Principais morfologias de partículas obtidas em processos de microencapsulação	31
Figura 3 - Diagrama de um spray dryer com fluxo concorrente.....	35
Figura 4 - Cromatogramas do extrato de própolis vermelha (A) e do padrão de formononetina (B).....	57
Figura 5 - Pós produzidos por spray drying, spray chilling e pela combinação das técnicas	59
Figura 6 - Secagem do extrato de própolis vermelha sem coadjuvante de processo por spray drying	62
Figura 7 - Higroscopicidade e dispersibilidade dos pós.....	65
Figura 8 - Representação da tonalidade e da saturação no plano $a^* \times b^*$	68
Figura 9 - Características de cor dos pós.....	69
Figura 10 - Micrografias obtidas pela técnica de microscopia eletrônica de varredura das partículas.....	76
Figura 11 - Estabilidade dos compostos fenólicos e dos flavonoides durante a estocagem das partículas	78
Figura 12 - Atividade antioxidante dos pós.....	81
Figura 13 - Teor de formononetina nos pós.....	83
Figura 14 - Ensaio de liberação de formononetina em sistema digestório simulado "in vitro", valores expressos em %.....	84

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição dos materiais de parede utilizados.....	44
Tabela 2 - Umidade e atividade de água dos pós.....	63
Tabela 3 - Medidas de tendência da distribuição de tamanho das partículas..	72

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Condições de operação para obtenção das partículas por spray drying	48
Quadro 2 - Condições de operação para obtenção das partículas por spray chilling	49
Quadro 3 - Formulação e identificação das partículas estudadas	61

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

OAS	Octenil Anidrido Succínico
DPPH	2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl
LDL	Low Density Lipoproteins
GA	Goma arábica
EEP	Extrato etanólico própolis vermelha
EPC	Extrato etanólico concentrado de própolis vermelha
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
ABTS	2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)
Trolox	6-Hidroxi-2,5,7,8-tetrametilchroman-2-ácido carboxílico
TEq	Trolox Equivalente
FRAP	Capacidade de redução de ferro
TPTZ	2,4,6-Tripiridil-S-Triazina
UR	Umidade relativa
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
AGE	Ácido gálico equivalente

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
2	OBJETIVOS	22
2.1	Objetivo geral	22
2.2	Objetivos específicos	22
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	23
3.1	Própolis	23
3.2	Própolis vermelha	24
3.3	Atividades biológicas	24
3.3.1	<i>Atividades antibacteriana</i>	25
3.3.2	<i>Atividades antifúngicas</i>	26
3.3.3	<i>Atividade antioxidante</i>	27
3.3.4	<i>Outras atividades biológicas</i>	28
3.4	Compostos fenólicos	29
3.5	Flavonoides	29
3.6	Microencapsulação	30
3.6.1	<i>Aspectos gerais</i>	30
3.6.2	<i>Spray drying</i>	33
3.6.3	<i>Spray chilling</i>	39
3.6.4	<i>Combinação de técnicas de microencapsulação</i>	42
4	MATERIAIS	44
5	MÉTODOS	45
5.1	OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO EXTRATO	45
5.1.1	<i>Extrato etanólico de própolis vermelha (EEP)</i>	45
5.1.2	<i>Determinação do teor de umidade</i>	45
5.1.3	<i>Determinação de fenólicos totais</i>	46
5.1.4	<i>Determinação de flavonoides totais</i>	46

5.1.5	<i>Determinação de formononetina por Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)</i>	46
5.1.6	<i>Atividade antioxidante do extrato</i>	47
5.2	MICROENCAPSULAÇÃO	48
5.2.1	<i>Microencapsulação por spray drying</i>	48
5.2.2	<i>Microencapsulação por spray chilling</i>	48
5.2.3	<i>Combinação entre as técnicas</i>	49
5.3	CHARACTERIZAÇÃO DOS PÓS OBTIDOS	49
5.3.1	<i>Teor de umidade e atividade de água</i>	49
5.3.2	<i>Higroscopicidade</i>	50
5.3.3	<i>Dispersibilidade em água</i>	50
5.3.4	<i>Cor instrumental</i>	50
5.3.5	<i>Diâmetro médio e distribuição do tamanho das partículas</i>	51
5.3.6	<i>Microscopia óptica e Morfologia (MEV)</i>	51
5.3.7	<i>Determinação de fenólicos totais nas partículas</i>	51
5.3.8	<i>Determinação de flavonoides totais nas partículas</i>	52
5.3.9	<i>Determinação de formononetina nas partículas</i>	52
5.3.10	<i>Atividade antioxidante dos pós</i>	52
5.3.11	<i>Capacidade de redução do radical ABTS das partículas dos pós</i>	52
5.3.12	<i>Capacidade de redução de ferro (FRAP) das partículas dos pós</i>	53
5.4	<i>Estabilidade durante a estocagem</i>	53
5.5	<i>Ensaio de liberação de formononetina no sistema digestório simulado</i>	53
5.6	<i>Análise dos resultados</i>	54
6	RESULTADOS E DISCUSSÃO	55
6.1	CHARACTERIZAÇÃO DO EXTRATO	55
6.1.1	<i>Obtenção do EEP e determinação de umidade</i>	55
6.1.2	<i>Teor de fenólicos totais e flavonoides totais no extrato</i>	55

6.1.3	<i>Identificação e determinação de formononetina por CLAE</i>	56
6.1.4	<i>Capacidade antioxidante do EEP</i>	57
6.2	MICROENCAPSULAÇÃO	58
6.2.1	<i>Produção das micropartículas</i>	58
6.2.2	<i>Delineamento experimental e obtenção do tratamento controle</i>	61
6.3	CARACTERIZAÇÃO DOS PÓS OBTIDOS	62
6.3.1	<i>Teor de umidade e atividade de água</i>	62
6.3.2	<i>Higroscopicidade e Dispersibilidade em água</i>	64
6.3.3	<i>Cor instrumental</i>	67
6.3.4	<i>Distribuição de tamanho das partículas</i>	71
6.3.5	<i>Microscopia óptica e Morfologia (MEV)</i>	74
6.4	Estabilidade durante a estocagem	77
6.4.1	<i>Teor de fenólicos e flavonoides totais</i>	77
6.4.2	<i>Atividade antioxidante das partículas</i>	80
6.4.3	<i>Determinação de formononetina nos pós obtidos</i>	82
6.5	Ensaio de liberação da formononetina no sistema digestório	83
7	CONCLUSÃO	88
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	89
	APÊNDICE	111

1 INTRODUÇÃO

O desenvolvimento e emprego de aditivos, aliado ao desenvolvimento de novas técnicas de processamento e embalagem desempenham um importante papel na produção de alimentos mais práticos de serem preparados e consumidos, na manutenção de seus atributos sensoriais, no aumento do *shelf-life* e até mesmo na melhora das suas características nutricionais. Tais efeitos atendem as necessidades de consumidores que vivem em grandes centros urbanos, normalmente distantes de onde os alimentos são produzidos, e também permitem o acesso de populações inteiras a produtos que, décadas atrás, seriam de difícil obtenção. No entanto, apesar de representarem um importante papel na alimentação humana atual, o aumento da incidência de reações alérgicas e a potencial formação de subprodutos tóxicos, alguns cancerígenos, são motivo de preocupação dos consumidores (CAMPOS HONORATO et al., 2013; CASTRO-ROSAS et al., 2017) e têm causado a rejeição de produtos adicionados dessas substâncias.

Diante desses resultados observados, tem havido uma crescente demanda do mercado consumidor por alimentos livres de aditivos químicos e que promova saúde e bem-estar aos indivíduos. Assim, a indústria de alimentos tem voltado seus esforços para a utilização de matérias primas naturais para substituir os aditivos químicos sintéticos utilizados atualmente e que ainda possuam compostos com atividade biológica que possa trazer benefícios a saúde dos consumidores (FAVARO-TRINDADE; PINHO, 2008; SILVA et al., 2013).

Própolis é uma resina natural complexa produzida pelas abelhas operárias ao misturarem secreções obtidas de diferentes partes de plantas como ramos, gomas, botões foliares, exsudados, mucilagem, etc, encontradas próximas a colmeia. A própolis formada é utilizada como material estrutural para selar espaços abertos protegendo fisicamente a colmeia de microrganismos e insetos invasores, além de controlar o fluxo de ar e a temperatura da colmeia, impedir a entrada de água e a decomposição de insetos que possam vir a morrer lá dentro (RUFATTO et al., 2017; ANJUM et al., 2018).

Um novo tipo de própolis foi identificado em áreas de mangue e leitos de rios na região Nordeste e foi classificada como própolis vermelha. Esse novo tipo

de própolis demonstrou notável ação antibacteriana contra *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* entre outros microrganismos (RUFATTO et al., 2017), citotoxicidade contra células de câncer pancreático (AWALE et al., 2008) atividade antiaterogênica (DALEPRANE et al., 2012) e cicatrizante (SIQUEIRA et al., 2014).

A própolis vermelha possui uma composição química única constituída por isoflavonoides, chalconas e pterocarpanos bioativos, o que não existe em nenhuma outra própolis brasileira (ALENCAR et al., 2007; FREIRES; ALENCAR; ROSALEN, 2016). De fato, Oldoni et al. (2011) isolaram isoflavonoides bioativos da própolis vermelha brasileira (vestitol e neovestitol) e uma chalcona (isoliquiritigenin), as quais apresentaram além da atividade antioxidante, atividades anti-inflamatória e antimicrobiana (BUENO-SILVA et al., 2013), sendo que estes compostos nunca foram antes relatados em outras própolis. Portanto, a própolis vermelha brasileira possui isoflavonoides bioativos, não encontrados em nenhuma outra própolis, o que a torna uma própolis de composição fenólica especial e de grande interesse farmacológico.

Atualmente, no setor de fármacos e cosméticos, muitos produtos contendo própolis em sua composição já são comercializados mundialmente. Porém, por possuir compostos de fácil degradação e por ser comercializada como extrato alcoólico, com características sensoriais marcantes, como aroma forte e gosto amargo, sua aplicação é pouco difundida na indústria de alimentos (NORI et al., 2011).

No entanto, os compostos bioativos identificados na própolis vermelha, podem aumentar o *shelf-life* de produtos ao diminuir a oxidação de nutrientes ou minimizar o crescimento microbiano, além de poder ser utilizado como ingrediente funcional em formulações alimentícias. Neste contexto, a microencapsulação do extrato de própolis vermelha surge como uma alternativa valiosa para se obter o extrato de própolis vermelha em pó e proteger seus compostos de agentes agressores até o momento de sua aplicação. Dessa forma, a microencapsulação pode tornar o extrato disponível não somente para aplicação em formulações farmacêuticas, mas também como ingrediente em alimentos funcionais (SILVA et al., 2011).

A microencapsulação é o processo no qual uma fina camada de agente encapsulante, normalmente polimérico, envolve um composto bioativo,

formando pequenas partículas denominadas micropartículas, que protegem o composto de degradações do meio onde será inserido ou o libera gradualmente neste meio. Na indústria de alimentos, a microencapsulação pode ser usada para facilitar a dispersão de substâncias imiscíveis, minimizar sabores e odores indesejados, aumentar *shelf-life* de ingredientes ao protegê-los de agentes agressores ou promover liberação controlada do agente encapsulado. Além disso, é importante que as micropartículas formadas não impactem negativamente a qualidade sensorial do produto e, dependendo do objetivo final de sua aplicação, devem resistir às condições do trato gastrointestinal até o momento ideal para a liberação do composto encapsulado (FAVARO-TRINDADE; PINHO, 2008).

Diversas técnicas podem ser utilizadas para a microencapsulação de ingredientes alimentícios e sua escolha depende das propriedades do agente encapsulante e do material ativo, da aplicação e características desejadas para a micropartícula, do tamanho e mecanismo de liberação. Dentre essas técnicas destacam-se os processos de microencapsulação por *spray drying* e *spray chilling* (FAVARO-TRINDADE; PINHO, 2008).

Spray drying é o processo de secagem por atomização. Nesta técnica, o composto ativo é disperso ou dissolvido em uma solução contendo o coadjuvante, em seguida essa mistura é bombeada até o atomizador que promove a névoa (*spray*) na câmara de secagem contendo uma corrente de ar quente. O encontro da solução nebulizada com o ar ocasiona a evaporação do solvente e na conseqüente formação de partículas sólidas que são coletadas no ciclone. As partículas obtidas são ocas e do tipo matriz, onde o composto ativo fica disperso em todo o volume e na parede interna da casca formada, podendo estar inclusive em sua superfície. A técnica possui uma boa eficiência de encapsulação e resulta em pós com alta dispersibilidade em água (BRASILEIRO, 2011).

Marquele et al. (2006) aplicou o método de secagem por atomização, sem utilizar coadjuvante, para obter partículas de extrato de própolis em pó e observou perdas de fenólicos totais e flavonoides acima de 30%. Silva et al. (2011), também sem utilizar coadjuvante, observou que as partículas obtidas se aglomeravam muito facilmente e possuíam baixa dispersibilidade em água. Já utilizando gelatina como coadjuvante, Bruschi et al. (2003) conseguiu minimizar

as características sensoriais marcantes do extrato de própolis e observou que a atividade bactericida contra *Staphylococcus aureus* foi mantida. Por fim, Silva et al. (2013) encapsulou extrato de própolis verde utilizando Goma Arábica (GA) e OAS e obteve pós de alta dispersibilidade em água e estáveis durante o armazenamento, sendo o tratamento com goma arábica (1:6) o que apresentou os melhores resultados quanto a preservação dos compostos fenólicos da própolis. No entanto, em nenhum dos trabalhos citados utilizou-se extrato de própolis vermelha como objeto de estudo.

Spray chilling consiste na atomização de uma mistura do composto ativo em suspensão com um carreador fundido, dentro de um ambiente em temperatura abaixo do ponto de fusão do carreador. Devido à baixa temperatura do ambiente, as gotículas formadas pela atomização da mistura se solidificam rapidamente formando as micropartículas (FAVARO-TRINDADE; OKURO; MATOS, 2016). Esta técnica também propicia a produção de partículas do tipo matriz, mas, ao contrário da técnica de *spray drying*, como não há evaporação de solvente, as partículas obtidas são maciças.

Não foram encontrados estudos sobre a encapsulação de extrato de própolis por *spray chilling*.

Ainda, nesse projeto pretende-se associar as técnicas de *spray drying*, que é clássica, e já foi explorada para a encapsulação de própolis verde (BRUSCHI et al., 2003; MARQUELE et al., 2006; SILVA et al., 2011, 2013) com a técnica de *spray chilling*, na tentativa de se obter partículas do tipo reservatório, onde o núcleo fica recoberto pelo material de parede. De fato, em um trabalho recente do grupo de pesquisa a associação dessas técnicas permitiu o mascaramento do gosto amargo de extrato de vitex e sua incorporação em chocolate, enquanto a utilização delas individualmente não foi efetiva para esse fim (BARRIENTOS; FÁVARO-TRINDADE, 2017).

Dessa forma, pretende-se obter três tipos de partículas de extrato de própolis vermelha: por *spray drying*, por *spray chilling* e associando as duas técnicas, avaliar qual tipo de partícula oferece maior estabilidade aos compostos bioativos da própolis vermelha durante a armazenagem e, por fim, observar a cinética de liberação dos compostos bioativos em ensaio estático “*in vitro*”.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Obter própolis vermelha na forma de pó, avaliar sua estabilidade durante o armazenamento e seu perfil de liberação em ensaio “in vitro”.

2.2 Objetivos específicos

- Obter extrato alcoólico de própolis;
- Determinar o teor dos compostos bioativos presentes no extrato;
- Encapsular o extrato obtido pela técnica de *spray drying* e caracterizar as micropartículas obtidas;
- Encapsular o extrato obtido pela técnica de *spray chilling* e caracterizar as micropartículas obtidas;
- Recobrir parte das partículas obtidas por *spray drying* utilizando a técnica de *spray chilling* e caracterizar essas micropartículas;
- Estudar a estabilidade dos compostos encapsulados durante a estocagem;
- Avaliar o processo de liberação controlada dos compostos bioativos em um sistema digestório “in vitro”.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Própolis

Própolis é o nome dado a resina natural produzida pelas abelhas da espécie *Apis mellífera* a partir de diferentes fontes vegetais. É uma substância complexa, produzida a partir da mistura de diferentes partes de plantas como ramos, gomas, botões foliares, exsudados, mucilagem, etc, encontradas próximas a colmeia (BISPO JUNIOR et al., 2012).

A palavra deriva do grego “Pro”, que significa “em defesa de”, e “polis”, significando “cidade” e remete a sua função estrutural de selar espaços abertos protegendo fisicamente a colmeia de microrganismos e insetos invasores. Além disso, a própolis também controla o fluxo de ar, ajuda a manter a temperatura da colmeia constante, impede a entrada de água e a decomposição de insetos que, ocasionalmente, possam vir a morrer lá dentro (RUFATTO et al., 2017; ANJUM et al., 2018).

A própolis possui composição química extremamente complexa, tendo mais de 300 compostos identificados em diferentes amostras. Possuem coloração, odor e atividades biológicas variáveis dependendo da flora da região visitada pelas abelhas (ALENCAR et al., 2007; PEÑA, 2008).

Apesar de já ser utilizada a vários séculos na medicina popular ao redor do mundo, nas últimas décadas houve um crescente aumento no interesse pela resina. Diversos estudos têm demonstrado uma ampla variedade de ações biológicas e farmacológicas dos diferentes tipos de própolis. Dentro os efeitos já relatados destacam-se os efeitos bactericidas, fungicidas, antivirais, anti-inflamatórios, antioxidantes, cicatrizantes, anestésicos e até mesmo efeitos contra células tumorais (SILVA et al., 2006; DALEPRANE et al., 2012; SILVA-CARVALHO; BALTAZAR; ALMEIDA-AGUIAR, 2015).

As própolis brasileiras foram classificadas em 12 tipos principais por Park et al. (2000) baseado em suas propriedades físico-químicas e origem geográfica. Recentemente, Aguiar et al. (2003) observaram, em um grupo de amostras obtidas no nordeste brasileiro, características físico-químicas diferentes dos demais grupos identificados até então. Esse novo tipo de própolis foi identificado e catalogado como o 13º tipo e, devido à sua coloração, ficou popularmente conhecida como própolis vermelha (BISPO JUNIOR et al., 2012).

3.2 Própolis vermelha

Própolis de coloração vermelha já foram identificadas em diversos países como China, México, Cuba, Venezuela e no Brasil. No território brasileiro a própolis vermelha é encontrada na costa nordeste do país, mais especificamente nos estados de Alagoas, Sergipe, Paraíba, Pernambuco e Bahia. Apesar de terem a mesma coloração, as amostras obtidas em cada uma dessas localidades possuem composição química distinta, sendo esta totalmente dependente da botânica regional e das espécies de abelhas coletoras (LÓPEZ et al., 2014).

Os primeiros estudos com a própolis vermelha são recentes, datando de 2008, e tiveram como objetivo identificar sua composição química e origem botânica. Silva et al. (2008) e Dausch et al. (2008) identificaram a fonte botânica utilizada pelas abelhas como sendo os exsudados da planta *Dalbergia ecastophyllum*, conhecida popularmente como rabo-de-bugio, que são muito comuns em áreas de mangue da região nordeste do Brasil.

A própolis vermelha possui composição química complexa, que se deve aos compostos nela presentes, cujos principais já identificados são as chalconas pterocarpanos, isoflavonoides, terpenos, taninos e flavonoides. Vários estudos vêm relacionando esses compostos a diferentes atividades biológicas como atividade antibacteriana, anticariogênica, antifúngica, anti-inflamatória, antioxidante, entre outras. Estudos também demonstraram que a estrutura desses compostos difere dos compostos encontrados nos outros 12 tipos de própolis já identificadas, tornando a própolis vermelha uma resina de composição única (FREIRES; ALENCAR; ROSALEN, 2016).

3.3 Atividades biológicas

Desde sua descoberta a própolis vermelha vem sendo estudada para elucidar suas propriedades biológicas e os resultados observados em diferentes pesquisas mostram um grande potencial de aplicação dessa fonte natural em diversas áreas como, por exemplo, a farmacológica e de alimentos (BEGNINI et al., 2014; FREIRES; ALENCAR; ROSALEN, 2016).

As atividades biológicas observadas em diversos estudos foram relacionadas com a composição química, principalmente aos flavonoides e outros compostos fenólicos, presentes na resina. No entanto é importante

observar que, uma vez que a composição química da própolis varia de acordo com a flora local, época do ano e espécie das abelhas, espera-se diferentes atividades biológicas para própolis obtidas em diferentes fontes (RUFATTO et al., 2017).

Assim, algumas das atividades biológicas observadas na própolis vermelha brasileira serão relacionadas a seguir.

3.3.1 Atividades antibacteriana

Estudos conduzidos, principalmente nas áreas médicas e veterinárias, têm demonstrado o potencial antibiótico da utilização de extratos de própolis contra diversos gêneros de bactérias, sendo as gram-positivas mais sensíveis que as gram-negativas (BISPO JUNIOR et al., 2012).

Na área odontológica, estudos com o extrato etanólico e a fração clorofórmica da própolis vermelha demonstraram atividade bactericida em microrganismos colonizadores de biofilmes orais, bactérias cariogênicas e periodontopatógenas. As concentrações mínimas inibitórias obtidas para os microrganismos *Actinomyces naeslundii* (25-250 µg/mL), *Streptococcus mutans* (50-200 µg/mL), *Streptococcus sobrinus* (<6,25 µg/mL) e *Staphylococcus aureus* (3,8-100 µg/mL), utilizando método de difusão em ágar, foram consideradas pelo autor como de alto efeito bactericida (FREIRES; ALENCAR; ROSALEN, 2016; KOO et al., 2013).

Cabral et al. (2009) e Dausch et al. (2008) obtiveram bons resultados utilizando extrato etanólico de própolis vermelha na inibição de *Staphylococcus aureus* de diferentes cepas. Machado et al. (2016) observou que o extrato de própolis vermelha de Sergipe foi o que apresentou maior atividade antibacteriana contra os gêneros *S. aureus* (ATCC 33951), *S. aureus* (ATCC 25923) e *Escherichia coli* (ATCC 25922), com concentrações mínimas inibitórias de 400–100 µg/mL, 50–25 µg/mL e 400 µg/mL, respectivamente.

Righi et al. (2011) observaram que o extrato metanoico de própolis vermelha foi capaz de inibir o crescimento de todos os microrganismos testados. O grupo obteve concentrações mínimas inibitórias de 256 µg/mL contra *Bacillus subtilis*, *Candida albicans* e *Pseudomonas aeruginosa*. Já contra *E. coli*, *Salmonella typhimurium*, *E. faecalis*, *Proteus mirabilis* e *Streptococcus pyogenes*

a concentração mínima inibitória foi de 512 $\mu\text{g/mL}$. Por fim, os pesquisadores obtiveram a concentração mínima inibitória de 1024 $\mu\text{g/mL}$ para o gênero *Klebsiella pneumoniae*.

Bispo Junior et al. (2012) observaram que a utilização da fração de própolis vermelha extraída com acetato de etila retornou melhores resultados contra todos os microrganismos testados (*Shigella flexneri*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *S. aureus*, *Proteus vulgaris*, *Klebsiella pneumoniae* e *E. coli*). No mesmo estudos os autores também notaram que a fração etanoica da própolis vermelha apresentou ação contra 100% das cepas de Gram-positivos e contra 62,5% das cepas de Gram-negativos.

Os mecanismos bactericidas e bacteriostáticos da própolis vermelha ainda não foram completamente elucidados. No entanto, estudos indicam que possam ocorrer o aumento da permeabilidade da membrana celular reduzindo a capacidade de barreira, inibição das enzimas responsáveis pela síntese de ácidos nucleicos e inibição das enzimas envolvidas no metabolismo energético dos microrganismos uma vez que esses efeitos já foram atribuídos aos flavonoides (FREIRES; ALENCAR; ROSALEN, 2016).

3.3.2 Atividades antifúngicas

Extrato de própolis vermelha também tem se mostrado efetivo contra fungos. Bezerra et al. (2015) observou ação antifúngica de extrato de própolis (25%) contra *Candida albicans*, responsável pela candidíase oral, uma infecção comum em indivíduos imunodeprimidos e cuja incidência vem aumentando nos últimos anos.

Estudos investigaram a ação de extrato de própolis vermelha no combate a fungos causadores de infecções dermatológicas. Os pesquisadores observaram concentrações fungistáticas de 8–128 $\mu\text{g/mL}$ para *Trichophyton rubrum*, 32–128 $\mu\text{g/mL}$ para *Trichophyton tonsurans* e 16–128 $\mu\text{g/mL}$ para *Trichophyton mentagrophytes*. Quanto a ação fungicida, foi observada para as concentrações de 128–256 $\mu\text{g/mL}$, 128–1024 $\mu\text{g/mL}$ e 256–512 $\mu\text{g/mL}$ para as mesmas espécies, respectivamente (RUFATTO et al., 2017).

Acredita-se que a ação antifúngica do extrato de própolis vermelha se deve a alteração da permeabilidade da membrana dos fungos. No entanto, mais

pesquisas são necessárias para determinar o mecanismo exato de ação desse composto (FREIRES; ALENCAR; ROSALEN, 2016).

3.3.3 *Atividade antioxidante*

A ocorrência de diversas doenças como câncer, diabetes, inflamações, osteoporose, doenças neurológicas e cardiovasculares, entre outras, vem sendo relacionadas ao aumento nos níveis de radicais livres no organismo. Recentemente, estudos de diferentes fontes vegetais tem demonstrado a capacidade antioxidantes de compostos fenólicos, dentre eles os flavonoides, e sua relação com a melhora de diferentes enfermidades. Uma vez que a própolis já foi identificada como uma importante fonte desses compostos, os estudos da propriedade antioxidante da própolis vêm sendo muito explorada nas últimas décadas afim de investigar sua possível, e benéfica, interação com radicais livres no corpo (RUFATTO et al., 2017).

Em seu estudo com própolis vermelha, Alencar et al. (2007) observaram que a fração de extrato obtida utilizando hexano como solvente demonstrou os melhores resultados como sequestrante do radical livre 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH). Cabral et al. (2009) também obtiveram como melhor tratamento a fração extraída com hexano, que apresentou alta atividade antioxidante (74,4%) como sequestrante de DPPH.

Estudos também demonstraram satisfatória ação antioxidante de extratos de própolis vermelha extraídos utilizando-se etanol (SILVA FROZZA et al., 2013), metanol (RIGHI et al., 2011) e clorofórmio (OLDONI et al., 2011). Trusheva et al. (2006) também observaram significativa atividade antioxidante de uma mistura de benzofenonas preniladas, extraídas da própolis vermelha, contra o radical livre DPPH.

Como apresentado, os resultados dos mais variados estudos demonstram que a própolis vermelha possui diversos compostos com atividades antioxidantes que podem proteger as células contra o estresse oxidativo. Esses resultados abrem um leque de possibilidades de aplicação da própolis vermelha em formulações alimentícias, tanto como ingrediente funcional quanto como antioxidante natural.

3.3.4 Outras atividades biológicas

Extrato de própolis vermelha demonstrou, em ensaios “in vitro”, atividade citotóxica contra células de cânceres como carcinomas e adenocarcinomas (OLIVIERI et al., 2014), leucemia e mieloma (NOVAK et al., 2014), câncer de próstata (MORAES et al., 2010) e de bexiga (BEGNINI et al., 2014). Em ensaios “in vivo”, os extratos etanólicos e metanoicos de própolis vermelha também demonstraram diminuição do crescimento de melanoma em ratos (NOVAK et al., 2014).

Estudos com a própolis vermelha de Alagoas mostraram que a administração subcutânea de 10 mg/Kg de neovestitol e vestitol acarretaram em significativa diminuição na migração de neutrófilos e, conseqüentemente, na diminuição do processo inflamatório induzido na cavidade peritoneal de camundongos (BUENO-SILVA et al., 2013). Cavendish et al. (2015) observaram que o extrato hidroalcoólico de própolis vermelha (10-30 mg/Kg) associado a formononetina (10 mg/Kg) reduziu as contrações abdominais e o impulso de lambe em roedores, evidenciando a diminuição da dor inflamatória nos animais.

Quando incorporados em filmes a base de colágeno, o extrato hidroalcoólico de própolis vermelha também demonstrou potencial na reparação de tecidos danificados e na cicatrização de feridas como observado por Almeida et al. (2013) no tratamento de queimaduras na pele de roedores.

Em estudos recentes o extrato de própolis vermelha também apresentou diminuição na hipertensão e no dano renal (TELES et al., 2015), atividade antidiabética (IIO et al., 2010) e capacidade de redução dos níveis de colesterol LDL (conhecido como “colesterol ruim”) de roedores testados (IIO et al., 2012).

Todos os estudos descritos demonstram as diversas atividades biológicas e evidenciam o enorme potencial de aplicação da própolis vermelha. Por ser de matriz extremamente complexa, rica em compostos bioativos e por ter sido descoberta relativamente a pouco tempo, faz-se necessário mais estudos sobre suas aplicações para que os benefícios já apresentados pela própolis possam ser aproveitados diretamente na melhora da saúde humana.

3.4 Compostos fenólicos

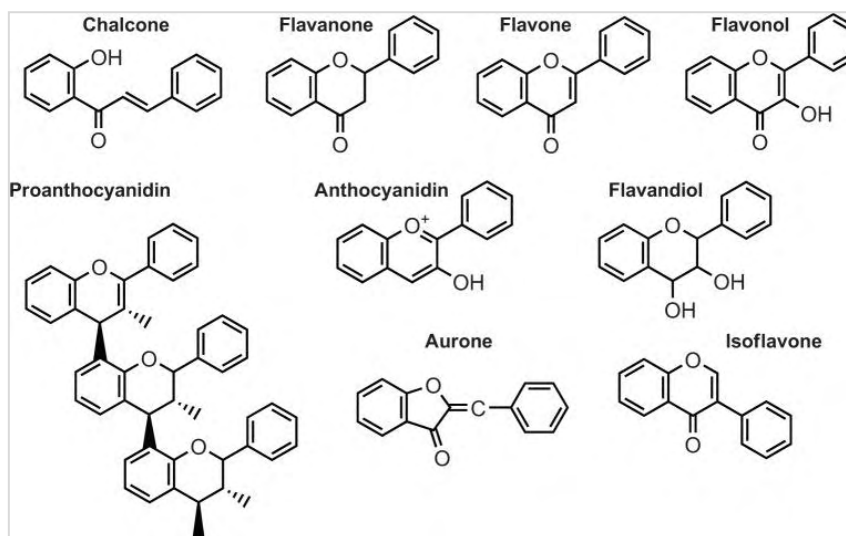
Os compostos fenólicos são um grupo de substâncias que possuem como característica comum o fato de apresentarem um anel aromático contendo uma ou mais hidroxilas diretamente ligadas ao anel e são substâncias muito abundantes na natureza, tendo mais de 8000 compostos detectados em plantas. Esse complexo grupo é formado por substâncias provenientes do metabolismo secundário (que é responsável pela defesa contra agressores externos) de vegetais e na indústria costumam ser utilizados como pigmentos em diferentes formulações de alimentos (SILVA et al., 2010).

Sendo um grupo tão complexo, os compostos fenólicos envolvem desde moléculas simples até macromoléculas e podem ser encontrados na forma livre ou ligados a açúcares e proteínas dos tecidos vegetais. Podem ser classificados como compostos de menor ocorrência na natureza, como os óleos essenciais e os taninos, responsáveis por alguns aromas e pela sensação de adstringência de alguns alimentos “in natura”, ou como compostos de maior ocorrência como os ácidos fenólicos e os flavonoides (SOARES, 2002).

3.5 Flavonoides

Os flavonoides são compostos naturais heterocíclicos com oxigênio na molécula e representam um importante subgrupo de compostos fenólicos. Possuem estrutura básica de esqueleto carbônico C₆C₃C₆, sendo dois anéis aromáticos entre três carbonos (RIBEIRO; SERAVALLI, 2004).

O subgrupo inclui antocianinas, flavanona, flavononóis, proantocianidina (Figura 1) e mais cinco classes de compostos que não seguem a estrutura básica, mas que são quimicamente relacionados. Essas cinco classes são as chalconas, di-hidrochalconas, isoflavonas, neoflavonas e auronas e diferem entre si pelo grau de oxidação das moléculas (DAMODARAN, S.; PARKIN, K.L.; FENNEMA, 2010).

Figura 1 - Estrutura de alguns flavonoides importantes

Fonte: (FALCONE FERREYRA et al., 2012)

Os flavonoides são encontrados em grãos, frutas, folhas, flores e raízes e, juntamente com outros compostos, costumam ser responsáveis pelas cores atrativas dos vegetais. Esse grupo apresenta diversas propriedades antioxidantes, bactericidas e fungicidas além de outras atividades biológicas que vem despertando o interesse de pesquisadores ao redor do mundo (PIETTA, 2000).

Devido ao recente interesse do consumidor por alimentos com propriedades funcionais, diversos esforços vêm sendo realizados na busca por compostos bioativos oriundos de fontes naturais. Uma das fontes estudadas que mais se destacou nas últimas décadas devido as diversas atividades biológicas relacionadas e que tem grande potencial de aplicação na indústria de alimentos é a própolis (SILVA et al., 2013).

3.6 Microencapsulação

3.6.1 Aspectos gerais

Encapsulação é um processo no qual uma substância é recoberta por outro material com o objetivo principal de evitar seu contato com agentes externos. A ideia de proteger um composto de interesse recobrando-o com um material protetor pode ter surgido ao observar-se diversos componentes da natureza como membranas e parede celular em células vegetais, casca de ovos, frutas e sementes, entre outros. A encapsulação também pode ser chamada de

microencapsulação ou nanoencapsulação dependendo do tamanho das partículas geradas (BALASSA; FANGER; WURZBURG, 1971; GIBBS et al., 1999).

No processo, a substância encapsulada pode ser sólida, líquida ou gasosa e é denominada núcleo, recheio, composto bioativo ou fase interna. Já o encapsulante é denominado de material de parede, coadjuvante, membrana, veículo, transportador, fase externa ou concha. Tanto o núcleo quanto o material de parede podem ser formados por uma única substância ou por uma combinação de compostos. A morfologia, estrutura e tamanho das partículas depende dos métodos e dos materiais empregados na sua produção (GIBBS et al., 1999; LEE; WONG, 2014).

O produto da microencapsulação pode ser classificado como micropartículas, podendo ser elas microcápsulas ou microesferas e podem ter tamanho que variam de 1 a 1000 μm dependendo da técnica, da substância do núcleo e do material de parede empregado (DIAS; FERREIRA; BARREIRO, 2015; TOLVE et al., 2016).

A estrutura pode ser de uma cápsula simples, chamada de reservatório, onde um único núcleo fica envolto por uma camada de encapsulante. O composto ativo pode estar distribuído em todo o volume da partícula, inclusive na superfície, tem-se partículas do tipo matriz. O recheio pode apresentar um ou vários núcleos e as partículas podem ser esféricas ou irregulares. Algumas estruturas são demonstradas na Figura 2.

Figura 2 - Principais morfologias de partículas obtidas em processos de microencapsulação



Fonte: Modificado de Gharsallaoui et al. (2007).

A técnica de microencapsulação vem sendo explorada pelas indústrias têxteis, cosméticas, eletrônicas, biomédicas, de agricultura, farmacêuticas, de alimentos, dentre outras. Na indústria de alimentos a técnica vem sendo utilizada

na encapsulação de aromas, vitaminas, conservantes, condimentos e microrganismos (GIBBS et al., 1999; PAULO; SANTOS, 2017).

Os materiais utilizados como encapsulante devem ser seguros para o consumo, ser biodegradáveis, eficientes na barreira de proteção, não reagir com o núcleo nem com o meio externo, ser atóxico e, preferencialmente, de baixo custo (DIAS; FERREIRA; BARREIRO, 2015; YE; GEORGES; SELOMULYA, 2018).

Os principais materiais utilizados como material de parede na indústria de alimentos são polímeros hidrossolúveis (gomas, quitosana, pectina, polietilenoglicol, proteínas de soja e do soro de leite), materiais hidrossolúveis não poliméricos (ciclodextrina, maltodextrina, inulina, lactose), polímeros não solúveis em água (amido, caseína), sacarose, lecitina, ácido esteárico, entre outros. O material deve ser escolhido com base no método de encapsulação utilizado, natureza do composto a ser protegido e funcionalidade da aplicação final (PARAMERA; KONTELES; KARATHANOS, 2011; DIAS; FERREIRA; BARREIRO, 2015).

Os métodos de microencapsulação podem ser classificados em métodos físicos, químicos e físico-químicos. Dentre os métodos físicos temos a extrusão, bocal submerso, bocal vibrante, *spray drying*, disco rotativo, *pan coating*, suspensão por ar, *spray chilling*, leite fluidizado, co-cristalização e liofilização. Dentre os métodos químicos destacam-se a polimerização interfacial, inclusão molecular, gelificação iônica, polimerização *in situ*. Por fim, dentre os métodos físico-químicos estão a coacervação simples, coacervação complexa, lipossomas, lipoesferas e evaporação de solvente (FAVARO-TRINDADE; PINHO, 2008; CASTRO-ROSAS et al., 2017).

A microencapsulação é frequentemente utilizada com o objetivo de proteger o composto bioativo, mas também pode ser utilizada para facilitar a dispersão de substâncias imiscíveis, facilitar o processo de secagem ao reduzir a temperatura de transição vítrea em alguns produtos, minimizar sabores e odores indesejados, aumentar *shelf-life* ao proteger ingredientes contra agentes agressores ou, ainda, promover liberação controlada do agente encapsulado durante a estocagem ou a passagem pelo trato gastrointestinal (GIBBS et al., 1999; FAVARO-TRINDADE; PINHO, 2008; LEE; WONG, 2014).

Nas últimas décadas, foram relatados diversos trabalhos científicos envolvendo a microencapsulação de compostos como ácido ascórbico (COMUNIAN et al., 2013; SARTORI et al., 2015), curcumina (PARAMERA; KONTELES; KARATHANOS, 2011; ARIYARATHNA; KARUNARATNE, 2016), antocianinas (BETZ; KULOZIK, 2011), compostos fenólicos (BAKOWSKA-BARCZAK; KOLODZIEJCZYK, 2011; AIZPURUA-OLAIZOLA et al., 2016; VALLE CALOMENI et al., 2017; EVAGELIOU; PANAGOPOULOU; MANDALA, 2019; SILVA et al., 2019), flavonoides (TULINI et al., 2016; SOUZA et al., 2018; GHATAK; IYYASWAMI, 2019), carotenoides (GOMEZ-ESTACA et al., 2016, 2018; JANISZEWSKA-TURAK, 2017; PHAM-HOANG et al., 2018; URSACHE et al., 2018; ALEHOSSEINI et al., 2019a; TIRADO et al., 2019), óleos essenciais (FERNANDES et al., 2016; MATOS; SCOPEL; DETTMER, 2018), probióticos (BAMPI et al., 2016; GOMEZ-MASCARAQUE et al., 2016; SILVA et al., 2016, 2018a; ARSLAN-TONTUL; ERBAS, 2017; ALEHOSSEINI et al., 2019b; COLÍN-CRUZ et al., 2019; MATOS-JR et al., 2019), ômega-3 (COMUNIAN et al., 2016a, 2016b, 2017a, 2017b, 2018) dentre outros (PROCOPIO et al., 2018; SOUZA; GARCIA-ROJAS; FAVARO-TRINDADE, 2018).

A escolha da técnica de microencapsulação deve atender a diversos parâmetros como a reprodutibilidade do processo, custo mínimo, qualidade da micropartícula formada, rendimento, alta eficiência de encapsulação e pouca aderência ou agregação das partículas formadas (KUANG et al., 2010).

3.6.2 *Spray drying*

A técnica de *spray drying*, é uma das mais utilizadas como método de encapsulação, principalmente devido à disponibilidade do equipamento, ao baixo custo de processo, possibilidade de utilização de ampla gama de materiais coadjuvante e boa estabilidade final do produto além de se tratar de um método rápido, simples e de comum aplicação em escalas maiores de produção (FAVARO-TRINDADE et al., 2010; ARPAGAUS et al., 2018).

O princípio de secagem por atomização foi inicialmente observado por volta de 1860 e em 1872 foi protocolada a primeira patente de um equipamento *spray dryer* rudimentar. Os primeiros equipamentos construídos apresentavam grandes problemas de eficiência e segurança do processo, mas em poucas décadas esses problemas foram contornados e a secagem por *spray drying*

passou a ser amplamente utilizada na indústria de alimentos, principalmente na produção de leite em pó, a partir da década de 1920 (SANTOS et al., 2017).

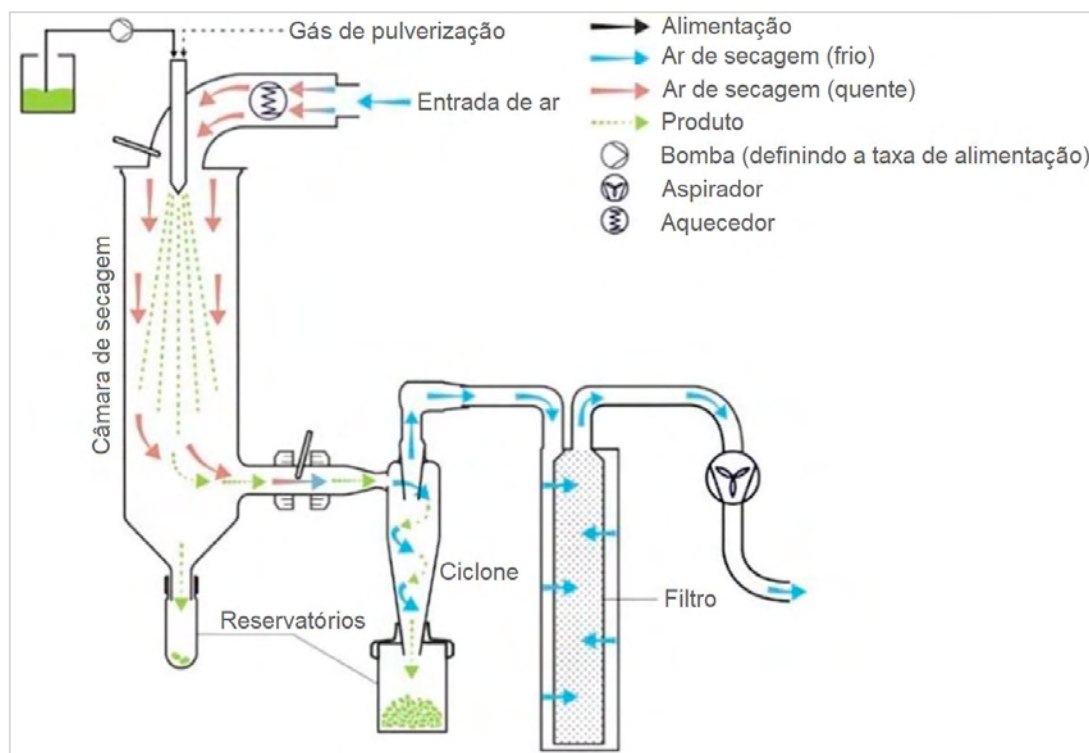
Desde então, a secagem por *spray drying* tem sido amplamente utilizada na indústria alimentícia para a elaboração de produtos em pó, principalmente leite e sucos, para a encapsulação de ingredientes, aditivos e de compostos bioativos. A microencapsulação por *spray drying* oferece diversas vantagens como a obtenção de sólidos a partir de líquidos o que facilita o manuseio, reduz custos de transporte, aumenta a estabilidade frente às condições de processamento e armazenamento de ingredientes (SHAHIDI; HAN, 1993; LEE; WONG, 2014; ASSADPOUR; JAFARI, 2019).

O método de microencapsulação baseia-se na secagem de uma mistura contendo o material de interesse e o encapsulante, pelo emprego de temperaturas elevadas. O processo é realizado em um equipamento chamado *spray dryer* (Figura 3) que é composto por um reservatório e uma bomba de alimentação, um atomizador, um aquecedor, uma câmara de secagem, um ciclone, um exaustor e um filtro para o gás de secagem (ASSADPOUR; JAFARI, 2019).

Inicialmente a solução, contendo o material de interesse e o coadjuvante, é alimentada no equipamento pela bomba. Em seguida passa pelo atomizador, que pode ser do tipo de discos centrífugos ou bocal, responsável por produzir gotículas da dispersão dentro da câmara de secagem, que possui amplo volume. Simultaneamente, o gás de secagem, que pode ser o ar ou um gás inerte, em alta temperatura é injetado na câmara, em fluxo que pode ser concorrente ou contracorrente ao fluido atomizado. A troca de calor com o gás aquecido, usualmente a temperaturas maiores que 100°C, faz com que o solvente presente nas gotículas evapore instantaneamente. A eficiência do processo se deve a grande superfície de contato entre as gotículas atomizadas e o ar de secagem, o que aumenta a transferência de calor e massa, acelerando a evaporação do solvente. O curto tempo de exposição a temperaturas elevadas permite a aplicação do processo de *spray drying* em substâncias termossensíveis. As partículas secas são arrastadas pela corrente de ar até um ciclone, onde podem ser coletadas, enquanto que o gás quente é eliminado pelo exaustor. Tipicamente, as partículas possuem diâmetros entre 10 e 100 µm, dependendo das condições de secagem e das características do fluido atomizado costumam

apresentar morfologia esférica e superfície porosa, resultado da abrupta saída de vapor d'água do interior das gotículas (BALASSA; FANGER; WURZBURG, 1971; FANG; BHANDARI, 2017).

Figura 3 - Diagrama de um *spray dryer* com fluxo concorrente



Fonte: (ARPAGAUS et al., 2018)

As variáveis operacionais em um processo de *spray drying* são a temperatura de entrada, a temperatura de saída e a vazão do ar de secagem, a vazão de alimentação e a pressão no atomizador. Mudanças nessas condições influenciam as características e propriedades das partículas obtidas, além de afetarem o rendimento de processo, a retenção do material encapsulado e a eficiência de encapsulação (ASSADPOUR; JAFARI, 2019).

Estudos demonstraram que temperaturas de secagem mais elevadas produzem partículas com teores de umidade menores, baixas atividades de água e alta perda de compostos bioativos como β -caroteno e vitamina C (ROSENBERG; TALMON; KOPELMAN, 1988; KHA; NGUYEN; ROACH, 2010; SELVAMUTHUKUMARAN; KHANUM, 2014; DAZA et al., 2016; KHALILIAN MOVAHHED; MOHEBBI, 2016).

Além das variáveis do equipamento, as características da solução atomizadas, como teor de sólidos, viscosidade, temperatura, tipos de

carreadores utilizados e proporções entre núcleo e coadjuvante, também têm efeitos pronunciados sobre as características das partículas obtidas. Rosenberg, Talmon e Kopelman (1988) estudaram a influência do teor de sólidos da alimentação nas características da partícula obtida e observaram que o aumento na viscosidade da emulsão causou o aumento no diâmetro médio de partículas contendo octanoato de etila e goma arábica. Estudando a relação entre os tipos de materiais de parede empregados e as características das partículas obtidas, Ramakrishnan et al. (2018) observaram que a goma arábica produziu partículas mais úmidas, mais higroscópicas e com maior atividade de água enquanto que a utilização de maltodextrina, amido modificado e maltodextrina resistente retornaram maiores eficiências de encapsulação, em termos de antocianinas e carotenoides presentes no suco de tamarilho.

Quanto a escolha do coadjuvante adequado, é de grande importância que o material possua características como ser solúvel em água, que frequentemente é o solvente usado no preparo das soluções; ser de grau alimentício (caso a aplicação seja nessa área); apresentar baixa viscosidade em altas concentrações; ser compatível com o composto encapsulado; ter a capacidade de formar um filme ou uma matriz para contenção da fase interna; não apresentar reatividade junto ao núcleo; ter propriedade emulsificante; se possível, apresentar baixo custo; oferecer barreira em caso de encapsulados voláteis e permitir a liberação gradual do composto bioativo. Para atender tais exigências, muitas vezes, torna-se necessário realizar combinações de dois ou mais materiais, obtendo carreadores que somam suas vantagens. Os materiais de parede utilizados para a produção de micropartículas por *spray drying* costumam ser polímeros de origem natural, como carboidratos (amidos nativos e modificados, xarope de milho, maltodextrina), proteínas (caseinato de sódio, gelatina, proteínas isoladas ou concentradas de soro de leite e de soja) e gomas (ágar, carragena, arábica, tragacanto) (BALASSA; FANGER; WURZBURG, 1971; GHARSALLAOUI et al., 2007; LEE; WONG, 2014).

Na encapsulação de substâncias hidrofóbicas é necessário o emprego de carreadores com propriedades emulsificantes. Dentre eles, a goma arábica (goma acácia), é uma das mais difundida em estudos voltados para a área de alimentos. Sua estrutura é composta de unidades de ácido D-glucurônico, L-ramnose, D-galactose, L-arabinose, além de uma pequena fração proteica (2-

5%), a qual é atribuída sua capacidade de emulsificação. Comparada a outras gomas, ela forma soluções com viscosidades relativamente baixas, sendo esse o motivo que possibilita sua aplicação em processos de *spray drying* (SHAHIDI; HAN, 1993; GHARSALLAOUI et al., 2007).

Recentemente, estudos compararam as características de partículas produzidas com goma arábica e outros materiais encapsulantes. Tupuna et al. (2018) verificaram que o uso da goma pura resultou em maior eficiência de encapsulação da norbixina (50%), em comparação aos processos em que foram utilizados maltodextrina pura (22%) ou misturas de ambas em diferentes proporções (24-35%). Resultados similares foram obtidos por Álvarez-Henao et al. (2018), no qual luteína encapsulada com goma arábica atingiu cerca de 92% de eficiência de encapsulação, enquanto que o uso de amido modificado e maltodextrina como carreadores resultou em 2 e 6%, respectivamente. No entanto, o tratamento que apresentou o melhor resultado foi a combinação dos três materiais em proporções iguais, conferindo maior estabilidade à luteína após um período de estocagem de 20 dias, a 40 °C e 75% de umidade relativa.

Nos últimos anos, o método *spray drying* tem sido utilizado para encapsular diferentes fontes de compostos bioativos como o probiótico *Lactobacillus acidophilus* (SLAVUTSKY et al., 2017); proantocianidinas obtido do extrato da canela (OSTROSCHI et al., 2018); polifenóis do extrato do fruto cagaita (DAZA et al., 2016, 2017), fenólicos do extrato das cascas e sementes da jabuticaba (BALDIN et al., 2016, 2018), ácido ascórbico e polifenóis obtidos da polpa do fruto camu-camu (FUJITA et al., 2017), a bacteriocina nisina (MARTINEZ et al., 2016); antocianinas (SOUZA et al., 2015). Comunian et al. (2019) verificaram que o uso dessa técnica de encapsulação proporcionou maior estabilidade oxidativa ao óleo de echium, rico em ômega-3, aumentando o tempo de indução necessário para oxidação em pelo menos 48%, em comparação ao óleo puro.

Estudos recentes também descrevem a aplicação do *spray drying* na encapsulação de extratos de própolis de diferentes fontes. Souza et al. (2007) utilizaram a técnica de *spray drying* para secar extrato de própolis verde e observaram que a atividade antioxidante das partículas obtidas era influenciada pela vazão de alimentação e temperatura do ar de secagem, sendo que quanto maior a temperatura de secagem, menor a atividade antioxidante das partículas.

Marquele et al. (2006) estudaram a influência da temperatura de secagem de extrato de própolis verde. Os autores também notaram que o conteúdo de polifenóis e flavonoides nas partículas era dependente da temperatura do ar de secagem. Em ambos os estudos foi identificado que a atividade antioxidante das partículas após a secagem não diferia significativamente (5%) da atividade antioxidante do extrato.

Busch et al. (2017) encapsularam extrato alcoólico de própolis por *spray drying* utilizando diferentes materiais de parede como goma arábica, maltodextrina e goma galactomanana. Os autores concluíram que foi possível obter partículas livre de álcool com baixas umidades e atividade de água e que a combinação entre goma arábica e goma galactomanana foi a mais eficaz na preservação dos polifenóis presentes na própolis. Bruschi et al. (2003), utilizando gelatina como material de parede, produziram partículas de própolis por *spray drying* e avaliaram sua atividade contra *S. aureus*. Os autores concluíram que foi possível obter partículas com ação antibacteriana contra o microrganismo estudado e ainda sem o sabor, odor e a presença de álcool, comum ao extrato, o que permitiria sua utilização em formulações farmacêuticas ou alimentícias. Dota et al. (2011) também obtiveram resultados significativos ao utilizar micropartículas de própolis encapsulada com gelatina no combate a fungos do gênero *Vulvovaginal Candidiasis*.

Silva et al. (2011) estudou a estabilidade e a atividade antioxidante de extrato de própolis não microencapsulado, ou seja apenas seco por *spray drying* (sem material de parede) e, apesar de conseguir obter partículas livre de álcool, com boa estabilidade durante o armazenamento por 120 dias e sem alteração significativa no potencial antioxidante, também ficou evidenciado perdas significativas no teor de fenólicos totais (30%) das partículas obtidas que, dependendo da aplicação, poderia inviabilizar o processo. Em um estudo subsequente, Silva et al. (2013) estudou a utilização de goma arábica e amido modificado com OAS (Octenil Anidrido Succínico) na microencapsulação de extrato de própolis. Os autores concluíram que a utilização de goma arábica na proporção 1:6 (extrato:goma) já permitiu a obtenção de um pó com baixa higroscopicidade, alta dispersibilidade em água, estável ao armazenamento em temperatura ambiente e que manteve as propriedades antioxidantes originais da própolis.

Em estudo recente, Andrade et al. (2018) utilizaram a técnica de *spray drying* para obter extrato de própolis verde, marrom e vermelha em pó utilizando maltodextrina e goma arábica como carreador. O estudo mostrou que o processo resultou em alta eficiência de microencapsulação (70-79%) independente do material de parede utilizado e que produz partículas esféricas e de superfícies lisas. Além disso, os autores também observaram que as própolis verde e vermelha apresentavam alta concentração de compostos fenólicos, flavonoides e atividade antioxidante e que a encapsulação garantiu uma boa retenção dos compostos fenólicos e das atividades antioxidantes nas partículas.

Apesar dos benefícios, a técnica de *spray drying* também apresenta desvantagens como o número limitado de materiais passíveis de serem usados como encapsulantes ou carreadores, além de ocasionar degradação de substâncias sensíveis devido ao aquecimento. Por mais que, em condições adequadas, o curto tempo de exposição a temperaturas elevadas não deva causar o superaquecimento do núcleo, garantindo a preservação de suas características, quando compostos muito termolábeis são encapsulados ou o tempo de residência no equipamento for muito longo, podem ocorrer perdas nutricionais e de propriedades bioativas. No caso da encapsulação de compostos sensíveis a oxidação, o uso de ar como agente de secagem pode favorecer a ocorrência dessas reações, o que pode ser evitado pela substituição do ar de secagem por um gás inerte. A formação de partículas ocas e porosas, além da deposição de parte do recheio na superfície, também podem aumentar a exposição do composto a fatores que promovem sua degradação (BALASSA; FANGER; WURZBURG, 1971; DESAI; PARK, 2005; ASSADPOUR; JAFARI, 2019).

3.6.3 *Spray chilling*

O processo de *spray chilling* também é um processo físico de microencapsulação, essa técnica se assemelha ao *spray drying*, podendo ser utilizado inclusive o mesmo equipamento para sua realização.

A diferença entre as técnicas é o princípio de formação de partículas no qual se baseiam. Enquanto que no *spray drying* o aquecimento promove transferências de calor e de massa, com evaporação da água e secagem das

gotículas, no *spray chilling* a transferência de massa não ocorre em quantidade significativa.

Nesse método, a dispersão contendo o ativo e o encapsulante são atomizadas na câmara de secagem juntamente com ar frio, normalmente abaixo de 15° C, que também pode estar em fluxo concorrente ou contracorrente, e não com ar quente como no processo de *spray drying*. A remoção de calor faz com que o material de parede solidifique ao redor da fase interna, resultando em partículas esféricas com o composto bioativo distribuído por todo seu volume. Para que isso ocorra, o encapsulante deve ser um material lipídico com temperatura de fusão acima da temperatura do gás com o qual realizará a troca térmica (ZUIDAM; SHIMONI, 2010; OKURO; MATOS; FAVARO-TRINDADE, 2013).

Primeiramente, o coadjuvante lipídico deve ser fundido e emulsionado/disperso com ingrediente ativo. Caso o composto seja hidrofílico pode ser necessário a adição de surfactantes como, por exemplo, a lecitina de soja, resultando em uma emulsão estável (OKURO; MATOS; FAVARO-TRINDADE, 2013). Materiais de parede comumente usados para encapsular bioativos por esse método incluem ceras, ácidos graxos, triglicerídeos, álcoois, gorduras vegetais fracionadas ou hidrogenadas, com pontos de fusão entre 32 e 42 °C, os quais devem possuir grau alimentício, dependendo da aplicação (SHAHIDI; HAN, 1993; TOLVE et al., 2016). Estudos recentes utilizaram como encapsulantes parafinas, cera de candelila, octacosano (YIN; CADWALLADER, 2018), ácido esteárico, gordura vegetal hidrogenada (ALVIM et al., 2016), manteiga de cacau (PEDROSO et al., 2013), gordura de palma interesterificada (PEDROSO et al., 2012), dentre outros.

Devido às características dos carreadores, a liberação do agente encapsulado pode ser regulada através do controle da temperatura a que são expostas. Outros mecanismos de liberação estão relacionados à presença de enzimas lipases, no sistema digestivo, e ao rompimento mecânico das partículas (SHAHIDI; HAN, 1993; OKURO; MATOS; FAVARO-TRINDADE, 2013).

As micropartículas lipídicas sólidas produzidas por essa técnica apresentam morfologia esférica, estrutura do tipo matriz, que também confere a elas a denominação de microesferas, com tamanhos tipicamente entre 20 e 200 µm, além de serem sólidas e densas (TOLVE et al., 2016).

As condições de operação que podem variar em um processo *spray chilling* são a temperatura da mistura ou emulsão, que depende da temperatura de fusão do carreador escolhido, a temperatura da câmara e do gás de troca térmica, a vazão de ar frio e a vazão de alimentação do líquido. Esses parâmetros, juntamente com as características do encapsulante fundido, têm grande influência sobre o rendimento do processo, a eficiência de encapsulação, e as características das partículas, como morfologia e tamanho. Caso a temperatura da câmara ou do ar não estiver baixa o suficiente, a transferência de calor é comprometida, levando à aglomeração das gotículas e a reduções na eficiência de encapsulação e no rendimento do processo. Por outro lado, se a viscosidade do líquido fundido for muito elevada a atomização é dificultada, resultando em gotículas e, conseqüentemente, partículas de diâmetros maiores (ILIC et al., 2009; ZUIDAM; SHIMONI, 2010; OKURO; MATOS; FAVARO-TRINDADE, 2013).

Além dos benefícios da técnica de *spray drying*, a encapsulação por *spray chilling* também é vantajosa devido ao menor custo energético; à superfície contínua e não-porosa das partículas, que confere maior proteção ao recheio; ao emprego de temperaturas baixas, o que evita a degradação de substâncias termolábeis (ILIC et al., 2009; OKURO; MATOS; FAVARO-TRINDADE, 2013).

Pesquisas desenvolvidas nos últimos anos relatam o emprego do método *spray chilling* na encapsulação de substâncias bioativas puras ou contidas em extratos, como o ácido ascórbico (MATOS et al., 2015; MATOS-JR et al., 2015, 2017; SARTORI et al., 2015; CARVALHO et al., 2019); o extrato de canela, rico em proantocianidinas (PAUCAR et al., 2016; TULINI et al., 2016); probióticos, como o *Lactobacillus acidophilus* e o *Bifidobacterium animalis subsp. lactis* (BAMPI et al., 2016; SILVA et al., 2018b); a vitamina D3 (PAUCAR et al., 2016); o complexo contendo cloreto de zinco e o aroma 2-acetil-1-pirrolina (YIN; CADWALLADER, 2018); o extrato de alho selvagem (*Allium ursinum* L.), rico nos bioativos alicina e S-metil metanotiosulfonato (TOMŠIK et al., 2019); e o ácido gálico (ORIANI et al., 2016). Silva et al. (2019) verificaram que a encapsulação do extrato da semente do guaraná (*Paullinia cupana*) por *spray chilling*, com gordura vegetal como encapsulante, resultou em uma retenção máxima dos compostos fenólicos de 83%, ao fim de 90 dias de estocagem a 25°C. Além disso, em condições de digestão simulada, cerca de 99% dos fenólicos

presentes nas partículas foram liberados após 6 h, enquanto que no mesmo período apenas 24% dos bioativos foram liberados do extrato puro, indicando a degradação destes diante das condições do sistema digestivo e a eficiência do processo de encapsulação em protegê-los.

Apesar de ser mais frequentemente empregada a substâncias hidrofílicas, estudos recentes evidenciam a aplicação do *spray chilling* para a encapsulação de materiais lipídicos contendo compostos bioativos, como a oleoresina de gengibre (ORIANI et al., 2016); a oleoresina de canela (PROCOPIO et al., 2018); e uma dispersão de licopeno em óleo de girassol (10%) (PELLISSARI et al., 2016). Em estudo de Oriani et al. (2018), foi demonstrado que a encapsulação da oleoresina de gengibre por *spray chilling*, utilizando materiais de parede adequados (75% de ácido esteárico e 15% de ácido oleico), aumentou a estabilidade de seus bioativos, sendo a degradação dos voláteis α -zingibereno e β -sesquifelandremo a ar-curcumeno reduzida, e sua retenção aumentada (27 e 30%, respectivamente) em comparação à oleoresina pura (6 e 17%, respectivamente), ao fim de 84 dias de estocagem a 25°C.

Não foram encontrados trabalhos sobre microencapsulação de própolis vermelha por *spray chilling*.

Mesmo oferecendo diversas vantagens, limitações dessa técnica incluem a natureza hidrofóbica das partículas obtidas, já que na maioria dos casos são utilizados carreadores lipídicos nesse processo, o que pode dificultar a aplicação em alimentos de baixa viscosidade; a deposição de parte do recheio na superfície das partículas, o que reduz a eficiência de encapsulação e expõe essa fração a condições degradantes; a possibilidade de o material encapsulado ser expulso das partículas durante a estocagem, antes do tempo esperado para sua liberação; a degradação do material lipídico usado como coadjuvante, comprometendo a estabilidade do ingrediente ativo; e a cristalização do encapsulante em formas polimórficas instáveis, resultando em pouca ou nenhuma proteção do recheio (BALASSA; FANGER; WURZBURG, 1971; OKURO; MATOS; FAVARO-TRINDADE, 2013; TOLVE et al., 2016).

3.6.4 Combinação de técnicas de microencapsulação

Levando em conta as desvantagens características que cada método de encapsulação invariavelmente possui, autores já haviam sugerido, décadas

atrás, que a combinação de diferentes processos seria uma maneira de agregar os benefícios e superar as limitações de ambos (BALASSA; FANGER; WURZBURG, 1971; SHAHIDI; HAN, 1993). Como exemplo, em 1958, Rosenberg e Hills descreveram um processo no qual vitamina A era seca por *spray drying* e em seguida encapsulada por *spray chilling*, a fim de garantir sua proteção contra agentes pró-oxidantes.

Recentemente, Fadini et al. (2018) encapsularam óleo de peixe, rico em ômega-3, através da combinação das técnicas *spray drying* e *spray chilling*. Seus resultados demonstraram que o recobrimento duplo foi capaz de mascarar o aroma e sabor desagradáveis do óleo, enquanto que nas partículas produzidas somente por *spray drying* o *off-flavor* foi percebido. Os resultados deste estudo demonstram que o uso combinado de diferentes métodos de encapsulação, no caso *spray chilling* e *spray drying*, é uma abordagem promissora, capaz de solucionar dificuldades e limitações observadas ainda nos dias de hoje para encapsular ingredientes alimentícios e compostos bioativos, devendo, assim, ser estudada de forma mais aprofundada.

Não foram encontrados estudos onde a combinação de diferentes técnicas de microencapsulação foi aplicada a própolis vermelha.

4 MATERIAIS

A própolis utilizada foi fornecida por apicultores da cidade de Maceió (9°40'S, 35°41'O), Alagoas, localidade da maior produção de própolis vermelha do país. Como coadjuvante ou agente carreador para obtenção das partículas no *spray dryer* foi utilizado goma arábica (Nexira, São Paulo, Brasil). Como coadjuvante para obtenção das partículas por *spray chilling* foi utilizada gordura vegetal composta por óleo de algodão hidrogenado, soja e óleo de palma (Tri-HS-48), com ponto de fusão de 48 °C, cedida pela Triângulo Alimentos (Itápolis –SP). As composições dos materiais de parede utilizados foram determinados em trabalhos anteriores de nosso grupo de pesquisa e estão presentes na Tabela 1.

Tabela 1 - Composição dos materiais de parede utilizados

Composição da gordura vegetal (g/100 g)		Composição da goma arábica (g/100 g)	
Ác. Láurico (C12:0)	0,46	Proteína	0,99
Ác. Mirístico (C14:0)	0,83	Ramnose	4,00
Ác. Palmítico (C16:0)	30,90	Arabinose	46,00
Ác. Esteárico (C18:0)	35,00	Galactose	38,00
Ác. Oleico (C18:1)	28,00	Ác. Glucurônico	6,50
Ác. Linoleico (C18:2)	4,70		
Ác. Eicosatrienoico (C20:3)	0,19		

Fonte: (COMUNIAN et al., 2016; PELISSARI et al., 2016)

5 MÉTODOS

5.1 OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO EXTRATO

5.1.1 Extrato etanólico de própolis vermelha (EEP)

O extrato etanólico foi obtido conforme Silva et al. (2013), com algumas modificações. Inicialmente triturou-se a própolis em liquidificador (modelo RI 1710, Walita, Philips, Brasil) para redução de tamanho e, conseqüentemente, maior superfície de contato com o solvente. Em seguida, adicionou-se 100 mL do solvente de extração (etanol a 80% v/v) à cada 30 g de própolis triturada, a mistura foi mantida aquecida a 50°C em banho maria (Ultra Cleaner 1400, Unique) e sob agitação constante, utilizando agitador mecânico (Marconi, modelo MA 085, Brasil), a 500 rpm por 30 minutos. Após o período, filtrou-se duplamente o extrato em papel de filtro (3 micras de porosidade), centrifugou-se a 25 °C e 4500 g por 10 minutos (Eppendorf, modelo 5810R) e o sobrenadante foi armazenado ao abrigo da luz para caracterização e posterior utilização na produção das partículas. O extrato etanólico de própolis vermelha obtido pelo processo descrito foi identificado pela sigla EEP.

Ensaio preliminares identificaram a necessidade de se concentrar o EEP para a microencapsulação por *spray chilling*. Essa necessidade surgiu porque, uma vez que no processo de *spray chilling* não ocorre evaporação significativa do solvente de extração, os tratamentos envolvendo esta técnica retornavam valores baixos de fenólicos e flavonoides, ficando próximos ao limite mínimo de detecção da técnica utilizada para quantificação. Dessa forma, a retirada parcial do etanol presente no extrato foi realizada por evaporação rotativa (TE-211, Tecnal, Piracicaba, Brasil) sob vácuo a 50 °C até 40% do volume inicial. O extrato etanólico de própolis vermelha concentrado será identificado pela sigla EPC.

5.1.2 Determinação do teor de umidade

A determinação do teor de umidade no EEP foi conduzida seguindo o procedimento de determinação de umidade por secagem direta, conforme descrito por Zenebon & Pascuet (2005). Inicialmente, cápsula de vidro previamente aquecida em estufa a 105 °C, por 24 horas, resfriado em dessecador até a temperatura ambiente foi pesada. Em seguida,

aproximadamente 1 g de extrato foi adicionado à capsula e levado a estufa a 105 °C até peso constante. O teor de umidade foi obtido pela razão entre a massa perdida e a massa inicial da amostra. A análise foi conduzida em triplicata e o resultado expresso em percentagem.

5.1.3 Determinação de fenólicos totais

Os compostos fenólicos totais no extrato e nas partículas foram determinados pelo método de Folin-Ciocalteu, descrito por Woisky e Salatino (1998), usando o ácido gálico como padrão. Inicialmente, 0,50 mL do extrato e 2,5 mL de reagente de Folin-Ciocalteu, diluído em água na proporção de 1:10, foram misturados e deixados em repouso por 5 min. Em seguida, 2 mL de Na₂CO₃ (4 g / 100 mL) foram então adicionados a mistura e deixados em repouso por 45 minutos na ausência de luz. A absorbância foi determinada por espectrofotometria (Thermo Scientific, Genesys 10S UV-Vis, EUA) a 740 nm e os resultados foram expressos em mg AGE / g sólidos.

5.1.4 Determinação de flavonoides totais

Para a determinação de flavonoides no extrato foi utilizado o método descrito por Park et al. (1998), com algumas modificações. Primeiramente, 0,20, 0,40, 0,80, 1,20, 1,60 e 2,40 mL da solução padrão de quercetina foram transmitidos para balões volumétricos de 5 mL. Em seguida, os balões foram completados com álcool etílico a 80%. Para a reação, 0,50 mL do extrato etanólico, 0,50 mL de cada solução padrão, 3,80 mL de álcool etílico a 80%, 0,1 mL de nitrato de alumínio 10% e 0,1 mL de acetato de potássio 1 M foram misturados em tubos de ensaio. Após 40 minutos no escuro, a absorbância das amostras foi determinada em 415 nm e os resultados foram expressos em mg quercetina / g sólidos. Álcool etílico a 80% foi utilizado como branco.

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

A determinação de formononetina foi realizada por 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 teve

fluxo de 0,8 ml/min, segundo Tomás-Barberán et al. (1993), modificado e foi 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), o gradiente em B teve início em 30%, de 0-25 min (rampa até 80%), em 25 min (30%), de 25-30 min (30%). A injeção da amostra foi de 5 µL com forno da coluna a 30°C. 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). Os resultados foram expressos em µg formononetina / g de sólidos.

5.1.6 Atividade antioxidante do extrato

5.1.6.1 Capacidade de redução do radical ABTS

A determinação da capacidade redutora do radical ABTS foi realizada segundo a metodologia proposta por Re et al. (1999). A partir do extrato obtido, tubos de ensaio foram preparados em triplicata. Em ambiente escuro, uma alíquota de 30 µL do extrato foi transferida para tubos de ensaio com 3,0 mL do radical ABTS e homogeneizados. A leitura foi realizada em espectrofotômetro (Biochrom Libra S22 - Cambridge, Inglaterra) a 734 nm após 6 minutos da mistura e o álcool etílico foi utilizado como branco, para calibrar o equipamento. O resultado está expresso em µmol trolox (TEq) / g de matéria seca.

5.1.6.2 Capacidade de redução de ferro (FRAP)

A capacidade de redução de ferro (FRAP) foi determinada de acordo com a metodologia proposta por Benzie e Strain (1996). A solução FRAP foi preparada com 250 mL de tampão acetato (300 mM, 1,6 % ácido acético, pH 3,6), 25 mL de solução de TPTZ (2,4,6-Tripiridil-S-Triazina, 10 mM, diluído em ácido clorídrico 40 mM) e 25 mL de cloreto férrico (20 mM). Alíquotas (0,1 mL) de diluições do extrato foram adicionadas em tubos de ensaio com 2,9 mL da solução FRAP. As soluções foram homogeneizadas (IKA, Vortex 1 V1, Alemanha) e mantidas a 37°C (Banho maria, Marconi, MA 159, Piracicaba, Brasil), por 30 minutos. Após este período, a absorbância das soluções foi determinada por espectrofotometria em 595 nm. A curva padrão foi realizada

com concentração de 0,40 a 5,0 mL de solução de FeSO₄ (2 mM). Os resultados estão expressos em μmol de FeSO₄ equivalente / g de matéria seca.

5.2 MICROENCAPSULAÇÃO

5.2.1 *Microencapsulação por spray drying*

As partículas foram obtidas conforme metodologia e parâmetros descritos por Silva et al. (2013), com ajustes que foram realizados em função de resultados obtidos em ensaios preliminares, utilizando-se goma arábica como coadjuvante. Inicialmente preparou-se a solução aquosa de goma arábica a 30% (m/m). Seguiu-se homogeneizando a solução de goma juntamente com o extrato de própolis vermelha (EEP) utilizando Ultra- turrax® IKA T25 (Labotechnic, Staufen, Germany) a 10.000 rpm por 1 minuto. O fluido de alimentação foi mantido em temperatura ambiente e sob agitação magnética constante e, então, atomizado em *spray dryer* (modelo MSD 1.0, Labmaq do Brasil Ltda, Ribeirão Preto, Brasil) utilizando as condições de operação mostradas no Quadro 1.

Quadro 1 – Condições de operação para obtenção das partículas por *spray drying*

Temperatura de entrada do ar	120 °C
Temperatura de saída do ar	90 °C
Velocidade do ar de secagem	2,50 m/s
Vazão de alimentação	10 mL/min
Vazão do ar de atomização	30 L/min
Diâmetro do atomizador	1,2 mm

Fonte: Autoria própria

5.2.2 *Microencapsulação por spray chilling*

As partículas foram obtidas conforme metodologia e parâmetros descritos por Pelissari et al. (2016), com ajustes que realizados em função de resultados obtidos em ensaios preliminares, utilizando-se gordura vegetal (ponto de fusão a 48°C) como coadjuvante. Inicialmente o extrato de própolis vermelha foi

disperso em gordura vegetal a 55 °C de acordo com a proporção proposta para cada tratamento. Em seguida a mistura foi homogeneizada (Ultra-Turrax T25; IKA, Germany) por 2 minutos a 10.000 rpm e utilizada na linha de alimentação do equipamento. As formulações foram atomizadas em *spray dryer* (model MSD 1.0, Labmaq, Brazil) e as condições de operação são descritas no Quadro 2.

Quadro 2 - Condições de operação para obtenção das partículas por *spray chilling*

Temperatura de entrada do ar	13 °C
Velocidade do ar de troca térmica	1,80 m/s
Vazão de alimentação	40 mL/min
Vazão do ar de atomização	40 L/min
Diâmetro do atomizador	1,2 mm

Fonte: Autoria própria

5.2.3 Combinação entre as técnicas

Parte das partículas obtidas por *spray drying* foram recobertas por *spray chilling* utilizando gordura vegetal como coadjuvante e seguindo os parâmetros descritos por Pelissari et al. (2016). Modificações nos parâmetros foram realizadas em função dos resultados obtidos em ensaios preliminares, uma vez que não há publicações disponíveis sobre a combinação destas técnicas para a microencapsulação de EEP. Inicialmente fundiu-se a gordura a 70 °C. Seguiu-se homogeneizando a gordura fundida com as partículas obtidas por *spray drying* utilizando Ultra-turrax® IKA T25 (Labotechnic, Staufen, Germany) a 10.000 rpm por 1 minuto. A dispersão foi atomizada em *spray dryer* (modelo MSD 1.0, Labmaq do Brasil Ltda, Ribeirão Preto, Brasil) utilizando as condições de operação descritas no item 5.2.2.

5.3 CARACTERIZAÇÃO DOS PÓS OBTIDOS

5.3.1 Teor de umidade e atividade de água

O teor de umidade dos pós obtidos foi determinado utilizando analisador de umidade (MB35 - Ohaus, Switzerland) através de radiação infravermelha. A

atividade de água foi determinada pelo equipamento AQUALAB (Decagon Devices, Pullman, WA).

5.3.2 Higroscopicidade

A higroscopicidade foi determinada, segundo o método proposto por Silva et al. (2013). Em cada análise, 2,0 g das amostras foram dispostas em placas de petri e posteriormente acondicionadas em dessecador, contendo solução saturada de Na₂SO₄ (81% UR). Após uma semana a 25 °C, as amostras foram pesadas e a higroscopicidade foi expressa como a gramas de água absorvida pela amostra/100 gramas de matéria seca.

5.3.3 Dispersibilidade em água

A dispersibilidade em água foi obtida pelo método gravimétrico de acordo com Silva et al. (2013), com algumas modificações. Aproximadamente 1 g de partícula foi adicionada em 100 mL de água e homogeneizada por 30 minutos a 100 rpm em mesa agitadora orbital tipo shaker (modelo TE-420, TECNAL, Piracicaba, Brasil). A suspensão foi centrifugada a 1500 g por 5 minutos. Posteriormente, uma alíquota de 25 mL do sobrenadante foi retirada e levada à estufa a 105°C, até peso constante. Procedimentos anteriores a secagem foram conduzidos em temperatura ambiente. A solubilidade foi calculada por diferença de peso e o resultado expresso em porcentagem.

5.3.4 Cor instrumental

Os parâmetros L*, a*, b* das amostras foram medidos no dia da produção das partículas e após 105 dias de armazenamento, a 25 °C em UR controlada de 32,8%, utilizando um colorímetro modelo Mini Scan XE, da marca HunterLab (Reston, Virginia, EUA). Os parâmetros tonalidade (°H), saturação (C*) e diferença de cor foram determinados através das Equações 1,2 e 3, conforme Ersus; Yurdagel (2007).

$$^{\circ}H = \tan^{-1}(b^*/a^*) \quad (1)$$

$$C^* = \sqrt{(a^*)^2 + (b^*)^2} \quad (2)$$

$$\Delta E = \sqrt{(L_0^* - L^*)^2 + (a_0^* - a^*)^2 + (b_0^* - b^*)^2} \quad (3)$$

5.3.5 Diâmetro médio e distribuição do tamanho das partículas

O diâmetro médio e a distribuição do tamanho das partículas foram determinados no dia da produção das partículas e após 105 dias de armazenamento utilizando aparelho com difração a laser (modelo SALD / 201V, Shimadzu, Kyoto, Japão) com faixa de medição entre 0,5 a 500 μm . Para essa análise, as partículas obtidas por *spray drying* e as partículas recobertas foram dispersas em álcool isopropílico (SILVA et al., 2013) enquanto que as partículas obtidas por *spray chilling* foram dispersas em água destilada e submetida a 3 leituras. A distribuição de tamanho está descrita em termos dos parâmetros D_{10} , D_{50} e D_{90} que representam o diâmetro de 10%, 50% e 90% das partículas presentes na amostra, respectivamente. O diâmetro médio do volume ($D [4,3]$) foi determinado pela Equações 4, onde f_i é a frequência relativa de D_i .

$$D[4,3] = \sum_{n=1}^{\infty} \frac{D_i^4 f_i}{D_i^3 f_i} \quad (4)$$

5.3.6 Microscopia óptica e Morfologia (MEV)

A caracterização das micropartículas foi realizada por microscopia ótica no equipamento BIO3 - Bel Photonics (Itália). A técnica de microscopia eletrônica de varredura (MEV) foi utilizada para análise morfológica das micropartículas, através do microscópio Tabletop Microscope Hitachi (Tóquio, Japão) TM 3000, com o programa TM 3000.

5.3.7 Determinação de fenólicos totais nas partículas

A extração dos compostos fenólicos presentes nas partículas obtidas por *spray drying* foi conduzida de acordo com Andrade et al. (2018). Aproximadamente 0,5 g dos pós foram misturados a 20 mL de metanol (80%) acidificado (0,1% HCl). Em seguida, a mistura foi agitada por 2 minutos e levada ao banho de ultrassom (UNIQUE modelo USC-1400) por 15 minutos. Após a extração, centrifugou-se a mistura a 6000 g por 5 minutos e o sobrenadante foi submetido a determinação de fenólicos totais conforme descrito no item 5.1.3.

Para as partículas obtidas por *spray chilling*, aproximadamente 0,5 g dos pós foram misturados a 10 mL de etanol (80%) e mantida sob aquecimento a 55°C em banho maria por 30 minutos conforme sugerido por Silva et al. (2019),

adaptado. Em seguida, centrifugou-se a mistura a 6603 g por 5 minutos, retirou-se o sobrenadante e enxaguou-se a gordura sedimentada com 3 mL de etanol (80% v/v). Seguiu-se filtração e junção de ambas as soluções para determinação de fenólicos totais, conforme descrito no item 5.1.3.

5.3.8 Determinação de flavonoides totais nas partículas

A extração dos flavonoides totais presentes nas partículas obtidas por *spray drying* foi conduzida de acordo com Andrade et al. (2018) e para as partículas obtidas por *spray chilling* de acordo com Silva et al. (2019), conforme descrito no item anterior (5.3.7). Após a extração, o sobrenadante foi submetido a determinação de flavonoides totais, conforme descrito no item 5.1.4.

5.3.9 Determinação de formononetina nas partículas

A extração da formononetina presente nas partículas obtidas por *spray drying* foi conduzida de acordo com Andrade et al. (2018) e para as partículas obtidas por *spray chilling* de acordo com Silva et al. (2019), conforme descrito no item 5.3.7. Após a extração, o sobrenadante foi submetido a determinação de formononetina por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), conforme descrito no item 5.1.5. A determinação de formononetina foi realizada no dia da produção das partículas e após 60 dias de armazenamento (25°C e UR de 32,8%) e os resultados expressos em µg de formononetina / g de matéria seca.

5.3.10 Atividade antioxidante dos pós

5.3.11 Capacidade de redução do radical ABTS das partículas dos pós

A extração dos compostos bioativos com capacidade antioxidante presente nas partículas obtidas por *spray drying* e por *spray chilling* foi conduzida conforme descrito no item 5.3.7. Após a extração, o sobrenadante foi submetido a determinação da capacidade de redução do radical ABTS, conforme descrito no item 5.1.6.1. A análise foi conduzida no dia da produção das partículas e após 105 dias de armazenamento em condições controladas (25°C e UR de 32,8%).

5.3.12 Capacidade de redução de ferro (FRAP) das partículas dos pós

A extração dos compostos bioativos com capacidade antioxidante presente nas partículas obtidas por *spray drying* e por *spray chilling* foi conduzida conforme descrito no item 5.3.7. Após a extração, o sobrenadante foi submetido a determinação da capacidade de redução de ferro (FRAP), conforme descrito no item 5.1.6.2. A análise foi conduzida no dia da produção das partículas e após 105 dias de armazenamento em condições controladas (25°C e UR de 32,8%).

5.4 Estabilidade durante a estocagem

A estabilidade dos compostos fenólicos, dos flavonoides e da formononetina durante o armazenamento foi avaliada de acordo com a metodologia descrita por Tonon, Brabet e Hubinger (2010), adaptada. As amostras foram dispostas em copos de acrílico de 50 mL transparentes e destampados. Os recipientes com os pós foram, então, armazenados em dessecadores contendo solução saturada de MgCl₂ (UR de 32,8%). Os dessecadores foram colocados em estufas à temperatura de 25°C, por 60 dias. Foi realizada a determinação dos fenólicos e dos flavonoides totais nas partículas, conforme descrito nos itens 5.3.7 e 5.3.8, a cada 15 dias.

5.5 Ensaio de liberação de formononetina no sistema digestório simulado

Foi utilizado o ensaio de digestão “*in vitro*” estático segundo Minekus et al. (2014), com modificações. Primeiramente, 1 g de partícula foi adicionada à 3 mL de fluido oral e mantido, sob agitação, por 2 minutos a 37 °C e 200 rpm. Em seguida, 4 mL de suco gástrico foi adicionado ao sistema por 2 horas seguido da adição de 6,5 mL de fluido intestinal, totalizando 4 horas de análise. Alíquotas de 0,5 mL foram retiradas de cada fase (oral, gástrica e intestinal) durante o ensaio para a quantificação do teor de formononetina conforme descrito no item 5.1.5. A liberação, em percentagem, será calculada como a relação entre o teor de formononetina na alíquota e o teor total de formononetina presente na partícula (determinado conforme item 5.3.9), como indicado na Equação 4.

$$\text{Liberação (\%)} = \frac{\text{Formononetina na alíquota analisada}}{\text{Formononetina total na partícula}} \times 100 \quad (6)$$

5.6 Análise dos resultados

Para a análise dos resultados foi utilizado o pacote estatístico SAS (Statistical Analysis System), versão 9.3. Foi utilizado a análise de variância (ANOVA) e teste de comparação de médias de Tukey. Todos os testes estatísticos foram realizados ao nível de 5% de significância ($p < 0,05$).

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 CARACTERIZAÇÃO DO EXTRATO

6.1.1 *Obtenção do EEP e determinação de umidade*

A produtividade e composição da própolis varia bastante de acordo com a época do ano, portanto amostras de própolis vermelha devem ser tratadas em lotes, já que resinas colhidas em épocas diferentes podem apresentar composições diferentes. Sendo assim, todo o trabalho foi conduzido com o mesmo lote de própolis para evitar qualquer variação nos resultados decorrente da época de coleta da própolis.

O teor de umidade no extrato foi determinado por gravimetria. O EEP apresentou UR de $84,54 \pm 0,05\%$, valor que será utilizado para converter os resultados obtidos para base seca.

6.1.2 *Teor de fenólicos totais e flavonoides totais no extrato*

A determinação de fenólicos totais no extrato foi realizada utilizando o método de Folin-Ciocalteu, conforme descrito no item 5.1.3, e o teor de flavonoides totais foi estimado por reação com cloreto de alumínio, conforme descrito no item 5.1.4. Os resultados encontrados foram de $201,21 \pm 4,94$ mg AGE/g de própolis e de $65,91 \pm 2,33$ mg quercetina/g de própolis para fenólicos e flavonoides, respectivamente.

Em um estudo da composição química e atividades biológicas da própolis vermelha, Alencar et al. (2007) obtiveram teores de fenólicos totais de $232 \pm 22,3$ mg AGE/g para o extrato etanólico da resina. No mesmo estudo, Alencar et al. (2007) obtiveram teores de flavonoides totais de $43,00 \pm 1,00$ mg quercetina/g para o extrato etanólico da resina.

Andrade et al. (2017) em estudo sobre o potencial dos compostos bioativos encontrados em própolis marrom, verde e vermelha obtiveram teores de fenólicos e flavonoides de $91,32 \pm 0,49$ mg AGE/g e $31,48 \pm 0,20$ mg quercetina/g, respectivamente, para o extrato etanólico de própolis vermelha.

A diferença entre os valores observados no presente trabalho e de outros estudos pode ser atribuída a diversos fatores. Dentre eles, destacam-se a influência da região de colheita, conforme demonstrado por Silva et al. (2012)

que compararam própolis obtidas em diferentes regiões de Portugal. Os mesmos autores também evidenciaram a influência da metodologia de extração nos resultados de teores de fenólicos e flavonoides.

6.1.3 Identificação e determinação de formononetina por CLAE

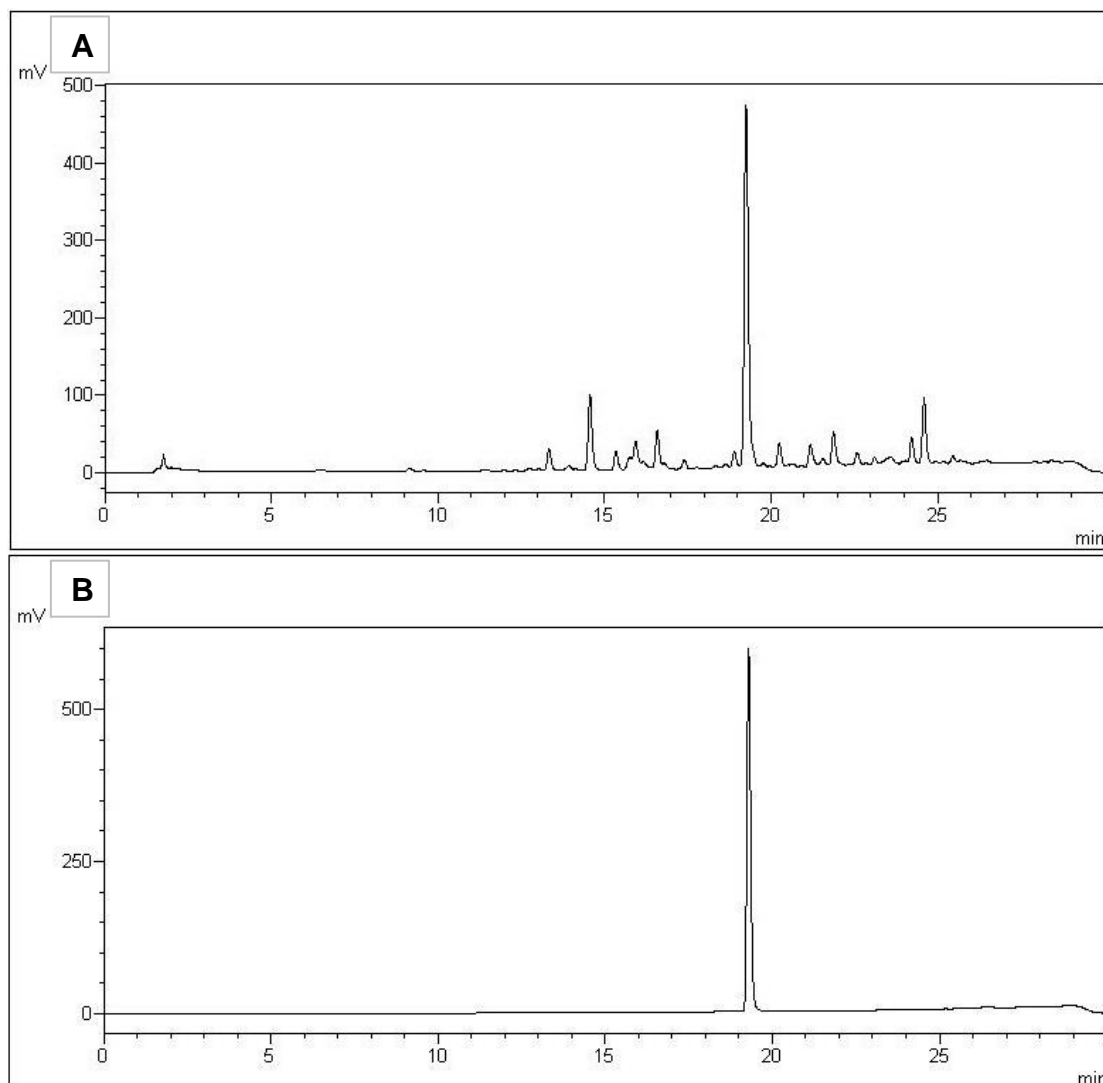
No presente trabalho, a formononetina foi a molécula escolhida como marcador da própolis vermelha devido suas propriedades demonstradas em estudos recentes e sua quantificação foi realizada por CLAE. Todavia, apesar de ser considerada uma importante constituinte, devido as diversas atividades biológicas a ela relacionada e também por ser encontrada exclusivamente na própolis vermelha, existem relatos da não identificação da molécula neste tipo de própolis (ALENCAR et al., 2007; NEVES et al., 2016; DUTRA; ESPITIA; ANDRADE BATISTA, 2021).

O cromatograma do extrato de própolis vermelha está demonstrado na Figura 4A e o cromatograma contendo o pico do padrão de formononetina (4 $\mu\text{g/mL}$) está representado na Figura 4B. Observando essas figuras é possível notar que o EEP apresentou um pico do marcador, o qual eluiu com tempo de retenção de aproximadamente 19,3 minutos. Com relação a determinação de formononetina, a concentração encontrada foi de $606,87 \pm 13,28 \mu\text{g}$ formononetina/g sólidos do extrato.

Neves et al. (2016), Cavendish et al. (2015) e Reis et al. (2019) também identificaram a presença de formononetina em amostras de própolis vermelha obtidas em diferentes regiões e observaram diferentes concentrações do marcador. Já Alencar et al. (2007), não conseguiram identificar a presença do isoflavonoide em questão. Tais resultados são um indicativo de que esta molécula possivelmente não está presente em todas as própolis vermelhas.

Os diferentes resultados observados nos estudos citados indicam que a região de obtenção da própolis, além da metodologia de extração e quantificação impactam significativamente nas concentrações observadas.

Figura 4 - Cromatogramas do extrato de própolis vermelha (A) e do padrão de formononetina (B)



Fonte: Autoria própria

6.1.4 Capacidade antioxidante do EEP

A capacidade antioxidante do extrato de própolis vermelha foi determinada através da captura do radical ABTS, que é gerado a partir da reação com persulfato de potássio quando este é reduzido na presença de moléculas doadoras de hidrogênio. A alteração na concentração desse composto altera a absorvância da solução podendo ser quantificada em espectrofotômetro a 734 nm. Também foi determinada a capacidade de redução do Fe^{3+} para Fe^{2+} (FRAP) que ocorre na presença do reagente TPTZ e cuja concentração pode ser medida em espectrofotômetro a 593 nm. Os resultados encontrados foram de $1928,21 \pm$

278,69 $\mu\text{mol TEq/g}$ de extrato seco e de $3209,86 \pm 97,46 \mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{g}$ de extrato seco para ABTS e FRAP, respectivamente.

Em um estudo sobre a otimização do processo de extração dos compostos fenólicos e antioxidantes da própolis vermelha, Morais et al. (2021) obtiveram $3550,8 \pm 70 \mu\text{mol TEq/g}$ e $1472,86 \pm 72,37 \mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{g}$ observando valores maiores para ABTS e menores para FRAP, respectivamente, do que o presente trabalho.

Já Machado et al. (2016), em estudo sobre a composição química e atividade biológica de extratos de diferentes tipos de própolis obtidos por extração supercrítica e extração convencional, encontraram capacidade de captura do radical ABTS de $98,50 \pm 1,40 \text{ mg TEq/mL}$ para extrato etanólico de própolis vermelha. O valor observado pelos autores também foi maior que o encontrado no presente trabalho, que correspondem a $74,62 \pm 10,79 \text{ mg TEq/mL}$ de extrato.

No entanto, a diferença entre os valores observados pelos autores citados e pelo presente trabalho pode ser explicada pela diferença nas metodologias de extração utilizadas em cada trabalho, conforme citado pelos próprios autores e demonstrado por Machado et al. (2016). Além disso, as fontes vegetais próximas as colmeias de origem das própolis analisadas, condições climáticas e época da colheita também podem ter causado variação significativa de composição entre as amostras e, conseqüentemente, variação em suas atividades biológicas.

6.2 MICROENCAPSULAÇÃO

6.2.1 Produção das micropartículas

Para a microencapsulação do extrato de própolis vermelha por *spray drying* realizaram-se dois tratamentos, um com a proporção (m/m) de 1:4 e outro com a proporção (m/m) de 1:6 (extrato:carreador), em ambos se utilizou solução de goma arábica (30% m/m) como material de parede e os parâmetros de processo descritos no item 5.2.1. Os tratamentos foram identificados com a letra “D” seguida dos números que correspondem a proporção núcleo:carreador utilizada.

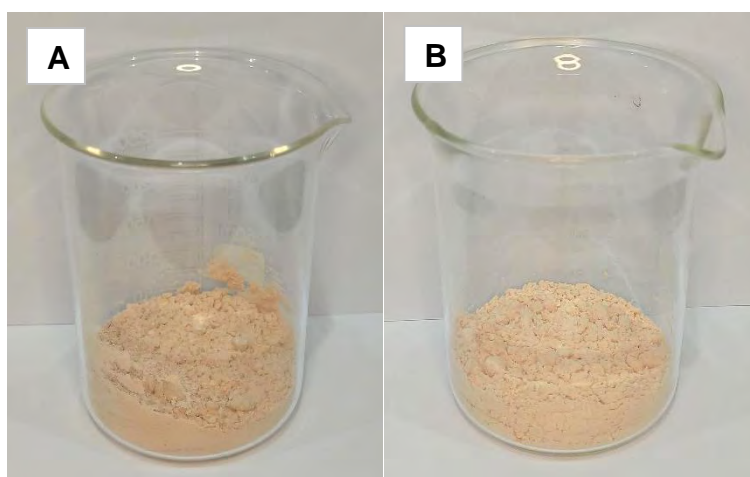
Uma vez que não foram encontrados trabalhos com microencapsulação de própolis por *spray chilling*, foram utilizados os parâmetros descritos por

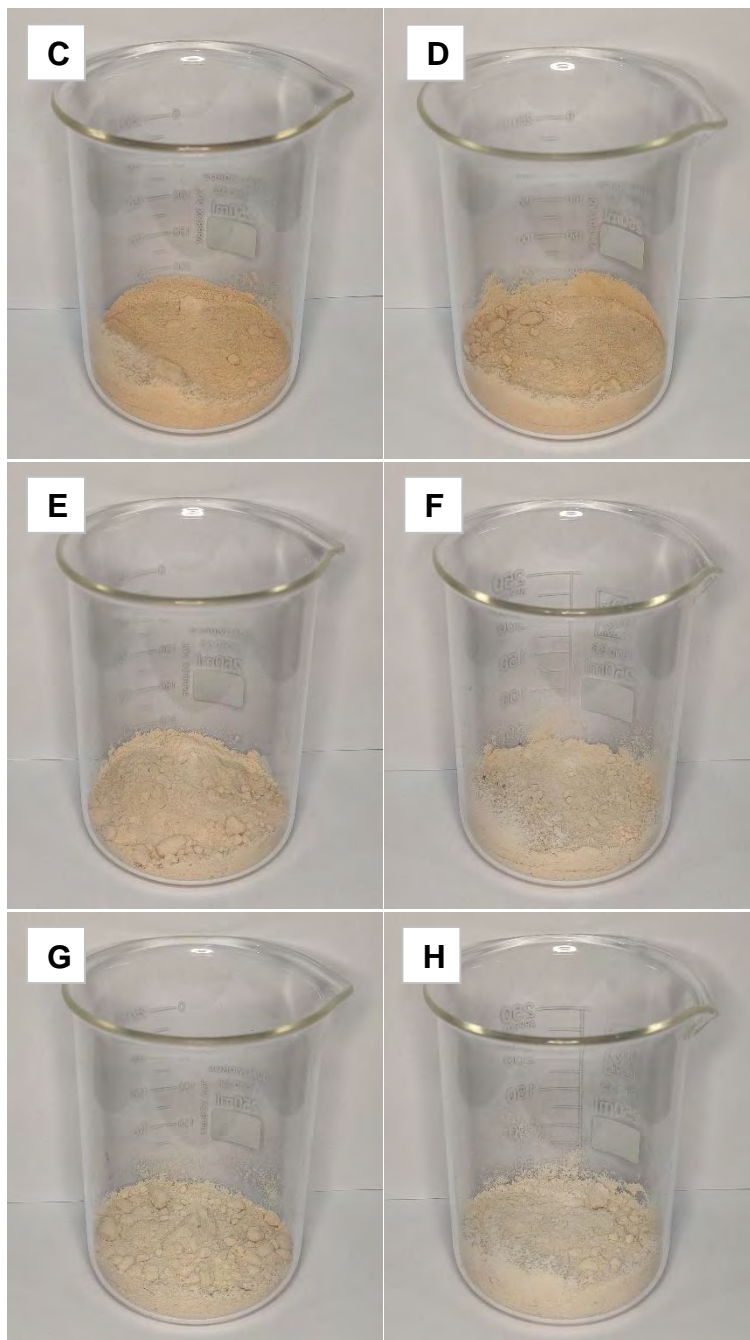
Pelissari et al. (2016), que aplicaram a técnica para obter micropartículas de licopeno. Após a obtenção do extrato concentrado, foi realizado o processo de microencapsulação em dois tratamentos, um com a proporção (m/m) de 1:4 e um com a proporção (m/m) de 1:6 (extrato concentrado:carreador), em ambos se utilizou gordura vegetal como material de parede e os parâmetros de processo descritos no item 5.2.2. Os tratamentos foram identificados com a letra “C” seguida dos números que correspondem a proporção núcleo:carreador utilizada.

A combinação das técnicas foi realizada combinando cada um dos tratamentos obtidos por *spray drying* com duas proporções de gordura. Dessa forma, obteve-se quatro tratamentos adicionais, onde cada uma das partículas obtidas por *spray drying* foi recoberta com duas proporções (m/m) de gordura, 1:4 e 1:6. Os parâmetros de processo foram os mesmos utilizados na produção de partículas por *spray chilling*, conforme descrito no item 5.2.3. Os tratamentos foram identificados com os três primeiros caracteres referentes a partícula a ser recoberta seguidos da letra “R” e dos números que correspondem a proporção (núcleo: carreador) utilizada no recobrimento.

A aparência dos pós obtidos em cada tratamento pode ser observada na Figura 5.

Figura 5 - Pós produzidos por *spray drying*, *spray chilling* e pela combinação das técnicas





Fonte: Autoria própria

* Onde A e B corresponde as amostras obtidas por *spray drying* nas proporções 1:4 e 1:6 de extrato e carreador, respectivamente. C e D correspondem as amostras obtidas por *spray chilling* nas proporções 1:4 e 1:6 de extrato e carreador, respectivamente. E e F correspondem as amostras A recobertas por *spray chilling* nas proporções 1:4 e 1:6 de partículas e carreador, respectivamente. G e H correspondem as amostras B recobertas por *spray chilling* nas proporções 1:4 e 1:6 de partículas e carreador, respectivamente.

6.2.2 Delineamento experimental e obtenção do tratamento controle

No Quadro 3 são detalhadas as 8 partículas obtidas, bem como as técnicas e proporções utilizadas e a identificação de cada tratamento. Todas as proporções utilizadas foram com base massa/massa.

Quadro 3 - Formulação e identificação das partículas estudadas

Formulações para as micropartículas obtidas por <i>spray drying</i>		
Tratamento	Proporção (m/m)	
	Extrato de própolis vermelha	Solução de Goma arábica (30%)
D14	1	4
D16	1	6
Formulações para as micropartículas obtidas por <i>spray chilling</i>		
Tratamento	Proporção (m/m)	
	Extrato de própolis vermelha	Gordura vegetal
C14	1	4
C16	1	6
Formulações para as micropartículas obtidas pela combinação das técnicas		
Tratamento	Proporção (m/m)	
	Partículas obtidas por <i>spray drying</i> (D14 ou D16)	Gordura vegetal
D14R14	1	4
D14R16	1	6
D16R14	1	4
D16R16	1	6

Fonte: Autoria própria

* Onde D16 e D14 corresponde as amostras obtidas por *spray drying* nas proporções 1:6 e 1:4 de extrato e carreador, respectivamente. C16 e C14 correspondem as amostras obtidas por *spray chilling* nas proporções 1:6 e 1:4 de extrato e carreador, respectivamente. D14R16 e D14R14 correspondem as amostras D14 recobertas por *spray chilling* nas proporções 1:6 e 1:4 de partícula e carreador, respectivamente. D16R16 e D16R14 correspondem as amostras D16 recobertas por *spray chilling* nas proporções 1:6 e 1:4 de partícula e carreador, respectivamente.

A secagem do extrato de própolis vermelha por *spray drying* foi conduzida de acordo com Silva et al. (2011), com as modificações mencionadas no item 5.2.1. O extrato seco, não encapsulado, seria utilizado como controle no ensaio de estabilidade, no entanto não foi possível obter-se um pó, conforme esperado,

pois o material se aderiu as paredes da câmara de secagem e do ciclone do equipamento, conforme demonstrado na Figura 6.

Figura 6 - Secagem do extrato de própolis vermelha sem coadjuvante de processo por *spray drying*



Fonte: Autoria própria

Dessa forma, evidenciou-se que para a obtenção de extrato de própolis vermelha em pó utilizando secagem por atomização, é necessário a utilização de um coadjuvante de secagem, ou seja, é necessário realizar a microencapsulação do material. A utilização de um coadjuvante durante a secagem aumenta a temperatura de transição vítrea do extrato, diminuindo sua higroscopicidade e, assim, evitando sua aderência ao equipamento. Assim, não foi possível utilizar o material livre de coadjuvante como controle nos ensaios realizados com as demais partículas.

6.3 CARACTERIZAÇÃO DOS PÓS OBTIDOS

6.3.1 Teor de umidade e atividade de água

O teor de umidade e a atividade de água são parâmetros intrínsecos de extrema importância na vida de prateleira de um alimento ou ingrediente, pois essas informações podem determinar as condições de processo, embalagem e/ou armazenagem a que eles devem ser submetidos para alcançar o *shelf-life* desejado. Os valores para a atividade de água e os teores de umidade da goma

arábica foram de $0,50 \pm 0,01$ e $10,68 \pm 0,02\%$, respectivamente e das partículas estão expressos na Tabela 2.

Tabela 2 - Umidade e atividade de água dos pós.

Técnica aplicada	Proporção (núcleo:carreador)	Partícula	Umidade (%)	a_w
<i>Spray drying</i>	1:4	D14	$7,32 \pm 0,16^a$	$0,294 \pm 0,007^e$
	1:6	D16	$6,81 \pm 0,61^a$	$0,328 \pm 0,003^d$
<i>Spray chilling</i>	1:4	C14	$3,49 \pm 0,09^b$	$0,470 \pm 0,004^c$
	1:6	C16	$2,65 \pm 0,04^c$	$0,446 \pm 0,021^c$
Recobrimento por <i>Spray chilling</i>	1:4	D14R14	$2,39 \pm 0,13^{cde}$	$0,539 \pm 0,018^b$
	1:6	D14R16	$1,82 \pm 0,05^{de}$	$0,581 \pm 0,010^a$
	1:4	D16R14	$2,17 \pm 0,04^{cd}$	$0,542 \pm 0,005^b$
	1:6	D16R16	$1,80 \pm 0,03^e$	$0,597 \pm 0,002^a$

Médias seguidas por pelo menos uma letra em comum não diferem entre si pelo teste de Tukey (5% de significância)

Pelos dados apresentados é possível observar que os pós cujas partículas continham a gordura (partículas obtidas por *spray chilling* e partículas recobertas) apresentaram menores valores de umidade e maiores valores para atividade de água quando comparado aqueles obtidos por *spray drying*, que possuem goma arábica como carreador. Isso ocorre porque, uma vez que a gordura é altamente hidrofóbica, a maior parte da água presente nas partículas com esse carreador se apresenta na forma livre, portanto ainda que apresentem baixa umidade, suas atividades de água tendem a ser maiores que as partículas com goma.

Andrade et al. (2018) microencapsularam própolis vermelha por *spray drying* utilizando goma arábica como material de parede e obtiveram pós com umidade de $9,89 \pm 0,53\%$ e atividade de água de $0,36 \pm 0,01$ e Silva et al. (2013) obtiveram pós com umidade de $9,3 \pm 0,4\%$ e $0,33 \pm 0,01$ de atividade de água. No presente trabalho foram obtidos valores similares de umidade e atividade de água para os pós obtidos por *spray drying* em comparação aos trabalhos citados onde a pequena diferença observada pode ser explicada pela diferença na proporção (extrato: goma arábica) e nos diferentes parâmetros de processo utilizados.

Devido aos baixos teores de umidade e valores de atividade de água obtidos tanto na presente pesquisa quanto pelos autores citados, nota-se que é possível produzir pós contendo partículas de extrato de própolis vermelha em pó, pela técnica de *spray drying*, utilizando goma arábica como carreador e que sejam microbiologicamente estáveis, uma vez que os microrganismos não se desenvolvem em meios cujos valores de atividade de água são inferiores a 0,6.

Não foram encontrados estudos sobre microencapsulação de própolis vermelha por *spray chilling*. Contudo, estudo com microencapsulação de hidrolisado proteico (OLIVEIRA, 2014) disperso em gordura fundida a diferentes temperaturas e em diferentes proporções (hidrolisado:gordura) obteve pós com umidade entre 1,00 e 1,44% e atividade de água entre 0,39 e 0,47, valores próximos ao observado no presente trabalho.

Não foram encontrados estudos sobre microencapsulação de própolis vermelha utilizando a combinação das técnicas de *spray drying* e *spray chilling*. Contudo, Arslan-Tontul e Erbas (2017) conduziram estudo com microencapsulação de probióticos utilizando as técnicas de *spray drying*, *spray chilling* e a combinação delas. Para a combinação das técnicas, os autores obtiveram pós contendo partículas com valores de umidade de 4,30% e atividade de água de 0,79. Os valores encontrados pelos autores diferiram do presente trabalho devido a diferença dos compostos bioativos encapsulados e na proporção carreador:núcleo utilizada.

Pelos resultados observados, nota-se que também é possível obter pós que sejam microbiologicamente estáveis ao microencapsular extrato de própolis vermelha utilizando a técnica de *spray chilling* ou recobrir partículas obtidas por *spray drying*. Importante destacar que mesmo os pós que apresentaram atividade de água próximo a 0,60 podem ser considerados microbiologicamente estáveis já que não tendem a absorver vapor de água do ambiente devido à natureza hidrofóbica de seu material de parede.

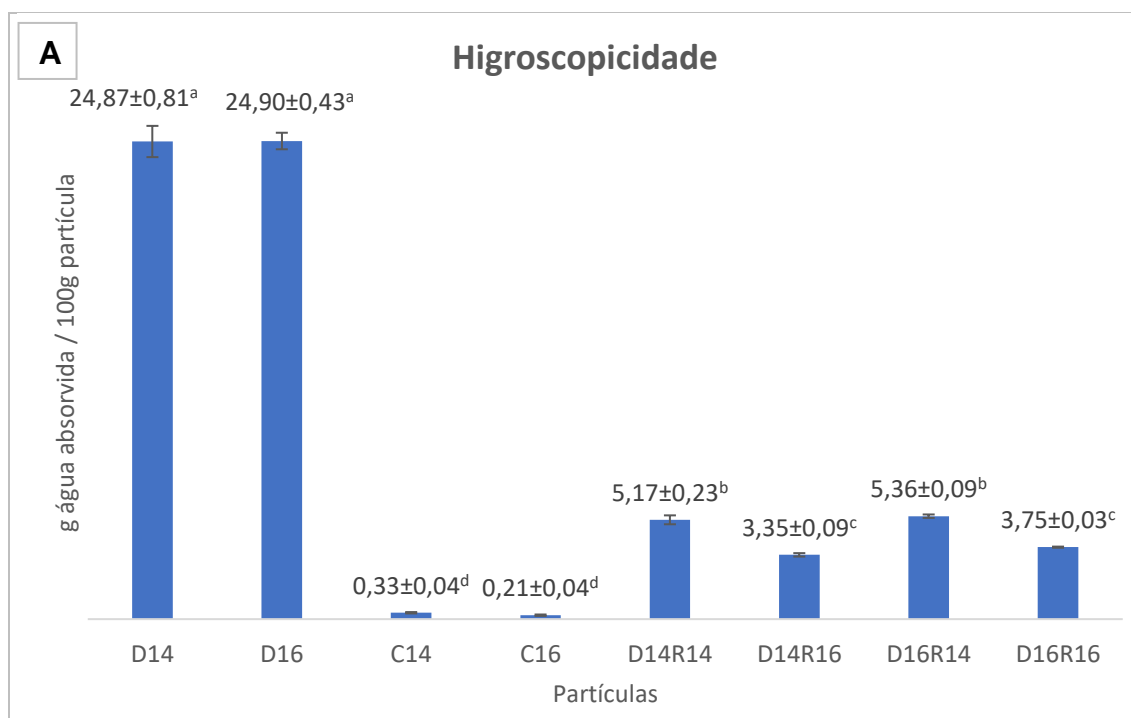
6.3.2 Higroscopicidade e Dispersibilidade em água

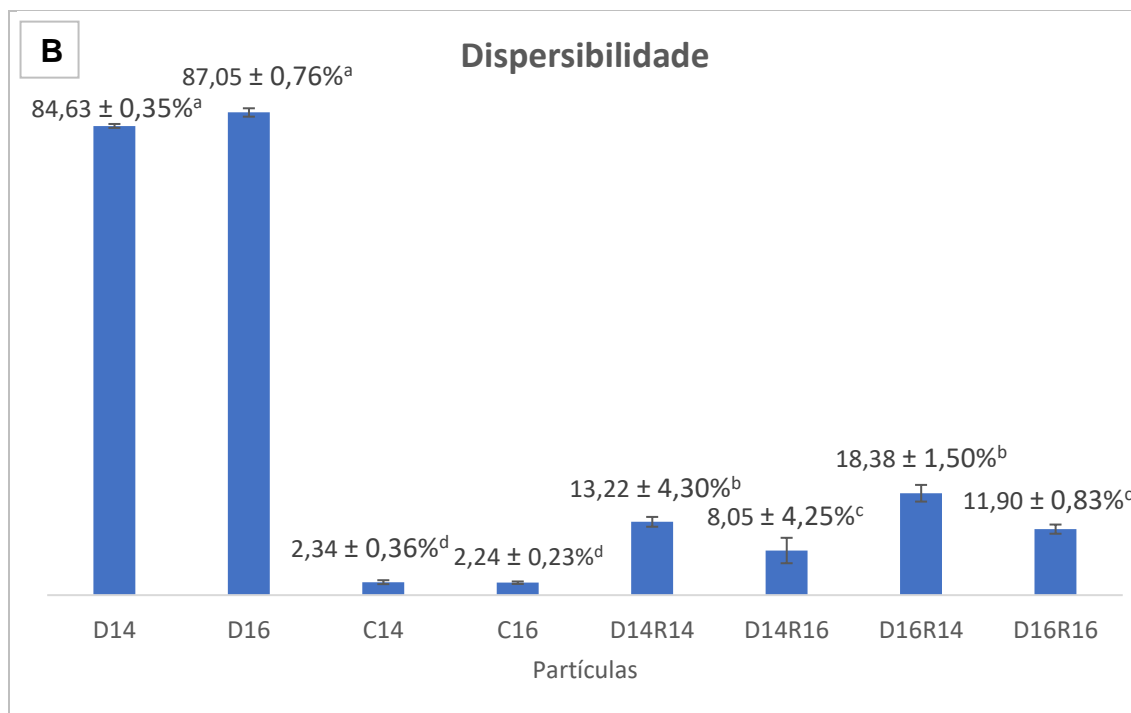
A higroscopicidade é a capacidade que um material tem de absorver água do ambiente que o circunda e foi obtida conforme descrito no item 5.3.2. Já a dispersibilidade em água fria é a quantidade (em massa) de pó/partícula que consegue se dispersar em relação a massa inicial de pó/partícula adicionada em

água, expresso em porcentagem conforme descrito no item 5.3.3. Os valores encontrados estão demonstrados na Figura 7.

Os pós obtidos pela técnica de *spray drying* apresentaram os maiores valores de higroscopicidade (Figura 7A) e dispersibilidade (Figura 7B) seguido pelos pós contendo as partículas recobertas. Como esperado, os pós contendo as partículas obtidas por *spray chilling* foram as que apresentaram os menores valores dentre os tratamentos avaliados. A dispersibilidade e a higroscopicidade estão fortemente relacionadas com as características do material de parede das partículas de modo que, quanto maior a afinidade de um carreador por água, maior tende a ser sua dispersibilidade e sua higroscopicidade. Assim, pelos dados, é possível notar que quanto maior a proporção de goma arábica utilizada na produção das partículas, maior são os valores de dispersibilidade em água e higroscopicidade dos pós.

Figura 7 - Higroscopicidade e dispersibilidade dos pós.





Médias seguidas por pelo menos uma letra em comum não diferem entre si pelo teste de Tukey (5% de significância)

*D14 e D16 referem-se as partículas obtidas por *spray drying* nas proporções 1:4 e 1:6 (núcleo:carreador), respectivamente.

**C14 e C16 referem-se as partículas obtidas por *spray chilling* nas proporções 1:4 e 1:6 (núcleo:carreador), respectivamente.

***D14R14 e D14R16 referem-se as partículas D14 recobertas por *spray chilling* nas proporções 1:4 e 1:6 (núcleo:carreador), respectivamente.

****D16R14 e D16R16 referem-se as partículas D16 recobertas por *spray chilling* nas proporções 1:4 e 1:6 (núcleo:carreador), respectivamente.

Silva et al. (2013) em estudo sobre a microencapsulação de própolis por *spray drying* utilizando goma arábica e amido modificado como carreadores obtiveram pós com dispersibilidade de $86,0 \pm 3,0\%$ e $84,0 \pm 0,3\%$ para formulações com diferentes proporções de goma arábica. Para higroscopicidade os mesmos autores obtiveram valores de $29,3 \pm 0,6$ e $27,4 \pm 0,9$ g H₂O/100 g de pó. Em seu trabalho com microencapsulação de diferentes tipos de própolis utilizando diferentes materiais de parede, Andrade et al. (2018) observaram que a dispersibilidade e higroscopicidade de partículas de própolis vermelha não diferem entre si quando encapsuladas com goma arábica ou maltodextrina.

Não foram encontrados estudos onde determinou-se a higroscopicidade ou dispersibilidade de pós obtidos por *spray chilling* ou daqueles contendo partículas obtidos no *dryer* e recobertas por *chiller*.

Partículas altamente higroscópicas, ao absorver água do ambiente, aumentam sua umidade e atividade de água podendo ficar susceptível a

deterioração microbiana. Dessa forma, determinar a higroscopicidade de partículas é importante para definir a melhor forma de embalagem e armazenagem dessas partículas, de modo a manter a sua viabilidade por mais tempo. Portanto é possível concluir que as partículas obtidas por *spray dryer* necessitariam de uma embalagem com menor permeabilidade ao vapor de água e armazenagem em local seco e arejado quando comparadas as partículas recobertas ou obtidas por *spray chiller*.

Apesar de idealmente ser necessário a realização de testes, a dispersibilidade de uma partícula em água pode dar um indicativo de quais produtos poderiam ser incorporados dessa partícula sendo que, dependendo das características do produto, a partícula pode não se incorporar facilmente ou não manter uma dispersão estável, o que inviabilizaria sua aplicação. Portanto, a utilização dos pós obtidos por *spray chilling*, devido à baixa dispersibilidade apresentada, não seriam indicados em produtos de elevada umidade e baixa viscosidade como sucos, refrescos, refrigerantes, bebidas energéticas, isotônicos, etc sendo mais indicadas para produtos de maior viscosidade como iogurtes, sorvetes, geleias, produtos de panificação entre outros.

6.3.3 Cor instrumental

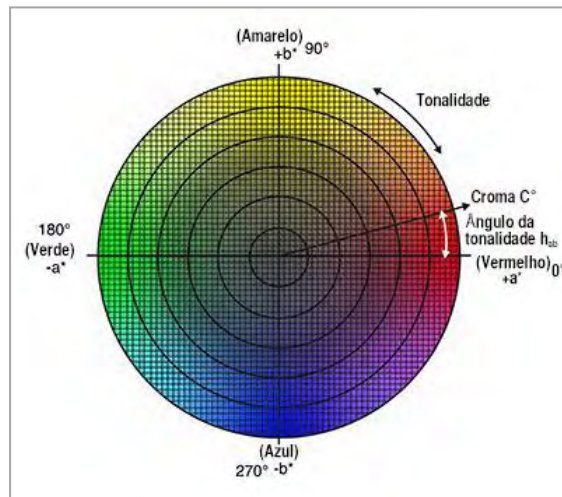
A cor dos pós está relacionada com o perfil de flavonoides da própolis utilizada no extrato, com as características e proporção do carreador e com os parâmetros de processo de encapsulação (PICCINELLI et al., 2011; DURU, 2021).

Os pós estudados não apresentaram coloração intensa o suficiente para serem bons candidatos a substitutos dos corantes artificiais utilizados atualmente pela indústria alimentícia, no entanto, a análise de cor instrumental se faz importante para identificar possíveis variações que possam inviabilizar seu uso em algum produto, bem como é um indicativo indireto de degradação dos flavonoides e outros compostos responsáveis pela coloração do material.

A análise de cor no espaço $L^*a^*b^*$ (CIELAB) pode ser interpretada geometricamente como um plano circular onde a extremidade esquerda do eixo horizontal ($-a^*$) representa a cor verde e a extremidade direita ($+a^*$) representa a cor vermelha e as extremidades superior e inferior do eixo vertical representam as cores amarela e azul ($+b^*$ e $-b^*$), respectivamente. Dessa forma, a tonalidade

(também conhecida como ângulo Hue) pode ser interpretada como o ângulo (em graus) a partir do eixo horizontal e a saturação (conhecida como Cromo) como sendo a distância da origem do sistema no plano $a^* \times b^*$, conforme demonstrado na Figura 8.

Figura 8 - Representação da tonalidade e da saturação no plano $a^* \times b^*$



Fonte: Adaptado de Minolta (1994)

A tonalidade dos pós no primeiro e após 105 dias é apresentada na Figura 9A. Nota-se que os pós apresentaram valores de tonalidade entre 63 e 76°, ficando todas no primeiro quadrante do sistema CIELAB, que representa as cores entre vermelho e amarelo. Além disso, é possível perceber que o aumento da proporção de material de parede na partícula retornou maiores valores de tonalidade nos pós e que houve redução significativa (teste de Tukey 5%) desse parâmetro entre o tempo 0 e após 105 dias de armazenamento, indicando que com o passar do tempo a cor dos pós tendem a se afastar do amarelo e se aproximar, ligeiramente, do vermelho.

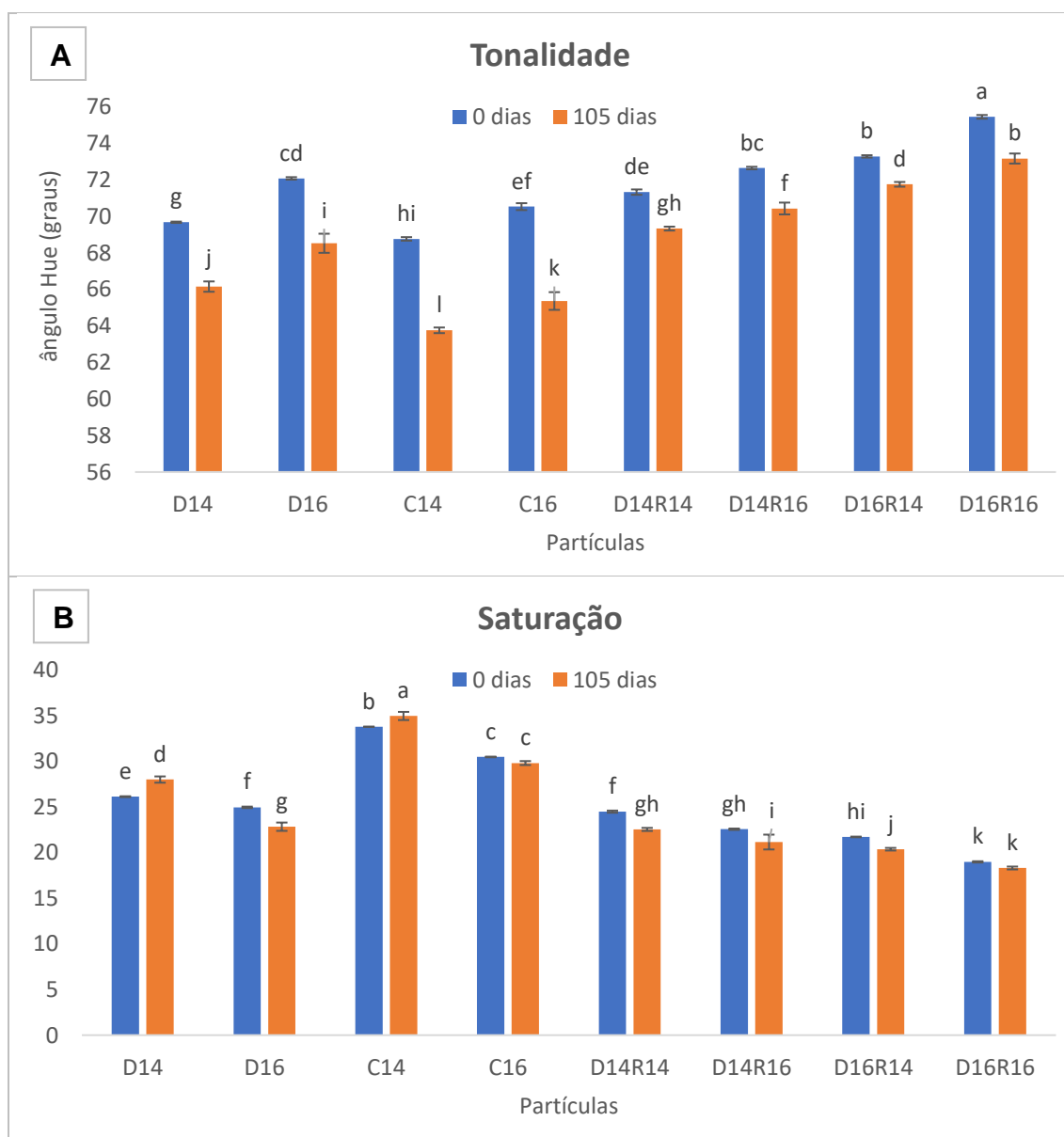
Na Figura 9B se observa a redução da saturação de cor dos pós com o aumento da proporção de material carreador e com o tempo de armazenamento, com exceção dos pós contendo as partículas D14 e C14, que possuem as maiores concentrações de extrato e apresentaram um ligeiro aumento nesse parâmetro com o passar do tempo.

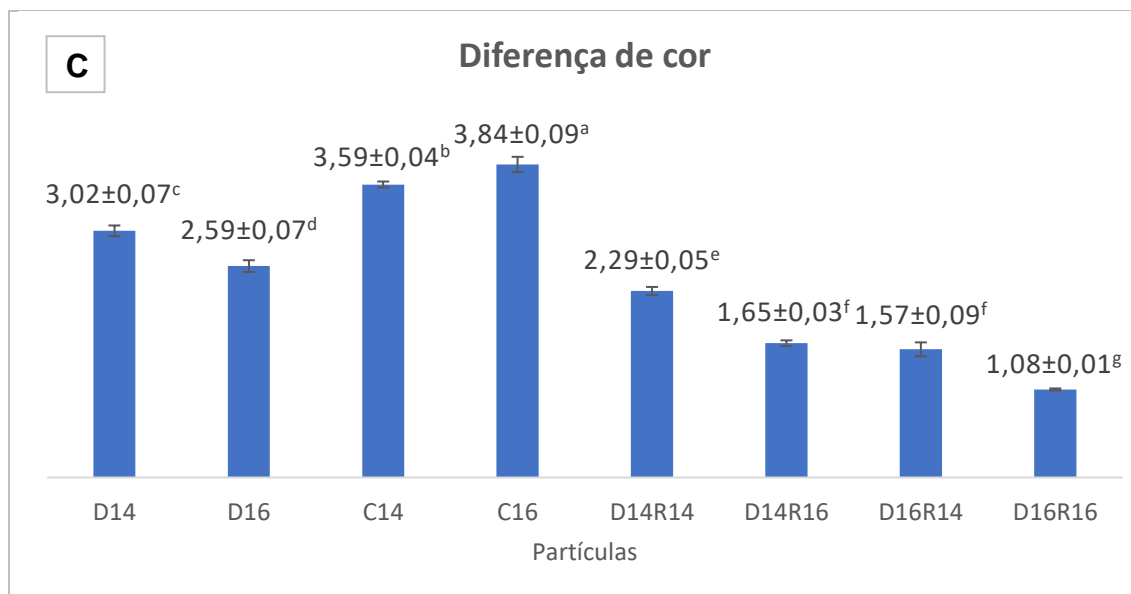
A diferença de cor (ΔE), que leva em consideração todos os parâmetros medidos (L^* , a^* e b^*) está representada na Figura 9C. Os dados obtidos demonstram que os pós contendo as partículas recobertas foram as que apresentaram menor ΔE entre o tempo 0 e após 105 dias de armazenamento,

enquanto que os pós contendo as partículas com maior concentração de extrato apresentaram maiores diferenças de cor.

Ao comparar os pós entre si nota-se que o aumento da proporção de material de parede causa o aumento do ângulo Hue (tonalidade) e a redução do Cromo (saturação de cor), ambas características são reflexo da diminuição dos parâmetros a^* e b^* (Apêndice A). Nota-se também que o aumento da proporção de material de parede nas partículas causa o aumento da luminosidade (L^*).

Figura 9 - Características de cor dos pós.





Médias seguidas por pelo menos uma letra em comum não diferem entre si pelo teste de Tukey (5% de significância)

*D14 e D16 referem-se as partículas obtidas por *spray drying* nas proporções 1:4 e 1:6 (núcleo:carreador), respectivamente.

**C14 e C16 referem-se as partículas obtidas por *spray chilling* nas proporções 1:4 e 1:6 (núcleo:carreador), respectivamente.

***D14R14 e D14R16 referem-se as partículas D14 recobertas por *spray chilling* nas proporções 1:4 e 1:6 (núcleo:carreador), respectivamente.

****D16R14 e D16R16 referem-se as partículas D16 recobertas por *spray chilling* nas proporções 1:4 e 1:6 (núcleo:carreador), respectivamente.

Não se encontrou na literatura trabalhos que comparassem os parâmetros de cor de pós contendo partículas produzidas por diferentes técnicas. No entanto, Idham et al. (2012) e Souza et al. (2015) utilizaram a técnica de *spray drying* para encapsular extratos ricos em antocianinas e concluíram que a encapsulação preservou os compostos bioativos durante o período de armazenamento estudado. Trabalhos do grupo de pesquisa com encapsulação de extrato de casca de abóbora e extrato de casca de guaraná também vêm corroborando os resultados observados no presente trabalho.

Os resultados observados podem estar relacionados com o fato de que ao aumentar a proporção de carreador, diminui-se a exposição dos pigmentos encapsulados a luz e, por consequência, diminui-se o valor obtido para os parâmetros de cor a^* e b^* , que influenciam nos valores de tonalidade e saturação. Já a tendência de aproximação da cor vermelha com o passar do tempo pode estar relacionada à oxidação dos compostos bioativos mais expostos ou a migração desses compostos para a superfície das partículas, no entanto, seria necessário identificar os compostos responsáveis pela coloração

da própolis vermelha, quantificá-los na superfície da partícula e monitorar a variação de seu(s) teor(es) ao longo do tempo para confirmar tais hipóteses.

Quanto a luminosidade (L^*), a diferença pode se justificar pelas características dos encapsulantes. A gordura vegetal, por estar no estado cristalino, resultou em pós com menor luminosidade enquanto que a goma arábica, provavelmente por estar no estado amorfo, resultou numa maior luminosidade para as partículas obtidas por *spray drying*.

6.3.4 Distribuição de tamanho das partículas

O tamanho de partícula é uma das características fundamentais de um ingrediente, pois pode impactar negativamente na textura de formulações alimentícias podendo, dependendo do tamanho e da aplicação, ser fator determinante para a não utilização de um ingrediente. A distribuição de tamanho detalhada para cada partícula no tempo 0 e após 105 dias está representada nos Apêndices B, C, D e E enquanto que as medidas de tendência ($D_{[4,3]}$, D_{10} , D_{50} e D_{90}) são apresentadas na Tabela 3.

As partículas obtidas por *spray drying* apresentaram distribuição de tamanho bimodal e diâmetros médios de volume ($D_{[4,3]}$) variando entre 21,88 e 66,03 μm , dependendo da proporção de carreador. As partículas obtidas por *spray chilling* apresentaram distribuição de tamanho unimodal com diâmetro de volume variando de 222,53 a 286,74 μm . Já as partículas recobertas apresentaram distribuição de tamanho multimodal com até três picos observados e diâmetros de partícula variando entre 146,56 e 215,15 μm , dependendo do tratamento. Com relação ao tempo de armazenamento, todas as partículas apresentaram deslocamento nos picos de distribuição observados ao longo do tempo e aumento de seu diâmetro médio de volume, exceto o tratamento D16R14 que não diferiu significativamente no tempo 0 e após 105 dias de armazenamento.

As partículas obtidas por *spray drying* foram as que apresentaram maior aumento relativo em seu diâmetro, provavelmente devido à natureza hidrofílica da goma arábica utilizada como carreador, que possibilitou a absorção da umidade do ambiente, resultando na formação de pontes entre as partículas, logo em aumento do tamanho médio.

Os altos valores de tamanho observados para as partículas obtidas por *spray chilling* indicam que, devido à natureza hidrofóbica do coadjuvante utilizado nesses tratamentos, a análise de difração a laser deveria ter sido conduzida sob agitação ultrassônica para evitar a aglomeração dessas amostras.

Tabela 3 - Medidas de tendência da distribuição de tamanho das partículas

Partícula	Tempo (dias)	D [4,3] ± DP (µm)	D ₁₀ (µm)	D ₅₀ (µm)	D ₉₀ (µm)
D14	0	21,88 ± 0,41 ^a	1,07	3,92	12,50
	105	28,13 ± 0,31 ^b	2,54	7,00	19,30
D16	0	49,56 ± 0,47 ^c	1,23	6,06	22,31
	105	66,03 ± 0,46 ^d	1,64	8,09	29,81
C14	0	222,53 ± 0,13 ^e	109,82	169,91	226,62
	105	273,83 ± 0,10 ^f	169,61	226,62	302,79
C16	0	271,82 ± 0,14 ^f	146,74	226,62	302,79
	105	286,74 ± 0,13 ^g	146,74	226,62	302,79
D14R14	0	146,56 ± 0,45 ^h	6,06	46,04	126,94
	105	153,69 ± 0,38 ^h	16,70	61,52	126,94
D14R16	0	149,28 ± 0,43 ^h	6,06	61,52	126,94
	105	175,64 ± 0,37 ⁱ	22,31	61,52	146,74
D16R14	0	166,17 ± 0,40 ^j	14,45	61,52	146,74
	105	160,68 ± 0,43 ^j	8,09	71,11	146,74
D16R16	0	163,61 ± 0,41 ^j	8,09	53,22	126,94
	105	215,15 ± 0,35 ^e	22,31	109,82	196,06

Médias seguidas por pelo menos uma letra em comum não diferem entre si pelo teste de Tukey (5% de significância)

*D14 e D16 referem-se as partículas obtidas por *spray drying* nas proporções 1:4 e 1:6 (núcleo:carreador), respectivamente.

**C14 e C16 referem-se as partículas obtidas por *spray chilling* nas proporções 1:4 e 1:6 (núcleo:carreador), respectivamente.

***D14R14 e D14R16 referem-se as partículas D14 recobertas por *spray chilling* nas proporções 1:4 e 1:6 (núcleo:carreador), respectivamente.

****D16R14 e D16R16 referem-se as partículas D16 recobertas por *spray chilling* nas proporções 1:4 e 1:6 (núcleo:carreador), respectivamente.

A distribuição multimodal observada nas partículas recobertas indica que uma fração das partículas D14 e D16 podem não ter sido devidamente recobertas, fazendo com que picos dessas partículas aparecessem nos resultados. Já o deslocamento dos picos de distribuição e o aumento no diâmetro

médio das partículas armazenadas por 105 dias indica que houve tendência de aglomeração de todas as partículas estudadas. Ademais, a análise de difração a laser também demonstrou a natureza heterogênea dos processos de microencapsulação por atomização utilizados, demonstrando a tendência destes em formar partículas de tamanhos variados.

Silva et al. (2013) estudaram a microencapsulação de própolis verde por *spray drying* e obtiveram distribuição de tamanho de tamanho bimodal e tamanho variando entre 0,1 e 50 μm com diâmetro médio de $24,0 \pm 0,6 \mu\text{m}$ e $23,3 \pm 0,4 \mu\text{m}$ para partículas com proporção 1:6 e 1:4 (extrato:solução de goma arábica), respectivamente. Utilizando a técnica de *spray chilling*, Matos-Jr et al. (2017) microencapsularam ácido ascórbico e obtiveram partículas de tamanho entre 34 ± 2 e $92 \pm 2 \mu\text{m}$ e diâmetro médio de $91,62 \pm 1,5 \mu\text{m}$, já Pedroso et al. (2012) em estudo de microencapsulação de bactérias lácticas obtiveram partículas entre 0,9 e 126,9 μm com diâmetro médio de 40,3 μm . Em trabalho do grupo de pesquisa, Silva et al. (2019), utilizando técnica de *spray chilling*, encapsularam extrato da casca de guaraná seco por *spray drying* e obtiveram partículas com distribuição entre 1 e 82 μm e diâmetro médio de até 59,86 μm , dependendo do tratamento.

Os pós obtidos por *spray drying* foram os que apresentaram os menores tamanhos e poderiam ser aplicados em diversas formulações sem alterar significativamente a textura de produtos como sorvetes, iogurtes, sobremesas, balas mastigáveis entre outros. Já as partículas recobertas e obtidas por *spray chilling* teriam de ser aplicadas em produtos onde a percepção do tamanho das partículas não sejam considerados um problema como barras de cereais, massas para bolo, cookies e panificados em geral e outros que passariam por tratamento térmico, onde a gordura usada como carreador seria fundida.

A distribuição e tamanho de partículas pode ser afetado por diversos fatores, cujos principais são a pressão do ar de atomização, vazão e viscosidade do fluido de alimentação, características do carreador e diâmetro do bico atomizador, no entanto outros parâmetros operacionais também podem afetar significativamente os valores observados (MATOS-JR et al. 2017). Sendo assim, os processos de microencapsulação por atomização possuem como vantagem, também, a facilidade na mudança dos parâmetros de processo afim de se obter

partículas menores, ou mais adequadas a uma determinada aplicação, e que ainda possam apresentar níveis significativos de proteção dos compostos bioativos, justificando sua aplicação.

6.3.5 Microscopia óptica e Morfologia (MEV)

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) é uma técnica onde um feixe de elétrons varre a superfície da amostra gerando sinais que são detectados e podem ser traduzidos na forma de imagens. Esse tipo de análise é capaz de fornecer informações importantes a respeito da morfologia de partículas obtidas por atomização. Neste trabalho estudou-se a morfologia de três partículas sendo uma partícula obtida por *spray drying* (D14), uma partícula obtida por *spray chilling* (C14) e uma partícula recoberta (D14R14). A escolha das partículas analisadas levou em consideração as características distintas de cada uma, visto que são resultantes de processos diferentes ou de combinação de processos. As imagens obtidas na MEV são apresentadas na Figura 10.

As partículas obtidas por *spray drying* (Figuras 10A e 10B) apresentaram formatos variados, algumas esféricas, sem rachaduras ou orifícios e outras apresentando formatos irregulares com pequenas concavidades distribuídas ao longo de sua superfície.

Já as partículas obtidas por *spray chilling* (Figura 10C e 10D) e as partículas recobertas (Figura 10E e 10F) apresentaram formato esférico e superfície áspera, sem rachaduras ou concavidades, mas algumas com pequenos orifícios.

De acordo com as Figuras 10 E e F, verifica-se que todas as partículas apresentaram tamanhos variados e foi possível observar que nem todas as partículas obtidas por *spray drying* foram devidamente recobertas, corroborando os resultados de distribuição de tamanho observados por difração a laser.

Ao se realizar a ruptura das partículas notou-se que as partículas D14 (Figura 10B) apresentaram morfologia do tipo matriz, se mostrando uma esfera sólida com o composto bioativo distribuído em todo seu volume, inclusive em sua superfície. Com o corte de uma das partículas verificou-se que a mesma era maciça o que não é o usual, pois, em razão da evaporação do solvente de dentro para fora, normalmente partículas produzidas por *spray drying* são ocas.

As partículas C14 (Figura 10D) também se apresentaram como uma esfera sólida, mas com alguns orifícios e irregularidades em seu interior. Pela partícula cortada que aparece nessa micrografia, verifica-se que a técnica de *spray chilling* produz estruturas maciças, como esperado, uma vez que não se trata de uma técnica de secagem e a evaporação de solvente provavelmente restringe-se apenas ao álcool presente no extrato. Okuro et al. (2013) também reportaram que as partículas obtidas por *spray chilling* são maciças, quando utilizaram a técnica para encapsular probióticos.

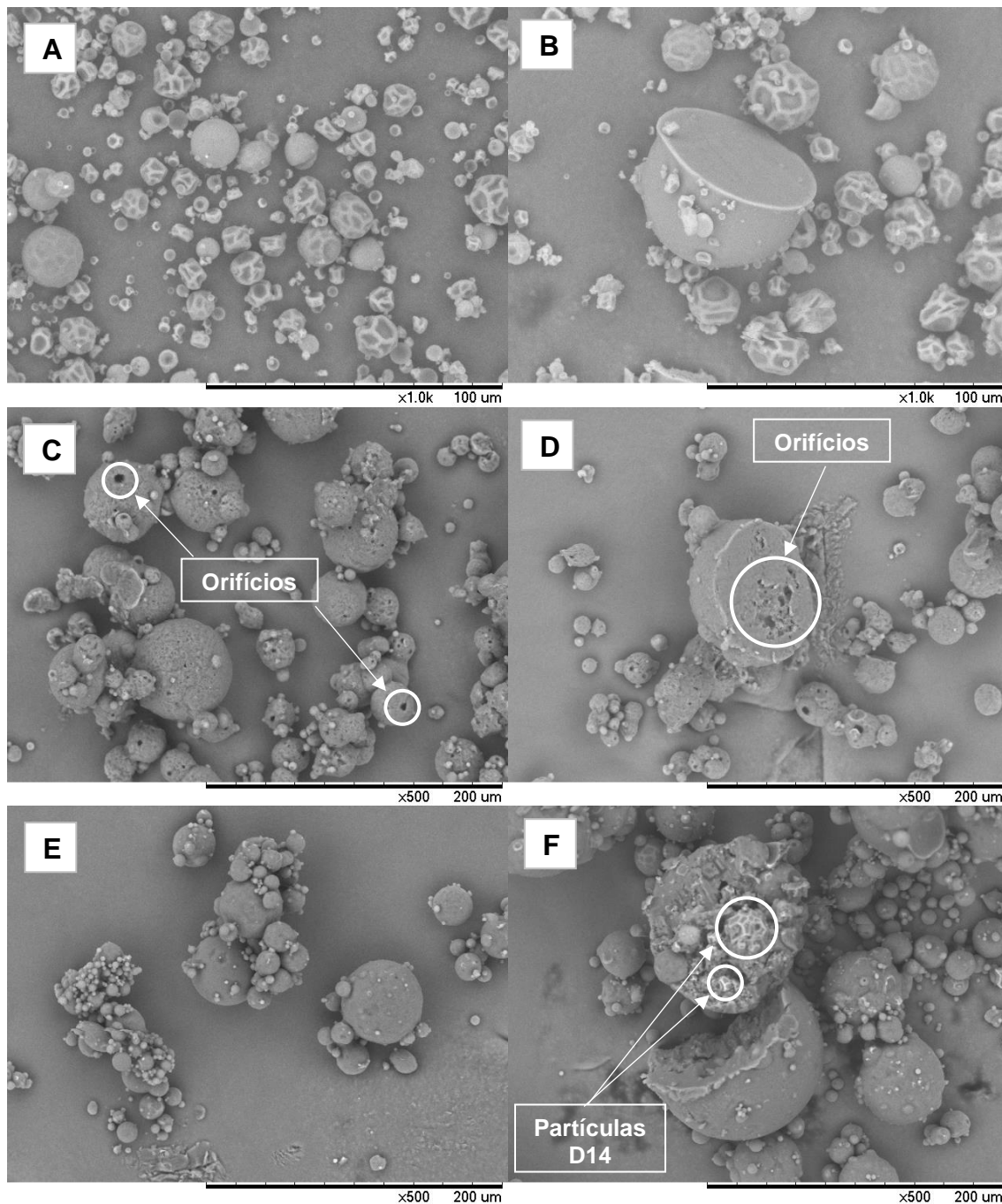
Já a Figura 10F mostra partículas D14 devidamente recobertas onde é possível observar que o recobrimento formou microesferas do tipo matriz com as partículas obtidas por *spray drying* distribuídas em todo seu volume. No entanto, não há indícios suficientes para afirmar que a técnica utilizada levou a produção de partículas do tipo reservatório (núcleo inteiramente recoberto pela parede), como cogitado já que parte da amostra D14 não foi devidamente recoberta.

Os resultados obtidos para a partícula D14 também foram observados por Silva et al. (2013) e Andrade et al. (2018) ao microencapsularem extrato de própolis por *spray drying*, os autores concluíram que as concavidades observadas podem ser resultado da rápida evaporação dos solventes presentes no fluido de alimentação do processo. Analisando os trabalhos citados, ainda é possível notar que a microencapsulação de extratos de diferentes própolis (verde, marrom e vermelha) e a utilização de goma arábica ou amido modificado como carreador não alteram significativamente a morfologia das partículas.

Pelissari et al. (2016) encapsularam licopeno por *spray chilling* e obtiveram partículas esféricas de diâmetros variados, com superfície áspera e porosa, sem rachaduras e formando pequenos aglomerados. Os autores também concluem que diferentes proporções de carreador:licopeno não alteram a morfologia das partículas e que a superfície porosa observada é resultado da matriz lipídica heterogênea utilizada no trabalho. Consoli et al. (2016) estudaram a produção de micropartículas de ácido gálico por *spray chilling* e observaram partículas esféricas, formando pequenos aglomerados, com orifícios e cristais em sua superfície. Os autores indicaram que os cristais observados foram resultado da diferença nos pontos de fusão dos lipídios que compuseram o carreador utilizado, e que os orifícios presentes nas partículas, provavelmente,

foram provenientes de bolhas formadas no processo de homogeneização da dispersão utilizada na alimentação no processo.

Figura 10 - Micrografias obtidas pela técnica de microscopia eletrônica de varredura das partículas



Fonte: Autoria própria

* Onde A e B correspondem a amostra, obtida por *spray drying* na proporção 1:4 (D14) extrato e carreador, apresentada de forma íntegra e cortada, respectivamente. C e D correspondem a amostra, obtida por *spray chilling* na proporção 1:4 (C14) de extrato e carreador, apresentada de forma íntegra e cortada, respectivamente. E e F

correspondem a amostra A (D14), recoberta por *spray chilling* na proporção 1:4 (D14R14) de partícula e carreador, apresentada de forma íntegra e cortada, respectivamente.

Partículas lisas, sem poros, rachaduras, orifícios ou descontinuidades em sua superfície são ideais para garantir a menor permeabilidade ao oxigênio e, conseqüentemente melhor proteção aos compostos bioativos encapsulados (SILVA et al., 2013; ANDRADE et al., 2018). Neste contexto, o estudo da morfologia se faz necessário para elucidar a natureza das partículas obtidas e identificar características desfavoráveis que possam ser evitadas ou minimizadas através de mudanças nos parâmetros de processo ou nas técnicas de microencapsulação, visando sempre a obtenção de partículas que possam conferir maior proteção aos compostos de interesse.

Os pós obtidos no presente estudo apresentaram morfologias típicas dos processos utilizados, com destaque para a técnica de recobrimento que ainda é pouco explorada e cuja análise de morfologia por microscopia eletrônica de varredura ainda não havia sido demonstrada em estudos anteriores.

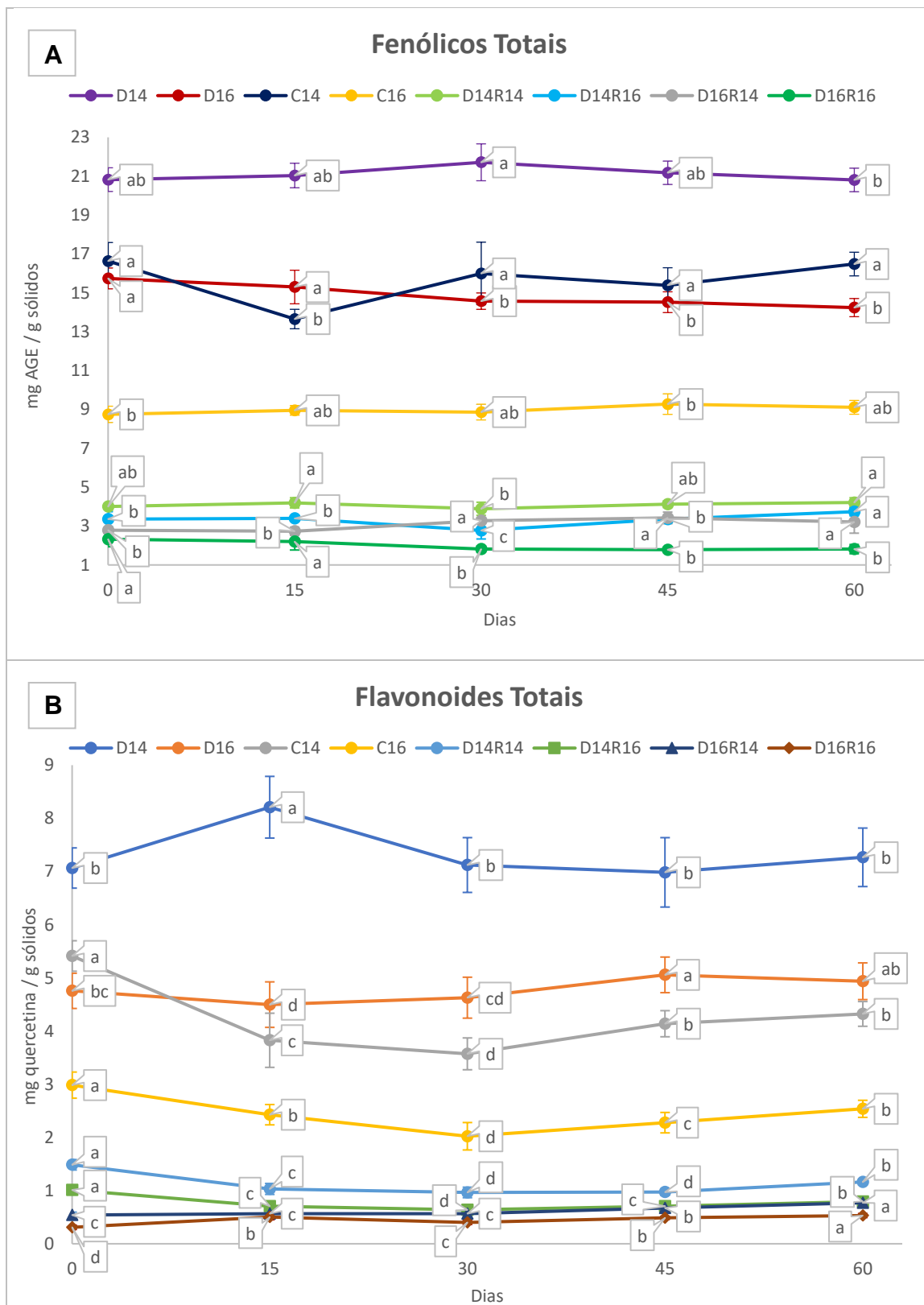
6.4 Estabilidade durante a estocagem

6.4.1 Teor de fenólicos e flavonoides totais

Para ser considerado útil na aplicação de formulações alimentícias e/ou farmacêuticas, é necessário que as partículas produzidas sejam capazes de manter os compostos bioativos da própolis vermelha protegidos durante o armazenamento. Dessa forma, as partículas foram armazenadas por 60 dias em ambiente controlado, conforme descrito no item 5.4, tendo o teor de fenólicos e flavonoides totais avaliados a cada 15 dias. Os valores encontrados estão expressos na Figura 11.

O teor de fenólicos totais entre as partículas variou de 21,72 a 1,79 mg AGE / g matéria seca e o teor de flavonoides totais variou de 8,21 a 0,31 mg quercetina / g matéria seca. Os valores encontrados estão diretamente relacionados com a proporção de extrato em cada partícula, assim sendo, partículas com maior proporção de extrato foram as que apresentaram maior teor de compostos fenólicos e flavonoides totais.

Figura 11 - Estabilidade dos compostos fenólicos e dos flavonoides durante a estocagem das partículas



Médias seguidas por pelo menos uma letra em comum, para um mesmo tratamento, não diferem entre si pelo teste de Tukey (5% de significância)

*D14 e D16 referem-se as partículas obtidas por *spray drying* nas proporções 1:4 e 1:6 (núcleo:carreador), respectivamente.

**C14 e C16 referem-se as partículas obtidas por *spray chilling* nas proporções 1:4 e 1:6 (núcleo:carreador), respectivamente.

***D14R14 e D14R16 referem-se as partículas D14 recobertas por *spray chilling* nas proporções 1:4 e 1:6 (núcleo:carreador), respectivamente.

****D16R14 e D16R16 referem-se as partículas D16 recobertas por *spray chilling* nas proporções 1:4 e 1:6 (núcleo:carreador), respectivamente.

Quanto a estabilidade dos compostos com o tempo de armazenamento, observou-se comportamento relativamente constante tanto para fenólicos quanto para flavonoides totais durante os 60 dias, com algumas pequenas oscilações nos valores que podem ser decorrentes da variabilidade dos processos de extração e das metodologias de quantificação dos compostos analisados.

Silva et al. (2013), estudando a microencapsulação de própolis verde, identificaram que o tratamento com maior proporção de material de parede apresentou melhor proteção dos compostos fenólicos durante os 180 dias avaliados o que, segundo os autores, deve-se a alta eficiência de encapsulação e baixa quantidade de própolis livre na superfície do carreador.

Zhang et al. (2020) avaliando suco de oxicoco (cranberry) encapsulado por *spray drying* observaram oscilação no teor de fenólicos totais, antocianinas e capacidade antioxidante (DPPH) das partículas no decorrer de 12 semanas de armazenamento. Tsali; Goula (2018) microencapsularam extrato de bagaço de uva por *spray drying* e observaram variação 80 a 140% do teor de fenólicos totais ao longo de 45 dias de armazenamento. Sabendo que os compostos fenólicos abrangem um grupo grande de substâncias, ambos autores levantaram a possibilidade de que essas substâncias possam se degradar e/ou polimerizar, formando novos compostos fenólicos, que alterariam o resultado observado. Tais ponderações vão de encontro com os resultados encontrados por Bakowska-Barczak et al. (2011), que, examinando a estabilidade dos compostos fenólicos da groselha preta encapsulada por *spray drying*, observaram que enquanto o teor de antocianinas decaiu, o teor de fenólicos totais oscilou durante os 12 meses de armazenamento. Sabe-se também que o reagente Folin-Ciocalteu, utilizado na reação para a quantificação de fenólicos totais, também

pode reagir com outras substâncias redutoras interferindo na acuidade da resposta da análise.

Estudando as características de micropartículas de extrato de canela obtidas por *spray chilling*, Procopio et al. (2018) observaram que a microencapsulação favoreceu a proteção dos compostos bioativos quando comparado ao extrato livre durante armazenamento por 28 dias. Pelissari et al. (2016) avaliaram partículas de licopeno produzidas por *spray chilling* e armazenadas sob diferentes condições. Estes autores concluíram que condições de armazenamento sem oxigênio e em baixas temperaturas favorecem a estabilidade do composto. Além disso, os autores também observaram que maiores proporções de licopeno em relação ao carreador influenciaram negativamente na proteção do composto ao longo de 90 dias de armazenamento, indicando que muitas moléculas podem ter permanecido desprotegidas na superfície das partículas.

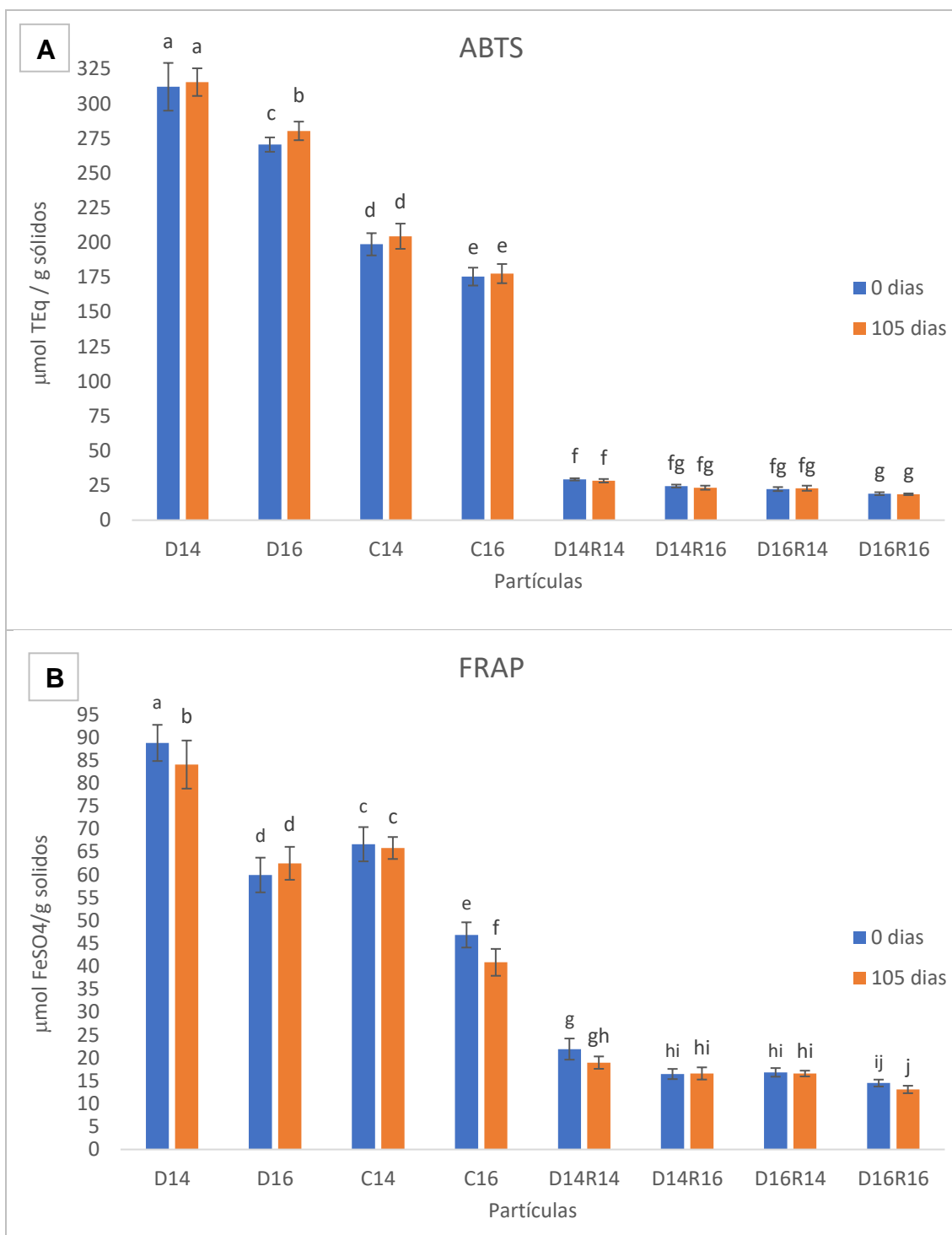
Os resultados observados no presente trabalho indicam que os processos de microencapsulação são capazes de proteger os compostos fenólicos e os flavonoides durante o armazenamento. O comportamento relativamente estável destes compostos durante o período analisado é coerente com os resultados observados na determinação da capacidade antioxidante das partículas (item 6.4.2) ao longo do período de estocagem, uma vez que a atividade antioxidante da própolis vermelha está relacionada com o perfil e o teor de fenólicos e flavonoides que compõem a resina.

6.4.2 Atividade antioxidante das partículas

A atividade antioxidante das partículas foi determinada pelos métodos de ABTS e FRAP com 0 e após 105 dias de armazenamento e os resultados encontrados estão demonstrados na Figura 12.

As partículas que apresentaram maiores atividades antioxidantes tanto pelo método ABTS (Figura 12A) quanto pelo método FRAP (Figura 12B) foram as partículas com maior proporção de extrato em relação a sua massa seca, conforme esperado. Quanto ao tempo de armazenagem, é possível notar que a atividade antioxidante se manteve significativamente constante, para a maioria dos tratamentos.

Figura 12 - Atividade antioxidante dos pós.



Médias seguidas por pelo menos uma letra em comum não diferem entre si pelo teste de Tukey (5% de significância)

*D14 e D16 referem-se as partículas obtidas por *spray drying* nas proporções 1:4 e 1:6 (núcleo:carreador), respectivamente.

**C14 e C16 referem-se as partículas obtidas por *spray chilling* nas proporções 1:4 e 1:6 (núcleo:carreador), respectivamente.

***D14R14 e D14R16 referem-se as partículas D14 recobertas por *spray chilling* nas proporções 1:4 e 1:6 (núcleo:carreador), respectivamente.

****D16R14 e D16R16 referem-se as partículas D16 recobertas por *spray chilling* nas proporções 1:4 e 1:6 (núcleo:carreador), respectivamente.

Utilizando técnica de *spray drying*, Silva et al. (2013) obtiveram melhores atividades antioxidante, utilizando o método DPPH, para as partículas com maior concentração de extrato em sua composição. Utilizando metodologia FRAP, Busch et al. (2017) observaram que a goma arábica foi o material de parede que retornou melhores atividades antioxidantes entre os estudados. Andrade et al. (2018) notaram que a microencapsulação de extrato de própolis vermelha utilizando goma arábica como carreador retornaram menores atividades antioxidante pelo método ABTS, no entanto retornaram maiores atividades antioxidante pelo método FRAP quando comparado com as partículas encapsuladas com maltodextrina. Os autores também demonstraram que o tipo de carreador impacta na retenção dos diferentes compostos fenólicos e flavonoides estudados, o que pode ajudar a explicar a diferença nas atividades antioxidantes observadas no estudo.

As técnicas utilizadas no presente estudo foram capazes de proteger os compostos antioxidantes presentes na própolis vermelha no tempo e condições estudadas (25 °C e 32,8% de UR) o que justificaria a microencapsulação do extrato, para aplicações onde a estabilidade destes compostos seja necessária.

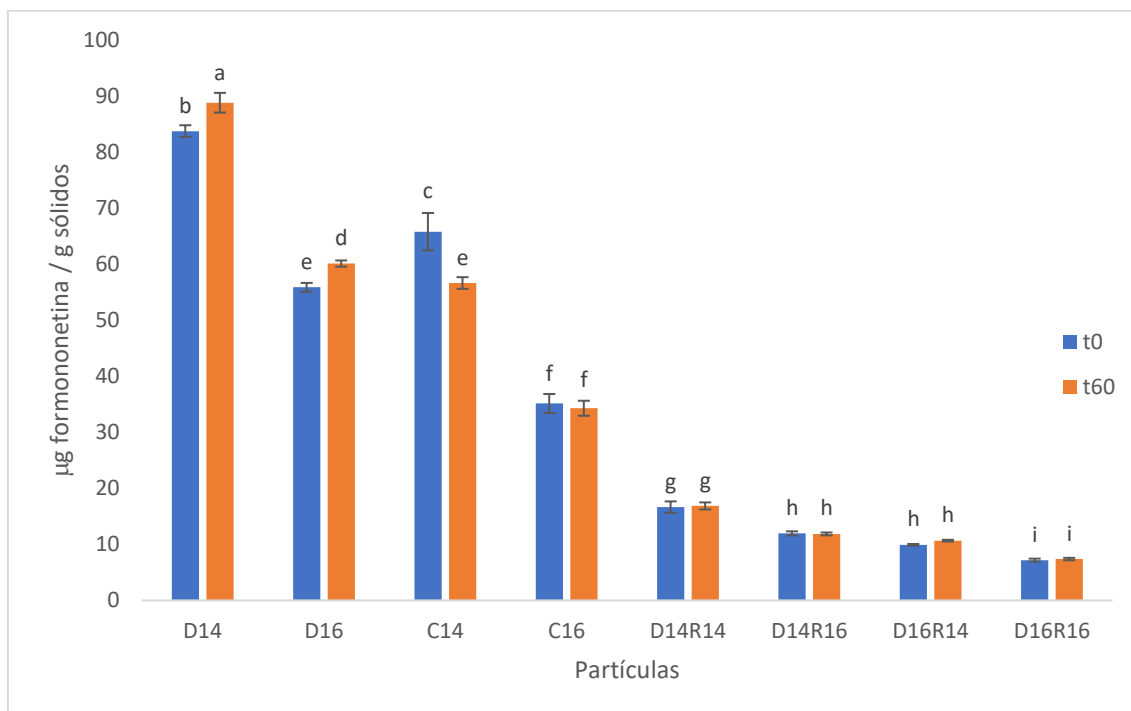
6.4.3 Determinação de formononetina nos pós obtidos

O teor de formononetina nos pós obtidos foi determinado no início e no final do ensaio de estabilidade (0 e 60 dias de armazenamento) e os resultados observados encontram-se expressos na Figura 13.

De forma geral os teores de formononetina mantiveram-se relativamente constantes nos pós durante os 60 dias, principalmente nos pós correspondentes ao tratamento C16 e das partículas recobertas, que são partículas com maior concentração de material de parede e que não apresentaram diferença significativa na atividade antioxidante durante o período estudado. Da mesma forma, por ser um isoflavonoide, ou seja, por pertencer ao grupo de compostos fenólicos e o subgrupo dos flavonoides, os resultados obtidos para formononetina vão de encontro aos teores relativamente constantes de fenólicos e flavonoides totais, obtidos no ensaio de estabilidade (item 6.4.1). Além disso, a formononetina é um potente antioxidante encontrado na própolis vermelha e

seu teor praticamente constante durante o período também vai de encontro com os valores observados para a atividade antioxidante dos pós (item 6.4.2) armazenados por 105 dias, que também se mantiveram relativamente estáveis ao longo do período.

Figura 13 - Teor de formononetina nos pós.



Médias seguidas por pelo menos uma letra em comum não diferem entre si pelo teste de Tukey (5% de significância)

*D14 e D16 referem-se as partículas obtidas por *spray drying* nas proporções 1:4 e 1:6 (núcleo:carreador), respectivamente.

**C14 e C16 referem-se as partículas obtidas por *spray chilling* nas proporções 1:4 e 1:6 (núcleo:carreador), respectivamente.

***D14R14 e D14R16 referem-se as partículas D14 recobertas por *spray chilling* nas proporções 1:4 e 1:6 (núcleo:carreador), respectivamente.

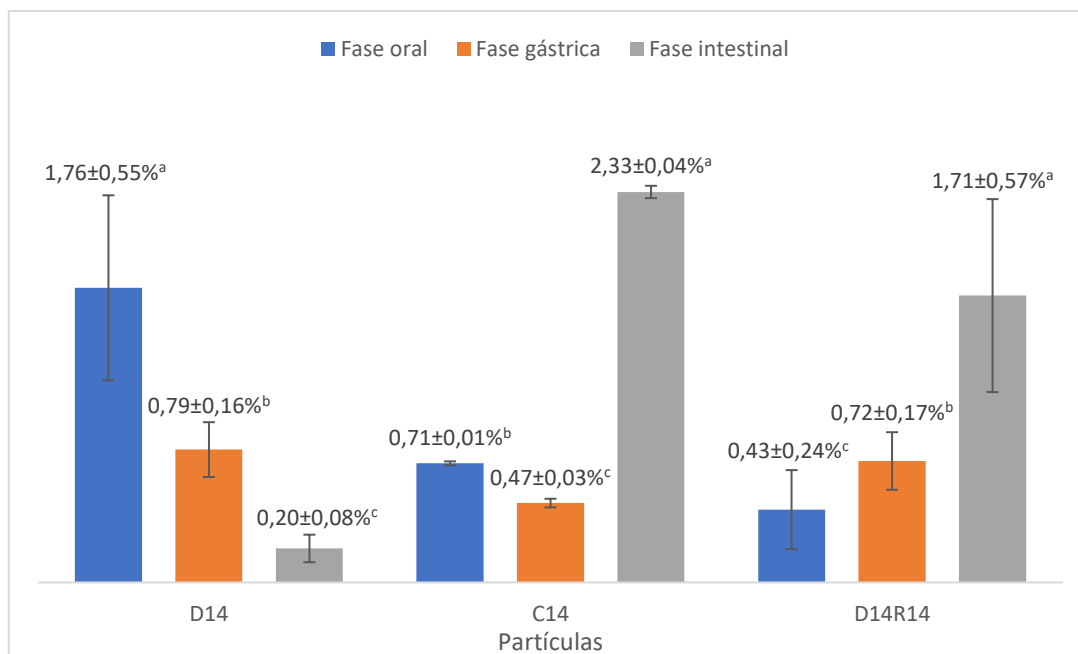
****D16R14 e D16R16 referem-se as partículas D16 recobertas por *spray chilling* nas proporções 1:4 e 1:6 (núcleo:carreador), respectivamente.

6.5 Ensaio de liberação da formononetina no sistema digestório

O estudo da liberação de compostos bioativos encapsulados é importante para entender como o método de microencapsulação altera a cinética de liberação dos compostos de interesse em condições gastrointestinais simuladas. Assim, o ensaio foi dividido em três partes, a primeira parte reproduziu as condições da fase oral, a segunda parte reproduziu as condições da fase gástrica e a terceira reproduziu as condições da fase intestinal do trato digestório

humano. Os resultados obtidos estão expressos em relação ao total de formononetina (item 6.4.3) observado para o dia de produção das partículas e são demonstrados na Figura 14.

Figura 14 - Ensaio de liberação de formononetina em sistema digestório simulado "in vitro", valores expressos em %.



Medias seguidas por pelo menos uma letra em comum, para um mesmo tratamento, não diferem-se entre si pelo teste de Tukey (5%)

*D14 e D16 referem-se as partículas obtidas por *spray drying* nas proporções 1:4 e 1:6 (núcleo:carreador), respectivamente.

**C14 e C16 referem-se as partículas obtidas por *spray chilling* nas proporções 1:4 e 1:6 (núcleo:carreador), respectivamente.

***D14R14 e D14R16 referem-se as partículas D14 recobertas por *spray chilling* nas proporções 1:4 e 1:6 (núcleo:carreador), respectivamente.

****D16R14 e D16R16 referem-se as partículas D16 recobertas por *spray chilling* nas proporções 1:4 e 1:6 (núcleo:carreador), respectivamente.

As partículas obtidas por *spray drying* apresentaram a maior liberação de formononetina na fase oral seguida de redução ao longo das fases gástrica e intestinal. Os resultados indicam que, para essas partículas, a liberação máxima ocorre na fase inicial do ensaio, isto porque a goma arábica é muito solúvel em água, e que, provavelmente, as demais fases não acarretam em maior liberação do composto estudado. Além disso, uma vez que entre as fases do ensaio são adicionadas soluções enzimáticas referentes a fase seguinte, as reduções nos teores de formononetina observados na fase gástrica e intestinal podem indicar a ocorrência de alguma interação entre as enzimas digestivas adicionadas

nessas fases e a formononetina de tal forma a reduzir o sinal detectado pela cromatografia líquida de alta eficiência ao longo do ensaio.

As partículas obtidas por *spray chilling* apresentaram liberação moderada de formononetina na fase oral seguida de redução na fase gástrica e um aumento significativo na fase intestinal. A liberação observada na fase oral pode ser decorrente das moléculas presentes na superfície das partículas. Já na fase gástrica parece não ter havido liberação e, novamente, observou-se uma redução nos valores observados. Na fase final do ensaio foi onde ocorreu a maior liberação de formononetina das partículas, provavelmente, devido a ação das lipases intestinais que promovem sua digestão, promovendo a liberação da formononetina presente no interior das partículas e dos sais biliares que promoveram a emulsão da gordura.

As partículas recobertas apresentaram uma menor liberação de formononetina na fase oral, seguiu-se de um aumento na fase gástrica e um novo acréscimo na fase intestinal. Tudo indica que a liberação observada na fase oral é decorrente da fração de partículas D14 que não foram devidamente recobertas, característica evidenciada nas análises de morfologia e distribuição de tamanho de partícula (itens 6.3.5 e 6.3.4, respectivamente). A liberação na fase gástrica pode ser decorrente da dissolução da goma arábica presente na superfície da partícula recoberta e que estavam menos disponíveis a liberação no curto tempo em que se passa a fase oral. Já a liberação máxima observada para essa partícula também ocorreu na fase intestinal, onde a ação dos sais biliares e das lipases intestinais sobre a gordura que recobre os pós podem ter tornado as partículas D14 mais disponíveis à dissolução e consequente liberação da formononetina.

Morais (2020) estudou a digestão de extrato de própolis vermelha seco por liofilização e observou redução de 65% e 71% do teor de fenólicos totais nas fases gástrica e intestinal, respectivamente, em relação ao extrato não digerido. O mesmo autor também quantificou a liberação de seis flavonoides específicos, dentre eles a formononetina, e notou redução da liberação de 7,47% na fase gástrica para 2,13% na fase intestinal. Yen et al. (2017) estudaram a digestão simulada *in vitro* de extrato de própolis marrom liofilizado e observaram redução na liberação de fenólicos e flavonoides totais nas fases gástrica e intestinal que

os autores atribuíram a possíveis interações enzimáticas com as moléculas analisadas.

Righi et al. (2019) microencapsularam extrato de mirtilo por *spray drying* e observaram que a concentração de antocianina, um composto fenólico, foi reduzida entre as fases oral, gástrica e intestinal, em sistema gastrointestinal simulado, no entanto os pesquisadores também evidenciaram que a redução na concentração das antocianinas foi menos pronunciada no extrato encapsulado com maltodextrina quando comparado ao extrato livre. Saikia et al. (2015) estudaram a microencapsulação de extrato de resíduo de carambola por *spray drying* e observaram redução no conteúdo de fenólicos totais nas fases gástrica e intestinal em ensaio de liberação *in vitro*. Os resultados encontrados pelos autores se assemelham aos observados para as partículas D14 analisadas no presente trabalho.

Silva et al. (2019) estudaram a produção e caracterização de partículas de extrato de semente de guaraná obtidas por *spray chilling*. Os autores realizaram o ensaio de liberação simulada com o extrato livre e notaram queda do teor de compostos fenólicos ao longo da análise. No entanto, ao encapsular o extrato, notaram que a liberação dos compostos fenólicos foi aumentando ao longo do tempo, tendo sua liberação máxima na fase intestinal do ensaio. Também foi possível observar que, ao passar da fase gástrica para a fase intestinal, o teor de flavonoides decrescia ligeiramente em todos os tratamentos antes de voltar a subir e alcançar seu máximo. Além disso, os autores concluíram que as partículas com maiores proporções de carreador, apesar de apresentar o mesmo perfil de liberação, apresentaram menor liberação total no final do ensaio, quando comparada as demais. Os resultados observados pelos autores citados se assemelham bastante aos encontrados no presente trabalho.

Por fim, é importante ressaltar que diversos fatores podem afetar a liberação de um composto durante o ensaio como o peso molecular, capacidade espessante, solubilidade e facilidade de ruptura mecânica do carreador utilizado na partícula, afinidade do núcleo com o carreador e possíveis interações com as soluções digestivas, permeabilidade, variações de pH e temperatura durante o ensaio, homogeneidade da amostra, correta interrupção da ação enzimática, retirada e purificação das alíquotas e metodologia de análise dos compostos

também são fatores que podem causar variações significativas nos resultados (RIGHI et al., 2019; MORAIS, 2020; SILVA et al., 2019).

7 CONCLUSÃO

Inicialmente concluiu-se que a obtenção do extrato de própolis vermelha em pó, sob as condições testadas, só é possível mediante a utilização de um coadjuvante de processo, ou seja, é necessário realizar a microencapsulação do material. Essa descoberta levanta diversas questões a respeito do processo de microencapsulação mais adequado, coadjuvante e parâmetros de processos a serem utilizados e cuja resposta vai depender exclusivamente da aplicação a que se destina as partículas.

Não ficou evidente que o recobrimento das partículas obtidas por *drying* propicia a obtenção de partículas do tipo reservatório.

No presente trabalho foi possível notar que as partículas que apresentaram melhores resultados em termos de preservação dos compostos bioativos foram as partículas recobertas seguidas das partículas D16 e C16. Além disso, as partículas obtidas, por apresentarem características bem distintas entre si podem ser aplicadas em diferentes produtos como balas e gomas de mascar, iogurtes, sorvetes, hambúrguer e embutidos cárneos, produtos de panificação, creme dental, pomadas ou em capsulas como suplemento alimentar. No entanto, são necessários mais estudos para verificar se a aplicação das partículas não altera significativamente características do produto como viscosidade, textura, cor, aroma e aparência global resultando em uma baixa aceitação do produto.

Por fim, foi possível concluir que as partículas de extrato de própolis vermelha obtidas por *spray drying*, *spray chilling* e pela combinação das técnicas apresentam características interessantes que somadas as demais vantagens dos processos de encapsulação, como maiores facilidades de manuseio, transporte, armazenagem e incorporação em formulações, podem justificar sua aplicação como ingrediente em formulações farmacológicas ou alimentícias.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUIAR, C. L. et al. Caracterização físico-química das própolis originárias da região Mata Atlântica do Estado de Alagoas. **Mensagem Doce**, v. 27, p. 15–21, 2003.

AIZPURUA-OLAIZOLA, O. et al. Microencapsulation and storage stability of polyphenols from *Vitis vinifera* grape wastes. **Food Chemistry**, v. 190, p. 614–621, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.05.117>. Acesso em: 25 fev. 2020.

ALEHOSSEINI, A. et al. Stabilization of a saffron extract through its encapsulation within electrospun/electrosprayed zein structures. **Lwt**, v. 113, n. June, p. 108280, 2019a. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108280>. Acesso em: 25 fev. 2020.

ALEHOSSEINI, A. et al. Electro-encapsulation of *Lactobacillus casei* in high-resistant capsules of whey protein containing transglutaminase enzyme. **Lwt**, v. 102, n. December 2018, p. 150–158, 2019b. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.12.022>. Acesso em: 25 fev. 2020.

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

ALMEIDA, E. B. et al. The incorporation of Brazilian propolis into collagen-based dressing films improves dermal burn healing. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 147, n. 2, p. 419–425, 2013. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2013.03.031>. Acesso em: 25 fev. 2020.

ÁLVAREZ-HENAO, M. V. et al. Microencapsulation of lutein by spray-drying: Characterization and stability analyses to promote its use as a functional ingredient. **Food Chemistry**, v. 256, p. 181–187, 1 ago. 2018.

ALVIM, I. D. et al. Comparison between the spray drying and spray chilling microparticles contain ascorbic acid in a baked product application. **LWT - Food Science and Technology**, v. 65, p. 689–694, 1 jan. 2016.

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, n. September, p. 129–138, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2017.08.066>>. Acesso em: 04 jan. 2022

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, n. April, p. 278–287, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.04.048>. Acesso em: 09 jan. 2022.

ANJUM, S. I. et al. Composition and functional properties of propolis (bee glue): A review. **Saudi Journal of Biological Sciences**, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2018.08.013>. Acesso em: 14 jan. 2020.

ARIYARATHNA, I. R.; KARUNARATNE, D. N. Microencapsulation stabilizes curcumin for efficient delivery in food applications. **Food Packaging and Shelf Life**, v. 10, p. 79–86, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fpsl.2016.10.005>. Acesso em: 25 fev. 2020.

ARPAGAUS, C. et al. Nano spray drying for encapsulation of pharmaceuticals. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 546, n. 1–2, p. 194–214, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2018.05.037>. Acesso em: 27 fev. 2020.

ARSLAN-TONTUL, S.; ERBAS, M. Single and double layered microencapsulation of probiotics by spray drying and spray chilling. **Lwt**, v. 81, p. 160–169, 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2017.03.060>. Acesso em: 25 fev. 2020.

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**, v. 10, n. 1, p. 103–131, 2019.

AWALE, S. et al. Constituents of Brazilian red propolis and their preferential cytotoxic activity against human pancreatic PANC-1 cancer cell line in nutrient-deprived condition. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 16, n. 1, p. 181–189, 2008.

BAKOWSKA-BARCZAK, A. M.; KOLODZIEJCZYK, P. P. Black currant polyphenols: Their storage stability and microencapsulation. **Industrial Crops and Products**, v. 34, n. 2, p. 1301–1309, 2011.

BALASSA, L. L.; FANGER, G. O.; WURZBURG, O. B. Microencapsulation in the food industry. **C R C Critical Reviews in Food Technology**, v. 2, n. 2, p. 245–265, 1971. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/10408397109527123>. Acesso em: 25 fev. 2020.

BALDIN, J. C. et al. Microencapsulated jabuticaba (*Myrciaria cauliflora*) extract added to fresh sausage as natural dye with antioxidant and antimicrobial activity. **Meat Science**, v. 118, p. 15–21, 1 ago. 2016. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27016672>. Acesso em: 27 fev. 2020.

BALDIN, J. C. et al. Effect of microencapsulated Jabuticaba (*Myrciaria cauliflora*) extract on quality and storage stability of mortadella sausage. **Food Research International**, v. 108, p. 551–557, 1 jun. 2018. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29735090>. Acesso em: 27 fev. 2020.

BAMPI, G. B. et al. Spray Chilling Microencapsulation of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* and Its Use in the Preparation of Savory Probiotic Cereal Bars. **Food and Bioprocess Technology**, v. 9, n. 8, p. 1422–1428, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/s11947-016-1724-z>. Acesso em: 25 fev. 2020.

BARRIENTOS, M. **Obtenção, caracterização, encapsulação e aplicação do extrato de vitex (*Vitex agnus castus* L.)**. 2017. 127 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.11606/D.74.2018.tde-25052018-083920>. Acesso em: 16 jul. 2019.

BEGNINI, K. R. et al. Brazilian red propolis induces apoptosis-like cell death and decreases migration potential in bladder cancer cells. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2014, 2014.

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, jul. 1996. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0003269796902924>. Acesso em: 16 jul. 2019.

BETZ, M.; KULOZIK, U. Microencapsulation of bioactive bilberry anthocyanins by means of whey protein gels. **Procedia Food Science**, v. 1, p. 2047–2056, 2011. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.profoo.2011.10.006>. Acesso em: 25 fev. 2020.

BEZERRA, A. M. F. *et al.* Red propolis antifungal action on species of candida of the oral cavity. **International Archives of Medicine**, London, v. 8, n. 136, p. 1–9, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.3823/1735>. Acesso em: 24 fev. 2020.

BISPO JUNIOR, W. *et al.* Antimicrobial activity of fractions of red propolis from Alagoas, Brazil. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 33, n. 1, p. 3–10, 2012.

BRASILEIRO, J. S. L. **Microencapsulação de compostos bioativos: inovação em diferentes áreas**. 2011. 71 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade Fernando Pessoa, Porto, 2011. Disponível em: https://bdigital.ufp.pt/bitstream/10284/2457/3/TM_15548.pdf. Acesso em: 03 fev. 2019.

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, 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. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jf305468f>. Acesso em: 20 set. 2019.

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

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

CARVALHO, J. D. dos S. et al. Characterization of ascorbic acid microencapsulated by the spray chilling technique using palm oil and fully hydrogenated palm oil. **LWT**, v. 101, p. 306–314, 1 mar. 2019.

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

CASTRO-ROSAS, J. et al. Recent advances in microencapsulation of natural sources of antimicrobial compounds used in food - A review. **Food Research International**, v. 102, n. May, p. 575–587, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.09.054>. Acesso em: 25 fev. 2020.

CAVENDISH, R. L. et al. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of Brazilian red propolis extract and formononetin in rodents. **Journal of Ethnopharmacology**, Amsterdam, v. 173, p. 127–133, 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2015.07.022>. Acesso em: 25 fev. 2020.

COLÍN-CRUZ, M. A. et al. Co-encapsulation of bioactive compounds from blackberry juice and probiotic bacteria in biopolymeric matrices. **Lwt**, v. 110, n. April, p. 94–101, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.04.064>. Acesso em: 25 fev. 2020.

COMUNIAN, T. A. et al. Microencapsulation of ascorbic acid by complex coacervation: Protection and controlled release. **Food Research International**, v. 52, n. 1, p. 373–379, 2013. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2013.03.028>. Acesso em: 25 fev. 2020.

COMUNIAN, T. A. et al. Effect of different polysaccharides and crosslinkers on echium oil microcapsules. **Carbohydrate Polymers**, v. 150, p. 319–329, 2016a.

COMUNIAN, T. A. et al. Protection of echium oil by microencapsulation with phenolic compounds. **Food Research International**, v. 88, p. 114–121, 2016b. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2016.03.008>. Acesso em: 25 fev. 2020.

COMUNIAN, T. A. et al. Development of functional yogurt containing free and encapsulated echium oil, phytosterol and sinapic acid. **Food Chemistry**, v. 237, p. 948–956, 2017a. Disponível em:

<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.06.071>. Acesso em: 25 fev. 2020.

COMUNIAN, T. A. et al. Improving oxidative stability of echium oil emulsions fabricated by Microfluidics: Effect of ionic gelation and phenolic compounds. **Food Chemistry**, v. 233, p. 125–134, 2017b. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.04.085>. Acesso em: 25 fev. 2020.

COMUNIAN, T. A. et al. Enhancing stability of echium seed oil and beta-sitosterol by their coencapsulation by complex coacervation using different combinations of wall materials and crosslinkers. **Food Chemistry**, v. 252, n. August 2017, p. 277–284, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.01.121>. Acesso em: 25 fev. 2020.

COMUNIAN, T. A. et al. Echium oil with oxidative stability increased by emulsion preparation in the presence of the phenolic compound sinapic acid followed by dehydration by spray and freeze drying processes. **Journal of Food Science and Technology**, New Delhi, v. 56, n. 3, p. 1155–1164, 2019.

CONSOLI, L. et al. Gallic acid microparticles produced by spray chilling technique: production and characterization. **LWT - Food Science and Technology**, Amsterdam, v. 65, p. 79–87, Jan. 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2015.07.052>. Acesso em: 27 fev. 2020.

DALEPRANE, J. B. et al. Anti-atherogenic and anti-angiogenic activities of polyphenols from propolis. **Journal of Nutritional Biochemistry**, New York, v. 23, n. 6, p. 557–566, 2012. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jnutbio.2011.02.012>. Acesso em: 27 jun. 2019.

DAMODARAN, S.; PARKIN, K. L.; FENNEMA, O. R. **Química de alimentos de Fennema**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.

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

DAZA, L. D. et al. Effect of spray drying conditions on the physical properties of Cagaita (*Eugenia dysenterica* DC.) fruit extracts. **Food and Bioproducts Processing**, United Kingdom, v. 97, p. 20–29, Jan. 2016.

DAZA, L. D. *et al.* Functional properties of encapsulated Cagaita (*Eugenia dysenterica* DC.) fruit extract. **Food Bioscience**, Amsterdam, v. 18, p. 15–21, June 2017.

DESAI, K. G. H.; PARK, H. J. Preparation and characterization of drug-loaded chitosan-tripolyphosphate microspheres by spray drying. **Drug Development Research**, New York, v. 64, n. 2, p. 114–128, 2005.

DIAS, M. I.; FERREIRA, I. C. F. R.; BARREIRO, M. F. Microencapsulation of bioactives for food applications. **Food and Function**, Cambridge, v. 6, n. 4, p. 1035–1052, 2015.

DOTA, K. F. B. *et al.* Antifungal activity of brazilian propolis microparticles against yeasts isolated from vulvovaginal candidiasis. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, New York, v. 2011, art. 201953, 2011.

DURU, I. A. Comparative phytochemical analysis of brown, green and red propolis from Umudike, Abia State Nigeria. **Advanced Journal of Chemistry – Section B**, Iran, v. 3, n. 1, p. 86-97, 2021. Disponível em: http://www.ajchem-b.com/article_121910.html. Acesso em: 31 jan. 2022.

DUTRA, J. M.; ESPITIA, P. J. P.; BATISTA, R. A. Formononetin: biological effects and uses – a review. **Food Chemistry**, Oxford, v. 359, art. 129975, Mar. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.129975>. Acesso em: 04 jan. 2022.

ERSUS, S.; YURDAGEL, U. Microencapsulation of anthocyanin pigments of black carrot (*Daucus carota* L.) by spray drier. **Journal of Food Engineering**, Amsterdam, v. 80, n. 3, p. 805–812, 2007.

EVAGELIOU, V.; PANAGOPOULOU, E.; MANDALA, I. Encapsulation of EGCG and esterified EGCG derivatives in double emulsions containing whey protein isolate, bacterial cellulose and salt. **Food Chemistry**, Oxford, v. 281, n. January, p. 171–177, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.12.105>. Acesso em: 25 fev. 2020.

FADINI, A. L. *et al.* Innovative strategy based on combined microencapsulation technologies for food application and the influence of wall material composition.

LWT - Food Science and Technology, Amsterdam, v. 91, p. 345–352, May 2018.

FALCONE FERREYRA, M. L.; RIUS, S. P.; CASATI, P. Flavonoids: biosynthesis, biological functions, and biotechnological applications. **Frontiers in Plant Science**, Lausanne, v. 3, art. 22, p. 1-15, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fpls.2012.00222>. Acesso em: 27 jan. 2022.

FANG, Z.; BHANDARI, B. Spray drying of bioactives. *In*: ROOS, Y.; LIVNEY, Y. (Ed.) **Engineering foods for bioactives stability and delivery**. New York, NY: Springer, 2017. p. 261–284. (Food Engineering Series). Disponível em: https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6595-3_10. Acesso em: 27 fev. 2020.

FAVARO-TRINDADE, C.; OKURO, P.; MATOS, F. Encapsulation via spray chilling/cooling/congealing. *In*: MISHRA, M. (Ed.) **Handbook of encapsulation and controlled release**, Abingdon: CRC, 2016. p. 71–87.

FÁVARO-TRINDADE, C. S.; PINHO, S. C.; ROCHA, G. A. Revisão: microencapsulação de ingredientes alimentícios. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 11, n. 2, p. 103–112, 2008.

FAVARO-TRINDADE, C. S. *et al.* The use of spray drying technology to reduce bitter taste of casein hydrolysate. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v. 24, n. 4, p. 336–340, 2010. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2009.10.012>. Acesso em: 27 fev. 2020.

FERNANDES, R. V. B. *et al.* Cashew gum and inulin: new alternative for ginger essential oil microencapsulation. **Carbohydrate Polymers**, London, v. 153, p. 133–142, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.07.096>. Acesso em: 25 fev. 2020.

FREIRES, I. A.; 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**, Paris, v. 110, p. 267–279, Mar. 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2016.01.033>. Acesso em: 19 set. 2019.

FUJITA, A. *et al.* Effects of spray-drying parameters on in vitro functional properties of camu-camu (*Myrciaria dubia* Mc. Vaugh): a typical amazonian fruit.

Journal of Food Science, Malden, v. 82, n. 5, p. 1083–1091, May 2017. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28329408>. Acesso em: 27 fev. 2020.

GHARSALLAOUI, A. *et al.* Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: an overview. **Food Research International**, Amsterdam, v. 40, n. 9, p. 1107–1121, 2007.

GHATAK, D.; IYYASWAMI, R. Selective encapsulation of quercetin from dry onion peel crude extract in reassembled casein particles. **Food and Bioprocess Processing**, United Kingdom, v. 115, p. 100–109, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2019.03.003>. Acesso em: 25 fev. 2020.

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

GOMEZ-ESTACA, J. *et al.* Encapsulation of an astaxanthin-containing lipid extract from shrimp waste by complex coacervation using a novel gelatin-cashew gum complex. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v. 61, p. 155–162, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.05.005>. Acesso em: 14 jan. 2020.

GOMEZ-ESTACA, J. *et al.* Physico-chemical properties, stability, and potential food applications of shrimp lipid extract encapsulated by complex coacervation. **Food and Bioprocess Technology**, New York, v. 11, n. 8, p. 1596–1604, 2018.

GOMEZ-MASCARAQUE, L. G. *et al.* Optimization of electrospraying conditions for the microencapsulation of probiotics and evaluation of their resistance during storage and in-vitro digestion. **LWT - Food Science and Technology**, Amsterdam, v. 69, p. 438–446, 2016.

HONORATO, T. C. *et al.* Aditivos alimentares: aplicações e toxicologia. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, Pombal, v. 8, n. 5, p. 1-11, 2013. Disponível em: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=7404578&info=resumen&idioma=ENG>. Acesso em: 28 jan. 2022.

IDHAM, Z.; MUHAMAD, I. I.; SARMIDI, M. R. Degradation kinetics and color stability of spray-dried encapsulated anthocyanins from *Hibiscus sabdariffa* L.

Journal of Food Process Engineering, Malden, v. 35, n. 4, p. 522–542, Aug. 2012. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1745-4530.2010.00605.x>. Acesso em: 31 jan. 2022.

IIO, A. *et al.* Ethanolic extracts of Brazilian red propolis promote adipocyte differentiation through PPAR γ activation. **Phytomedicine**, Stuttgart, v. 17, n. 12, p. 974-979, 2010. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.phymed.2010.03.001>. Acesso em: 25 fev. 2020.

IIO, A. *et al.* Ethanolic extracts of Brazilian red propolis increase ABCA1 expression and promote cholesterol efflux from THP-1 macrophages. **Phytomedicine**, Stuttgart, v. 19, n. 5, p. 383–388, 2012. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.phymed.2011.10.007>. Acesso em: 25 fev. 2020.

ILIĆ, I. *et al.* Microparticle size control and glimepiride microencapsulation using spray congealing technology. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 381, n. 2, p. 176–183, Nov. 2009. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378517309002932>. Acesso em: 27 fev. 2020.

JANISZEWSKA-TURAK, E. Carotenoids microencapsulation by spray drying method and supercritical micronization. **Food Research International**, Amsterdam, v. 99, p. 891–901, 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2017.02.001>. Acesso em: 14 jan. 2020.

KHA, T. C.; NGUYEN, M. H.; ROACH, P. D. Effects of spray drying conditions on the physicochemical and antioxidant properties of the Gac (*Momordica cochinchinensis*) fruit aril powder. **Journal of Food Engineering**, Amsterdam, v. 98, n. 3, p. 385–392, June 2010.

KHALILIAN MOVAHHED, M.; MOHEBBI, M. Spray drying and process optimization of carrot-celery juice. **Journal of Food Processing and Preservation**, Hoboken, v. 40, n. 2, p. 212–225, Apr. 2016. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1111/jfpp.12598>. Acesso em: 27 fev. 2020.

KOO, H. *et al.* Effect of neovestitol – vestitol containing Brazilian red propolis on accumulation of biofilm in vitro and development of dental caries in vivo. **Biofouling**, Amsterdam, v. 7014, p. 1233–1242, 2013. Disponível em:

<http://dx.doi.org/10.1080/08927014.2013.834050>. Acesso em: 25 fev. 2020.

KUANG, S. S.; OLIVEIRA, J. C.; CREAN, A. M. Microencapsulation as a tool for incorporating bioactive ingredients into food. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Philadelphia, v. 50, n. 10, p. 951-968, 2010.

LEE, S. J.; WONG, M. Nano- and microencapsulation of phytochemicals. *In*: KWAK, H.-S. (Ed.) **Nano- and microencapsulation for foods**. New York: John Wiley & Sons, 2014. cap. 6, p. 117-165.

LÓPEZ, B. G. C. *et al.* Phytochemical markers of different types of red propolis. **Food Chemistry**, Oxford, v. 146, p. 174–180, 2014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.09.063>. Acesso em: 14 jan. 2020.

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**, San Francisco, v. 11, n. 1, art. E0145954, p. 1–26, 2016. Disponível em: <https://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0145954>. Acesso em: 24 fev. 2020.

MARQUELE, F. D. *et al.* Spray-dried propolis extract. I: physicochemical and antioxidant properties. **Pharmazie**, Munchen, v. 61, n. 4, p. 325–330, 2006.

MARTINEZ, R. C. R. *et al.* Assessment of the inhibitory effect of free and encapsulated commercial nisin (Nisaplin®), tested alone and in combination, on *Listeria monocytogenes* and *Bacillus cereus* in refrigerated milk. **LWT - Food Science and Technology**, Amsterdam, v. 68, p. 67–75, May 2016.

MATOS, E. F.; SCOPEL, B. S.; DETTMER, A. Citronella essential oil microencapsulation by complex coacervation with leather waste gelatin and sodium alginate. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, Amsterdam, v. 6, n. 2, p. 1989–1994, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jece.2018.03.002>. Acesso em: 25 fev. 2020.

MATOS, F. E. *et al.* Aplicação de vitamina C livre e encapsulada por spray chilling em salsicha de carne de frango: características físico-químicas, estabilidade e aceitação sensorial. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v. 18, n. 4, p. 322–331, 2015.

MATOS-JR, F. E. *et al.* Evaluation of the viability and the preservation of the functionality of microencapsulated *Lactobacillus paracasei* BGP1 and *Lactobacillus rhamnosus* 64 in lipid particles coated by polymer electrostatic interaction. **Journal of Functional Foods**, Amsterdam, v. 54, p. 98–108, Mar. 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jff.2019.01.006>. Acesso em: 27 fev. 2020.

MATOS-JR, F. E. *et al.* Development and characterization of solid lipid microparticles loaded with ascorbic acid and produced by spray congealing. **Food Research International**, Amsterdam, v. 67, p. 52–59, jan. 2015.

MATOS-JR, F. E. *et al.* Effect of feed preparation on the properties and stability of ascorbic acid microparticles produced by spray chilling. **LWT - Food Science and Technology**, Amsterdam, v. 75, p. 251–260, jan. 2017.

MINEKUS, M. *et al.* A standardised static in vitro digestion method suitable for food-an international consensus. **Food and Function**, Cambridge, v. 5, n. 6, p. 1113–1124, 2014. Disponível em: <http://xlink.rsc.org/?DOI=C3FO60702J>. Acesso em: 16 jul. 2019.

MINOLTA. **Precise color communication: color control from feeling to instrumentation**. Ramsey: Minolta Corporation Instrument Systems Division, 1994. p. 49.

MORAES, C. S. *et al.* Comparative antiproliferation of human prostate cancer cells by ethanolic extracts of two groups of Brazilian propolis. **Food Science and Technology**, Campinas, v. 30, n. 2, p. 539–543, 2010.

MORAIS, D. V. **Transepithelial transport of isoflavonoids from Brazilian red propolis in Caco-2 cell monolayers**. 2020. 71 f. Tese (Doutorado) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2020.

MORAIS, D. V. *et al.* Active antioxidant phenolics from Brazilian red propolis: an optimization study for their recovery and identification by LC-ESI-QTOF-MS/MS. **Antioxidants**, Basel, v. 10, n. 2, p. 297, 2021.

NEVES, M. V. M. *et al.* Isoflavone formononetin from red propolis acts as a fungicide against *Candida* sp. **Brazilian Journal of Microbiology**, São paulo, v. 47, n. 1, p. 159–166, 2016. Disponível em:

<http://dx.doi.org/10.1016/j.bjm.2015.11.009>. Acesso em: 24 fev. 2020.

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

NOVAK, E. M. *et al.* Antitumoural activity of Brazilian red propolis fraction enriched with xanthochymol and formononetin: an in vitro and in vivo study. **Journal of Functional Foods**, Amsterdam, v. 11, n. C, p. 91–102, 2014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jff.2014.09.008>. Acesso em: 7 jan. 2022.

OKURO, P. K.; MATOS, F. E.; FAVARO-TRINDADE, C. S. Technological challenges for spray chilling encapsulation of functional food ingredients. **Food Technology and Biotechnology**, Zagreb, v. 51, n. 2, p. 171–182, 2013.

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**, Amsterdam, v. 77, n. 2, p. 208–213, 2011. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.seppur.2010.12.007>. Acesso em: 14 jan. 2020.

OLIVEIRA, M. S. **Desenvolvimento e caracterização de partículas sólidas carregadas com hidrolisado proteico obtidas por spray chilling**. 2014. 66 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2014.

OLIVIERI, C. *et al.* Proteomic analysis identifies differentially expressed proteins after red propolis treatment in Hep-2 cells. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 63, p. 195–204, 2014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2013.11.003>. Acesso em: 25 fev. 2020.

ORIANI, V. B. *et al.* Solid lipid microparticles produced by spray chilling technique to deliver ginger oleoresin: structure and compound retention. **Food Research International**, Amsterdam, v. 80, p. 41–49, Feb. 2016.

ORIANI, V. B. *et al.* The influence of the storage temperature on the stability of lipid microparticles containing ginger oleoresin. **Food Research International**, Amsterdam, v. 109, p. 472–480, July 2018. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29803473>. Acesso em: 27 fev. 2020.

OSTROSCHI, L. C. *et al.* Production of spray-dried proanthocyanidin-rich cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum*) extract as a potential functional ingredient: improvement of stability, sensory aspects and technological properties. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v. 79, p. 343–351, June 2018.

PARAMERA, E. I.; KONTELES, S. J.; KARATHANOS, V. T. Stability and release properties of curcumin encapsulated in *Saccharomyces cerevisiae*, β -cyclodextrin and modified starch. **Food Chemistry**, Oxford, v. 125, n. 3, p. 913–922, 2011.

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

PARK, Y. K. *et al.* Estudo da preparação dos extratos de própolis e suas aplicações. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 18, n. 3, p. 313–318, Ago. 1998.

PAUCAR, O. C. *et al.* Production by spray chilling and characterization of solid lipid microparticles loaded with vitamin D3. **Food and Bioproducts Processing**, United Kingdom, v. 100, p. 344–350, Oct. 2016.

PAULO, F.; SANTOS, L. Design of experiments for microencapsulation applications: a review. **Materials Science and Engineering C**, Boca Raton, v. 77, p. 1327–1340, 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.msec.2017.03.219>. Acesso em: 25 fev. 2020.

PEDROSO, D. L. *et al.* Protection of *Bifidobacterium lactis* and *Lactobacillus acidophilus* by microencapsulation using spray-chilling. **International Dairy Journal**, Barking, v. 26, n. 2, p. 127–132, Oct. 2012.

PEDROSO, D. L. *et al.* Microencapsulation of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* and *Lactobacillus acidophilus* in cocoa butter using spray chilling technology. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 44, n. 3, p. 777–83, 2013. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24516445>. Acesso em: 27 fev. 2020.

PELLISSARI, J. R. *et al.* Production of solid lipid microparticles loaded with lycopene by spray chilling: structural characteristics of particles and lycopene stability. **Food and Bioproducts Processing**, United Kingdom, v. 98, p. 86–94,

2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fbp.2015.12.006>. Acesso em: 14 jan. 2020.

PEÑA, R. C. Propolis standardization: a chemical and biological review. **Ciencia e Investigacion Agraria**, Santiago, v. 35, p. 11–20, 2008.

PHAM-HOANG, B. N. *et al.* Strategies to improve carotene entry into cells of *Yarrowia lipolytica* in a goal of encapsulation. **Journal of Food Engineering**, Amsterdam, v. 224, p. 88–94, 2018.

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**, Easton, v. 59, n. 12, p. 6484–6491, 2011.

PIETTA, P. G. Flavonoids as antioxidants. **Journal of Natural Products**, Washington, v. 63, n. 7, p. 1035–1042, 2000.

PROCOPIO, F. R. *et al.* Solid lipid microparticles loaded with cinnamon oleoresin: characterization, stability and antimicrobial activity. **Food Research International**, Amsterdam, v. 113, n. July, p. 351–361, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.07.026>. Acesso em: 25 fev. 2020.

RAMAKRISHNAN, Y. *et al.* Effect of wall materials on the spray drying efficiency, powder properties and stability of bioactive compounds in tamarillo juice microencapsulation. **Powder Technology**, Amsterdam, v. 328, p. 406–414, Apr. 2018.

RE, R. *et al.* Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology and Medicine**, New York, v. 26, n. 9–10, p. 1231–1237, May 1999. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0891584998003153>. Acesso em: 16 jul. 2019.

REIS, J. H. O. *et al.* Evaluation of the antioxidant profile and cytotoxic activity of red propolis extracts from different regions of northeastern Brazil obtained by conventional and ultrasoundassisted extraction. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 14, n. 7, p. 1–27, 2019.

RIBEIRO, E. P.; SERAVALLI, E. A. G. **Química de alimentos**. São Paulo: Edgard Blücher, 2004.

RIGHI, A. A. *et al.* Brazilian red propolis: unreported substances, antioxidant and antimicrobial activities. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, Oxford, v. 91, n. 13, p. 2363–2370, Oct. 2011. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1002/jsfa.4468>. Acesso em: 20 set. 2019.

RIGHI, J. *et al.* Food hydrocolloids microencapsulation of anthocyanin compounds extracted from blueberry (*Vaccinium* spp.) by spray drying: characterization, stability and simulated gastrointestinal conditions. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v. 89, p. 742–748, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.11.042>. Acesso em: 25 jan. 2022.

ROSENBERG, M.; TALMON, Y.; KOPELMAN, I. The microstructure of spray-dried microcapsules. **Food Structure**, Chicago, v. 7, n. 1, Jan. 1988. Disponível em: <https://digitalcommons.usu.edu/foodmicrostructure/vol7/iss1/14>. Acesso em: 27 fev. 2020.

RUFATTO, L. C. *et al.* Red propolis: chemical composition and pharmacological activity. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, Amsterdam, v. 7, n. 7, p. 591–598, 2017.

SAIKIA, S.; MAHNOT, N. K.; MAHANTA, C. L. Optimisation of phenolic extraction from *Averrhoa carambola* pomace by response surface methodology and its microencapsulation by spray and freeze drying. **Food Chemistry**, Oxford, v. 171, p. 144–152, 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.08.064>. Acesso em: 25 jan. 2022.

SANTOS, D. *et al.* Spray drying: an overview. *In*: PIGNATELLO, R.; MUSUMECI, T. (Ed.) **Biomaterials: physics and chemistry**. London: InTech, 2017. Disponível em: <https://www.intechopen.com/chapters/58222> doi: 10.5772/intechopen.72247. Acesso em: 28 jan. 2022.

SARTORI, T. *et al.* Ascorbic acid microencapsulation by spray chilling: production and characterization. **LWT - Food Science and Technology**, Amsterdam, v. 63, n. 1, p. 353–360, 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2015.03.112>. Acesso em: 25 fev. 2020.

SELVAMUTHUKUMARAN, M.; KHANUM, F. Optimization of spray drying process for developing seabuckthorn fruit juice powder using response surface methodology. **Journal of Food Science and Technology**, New Delhi, v. 51, n. 12, p. 3731–3739, Dec. 2014.

SHAHIDI, F.; HAN, X. Q. Encapsulation of food ingredients. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Philadelphia, v. 33, n. 6, p. 501–547, Jan. 1993.

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**, New York, v. 5, n. 3, p. 313–316, 2008.

SILVA, F. C. *et al.* Physicochemical properties, antioxidant activity and stability of spray-dried propolis. **Journal of ApiProduct and ApiMedical Science**, Cardiff, v. 3, n. 2, p. 94–100, 2011. Disponível em: <http://www.ibra.org.uk/articles/physicochemical-properties-antioxidant-activity-and-stability-of-spray-dried-propolis>. Acesso em: 14 jan. 2020.

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**, United Kingdom, v. 91, n. 1, p. 28–36, Jan. 2013. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fbp.2012.08.006>. Acesso em: 7 fev. 2022.

SILVA, J. C. *et al.* Antimicrobial activity, phenolic profile and role in the inflammation of propolis. **Food and Chemical Toxicology**, oxford, v. 50, n. 5, p. 1790–1795, 2012.

SILVA, M. L. C. *et al.* Phenolic compounds, carotenoids and antioxidant activity in plant products. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 31, n. 3, p. 669–681, 2010. Disponível em: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=445744097017>. Acesso em: 14 jan. 2020.

SILVA, M. P. *et al.* Microcapsules loaded with the probiotic *Lactobacillus paracasei* BGP-1 produced by co-extrusion technology using alginate/shellac as wall material: characterization and evaluation of drying processes. **Food Research International**, Amsterdam, v. 89, p. 582–590, 2016. Disponível em:

<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2016.09.008>. Acesso em: 25 fev. 2020.

SILVA, M. P. *et al.* Comparison of extrusion and co-extrusion encapsulation techniques to protect *Lactobacillus acidophilus* LA3 in simulated gastrointestinal fluids. **LWT - Food Science and Technology**, Amsterdam, v. 89, p. 392–399, 2018a. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.11.008>. Acesso em: 25 fev. 2020.

SILVA, M. P. *et al.* Application of spray chilling and electrostatic interaction to produce lipid microparticles loaded with probiotics as an alternative to improve resistance under stress conditions. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v. 83, p. 109–117, 2018b.

SILVA, M. P. *et al.* Production and characterization of solid lipid microparticles loaded with guaraná (*Paullinia cupana*) seed extract. **Food Research International**, Amsterdam, v. 123, p. 144–152, Sept. 2019. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S096399691930287X?via%3Dihub>. Acesso em: 7 maio 2019.

SILVA, R. A. *et al.* Características físico-químicas e atividade antimicrobiana de extratos de própolis da Paraíba, Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 36, n. 6, p. 1842–1848, 2006.

SILVA-CARVALHO, R.; BALTAZAR, F.; ALMEIDA-AGUIAR, C. Propolis: a complex natural product with a plethora of biological activities that can be explored for drug development. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, New York, v. 2015, art. 206439, p. 1-29, 2015.

SILVA FROZZA, C. O. *et al.* Chemical characterization, antioxidant and cytotoxic activities of Brazilian red propolis. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 52, p. 137–142, 2013. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2012.11.013>. Acesso em: 23 fev. 2020.

SIQUEIRA, A. L. *et al.* Estudo da ação antibacteriana do extrato hidroalcoólico de própolis vermelha sobre *Enterococcus faecalis*. **Revista de Odontologia da UNESP**, Araçatuba, v. 43, n. 6, p. 359–366, 2014.

SLAVUTSKY, A. M. *et al.* Encapsulation of *Lactobacillus acidophilus* in a pilot-plant spray-dryer: effect of process parameters on cell viability. **Journal of Food**

Process Engineering, Malden, v. 40, n. 2, art. e12394, Apr. 2017. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1111/jfpe.12394>. Acesso em: 27 fev. 2020.

SOARES, S. E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 15, n. 1, p. 71–81, 2002.

SOUZA, C. J. F.; GARCIA-ROJAS, E. E.; FAVARO-TRINDADE, C. S. Lactase (β -galactosidase) immobilization by complex formation: impact of biopolymers on enzyme activity. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v. 83, p. 88-96, 2018.

SOUZA, J. P. *et al.* Spray-dried propolis extract, II: prenylated components of green propolis. **Pharmazie**, Berlin, v. 62, n. 7, p. 488-492, 2007. Disponível em: <https://www.semanticscholar.org/paper/Spray-dried-propolis-extract%2C-II%3A-prenylated-of-Souza-Tacon/4d32244e6d9d53205e9462640fd4c146f49f0ac6>. Acesso em: 17 jul. 2019.

SOUZA, V. B. *et al.* Effect of spray drying on the physicochemical properties and color stability of the powdered pigment obtained from vinification byproducts of the Bordo grape (*Vitis labrusca*). **Food and Bioproducts Processing**, United Kingdom, v. 93, p. 39–50, Jan. 2015.

SOUZA, V. B. *et al.* Functional properties and encapsulation of a proanthocyanidin-rich cinnamon extract (*Cinnamomum zeylanicum*) by complex coacervation using gelatin and different polysaccharides. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v. 77, p. 297–306, 2018.

TELES, F. *et al.* Brazilian red propolis attenuates hypertension and renal damage in 5/6 renal ablation model. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 10, n. 1, p. 1–15, 2015.

TIRADO, D. F. *et al.* Astaxanthin encapsulation in ethyl cellulose carriers by continuous supercritical emulsions extraction: a study on particle size, encapsulation efficiency, release profile and antioxidant activity. **Journal of Supercritical Fluids**, Amsterdam, v. 150, p. 128–136, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2019.04.017>. Acesso em: 25 fev. 2020.

TOLVE, R. *et al.* Encapsulation of health-promoting ingredients: applications in foodstuffs. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, United Kingdom, v. 67, n. 8, p. 888–918, 2016.

TOMÁS-BARBERÁN, F. A. *et al.* Phytochemical evidence for the botanical origin of tropical propolis from Venezuela. **Phytochemistry**, Oxford, v. 34, n. 1, p. 191–196, Aug. 1993.

TOMŠIK, A. *et al.* Encapsulations of wild garlic (*Allium ursinum* L.) extract using spray congealing technology. **Food Research International**, Amsterdam, v. 119, p. 941–950, May 2019.

TONON, R. V.; BRABET, C.; HUBINGER, M. D. Anthocyanin stability and antioxidant activity of spray-dried açai (*Euterpe oleracea* Mart.) juice produced with different carrier agents. **Food Research International**, Amsterdam, v. 43, n. 3, p. 907–914, 2010. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2009.12.013>. Acesso em: 21 jun. 2019.

TRUSHEVA, B. *et al.* Bioactive constituents of brazilian red propolis. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, New York, v. 3, n. 2, p. 249–254, 2006.

TSALI, A.; GOULA, A. M. Valorization of grape pomace: encapsulation and storage stability of its phenolic extract. **Powder Technology**, Amsterdam, v. 340, p. 194–207, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.powtec.2018.09.011>. Acesso em: 18 abr. 2022.

TULINI, F. L. *et al.* Development of solid lipid microparticles loaded with a proanthocyanidin-rich cinnamon extract (*Cinnamomum zeylanicum*): potential for increasing antioxidant content in functional foods for diabetic population. **Food Research International**, Amsterdam, v. 85, p. 10–18, July 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2016.04.006>. Acesso em: 27 fev. 2020.

TUPUNA, D. S. *et al.* Encapsulation efficiency and thermal stability of norbixin microencapsulated by spray-drying using different combinations of wall materials. **Industrial Crops and Products**, Amsterdam, v. 111, p. 846–855, Jan. 2018.

URSACHE, F. M. *et al.* Valorizations of carotenoids from sea buckthorn extract by microencapsulation and formulation of value-added food products. **Journal of Food Engineering**, Amsterdam, v. 219, p. 16–24, 2018.

VALLE CALOMENI, A. *et al.* Characterization of antioxidant and antimicrobial properties of spray-dried extracts from peanut skins. **Food and Bioproducts**

Processing, United Kingdom, v. 105, p. 215–223, 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fbp.2017.08.001>. Acesso em: 25 fev. 2020.

WEN, Y. *et al.* Retention prediction in reversed phase high performance liquid chromatography using quantitative structure-retention relationships applied to the Hydrophobic Subtraction Model. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 1541, p. 1–11, Mar. 2018.

WOISKY, R. G.; SALATINO, A. Analysis of propolis: some parameters and procedures for chemical quality control. **Journal of Apicultural Research**, London, v. 37, n. 2, p. 99–105, Jan. 1998. Disponível em: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/00218839.1998.11100961>. Acesso em: 17 jul. 2019.

YE, Q.; GEORGES, N.; SELOMULYA, C. Microencapsulation of active ingredients in functional foods: from research stage to commercial food products. **Trends in Food Science and Technology**, Amsterdam, v. 78, p. 167–179, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.05.025>. Acesso em: 25 fev. 2020.

YEN, C. *et al.* Beneficial efficacy of various propolis extracts and their digestive products by in vitro simulated gastrointestinal digestion. **LWT - Food Science and Technology**, Amsterdam, v. 84, n. 1, p. 281-289, 2017.

YIN, Y.; CADWALLADER, K. R. Spray-chilling encapsulation of 2-acetyl-1-pyrroline zinc chloride complex using hydrophobic materials: feasibility and characterization of microcapsules. **Food Chemistry**, Oxford, v. 265, p. 173–181, Nov. 2018. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29884369>. Acesso em: 27 fev. 2020.

ZENEBON, O.; PASCUET, N. S. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008.

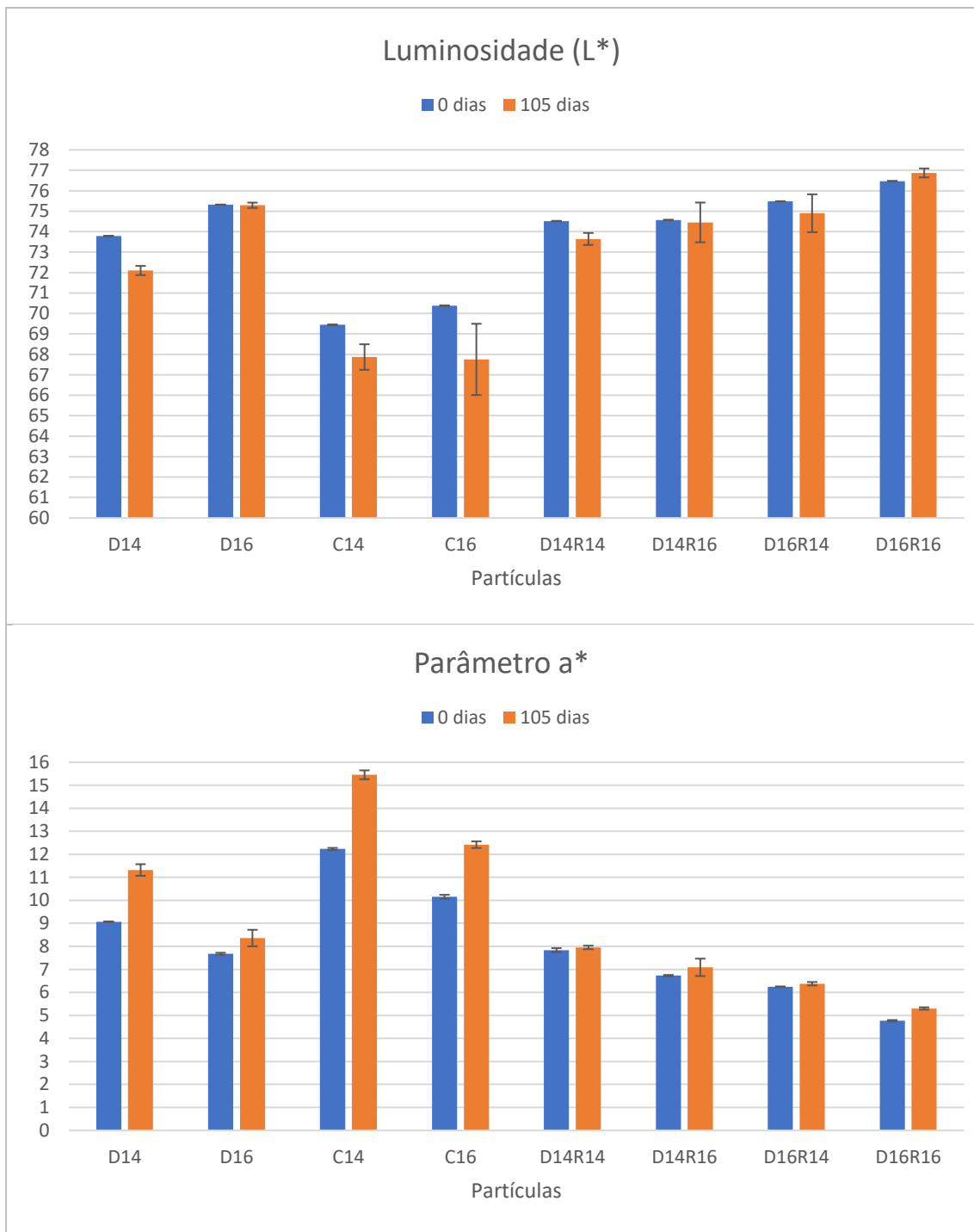
ZHANG, J. *et al.* Effect of spray drying on phenolic compounds of cranberry juice and their stability during storage. **Journal of Food Engineering**, Amsterdam, v. 269, art. 109744, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2019.109744>. Acesso em: 11 abr. 2022.

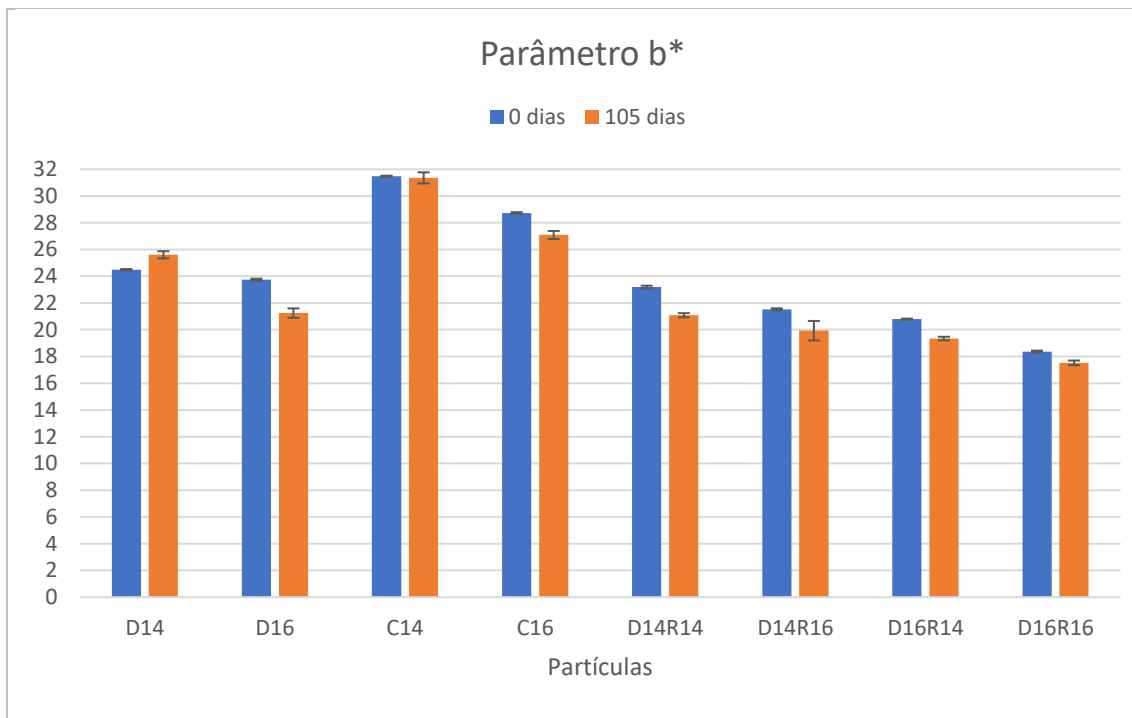
ZUIDAM, N. J.; SHIMONI, E. Overview of microencapsulates for use in food

products or processes and methods to make them. In: ZUIDAM, N.; NEDOVIC, V. (Ed.) **Encapsulation technologies for active food ingredients and food processing**. New York: Springer, 2010. p. 3–29.

APÊNDICE

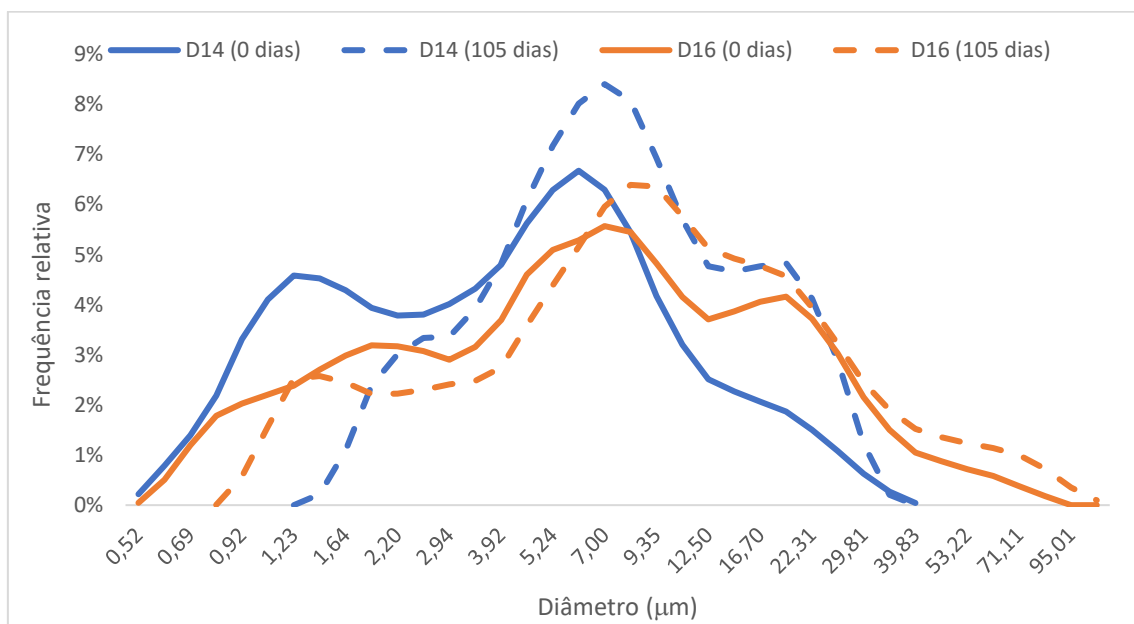
Apêndice A - Parâmetros de cor das partículas no sistema CIELAB.





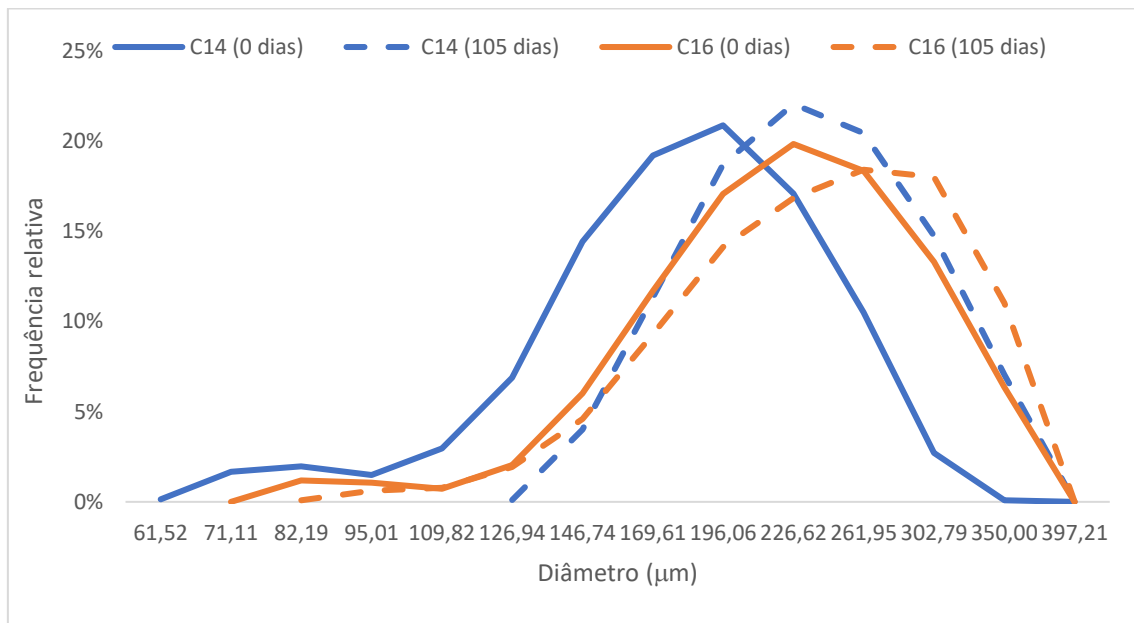
Fonte: Autoria própria

Apêndice B - Distribuição de tamanho das partículas obtidas por *spray drying*.



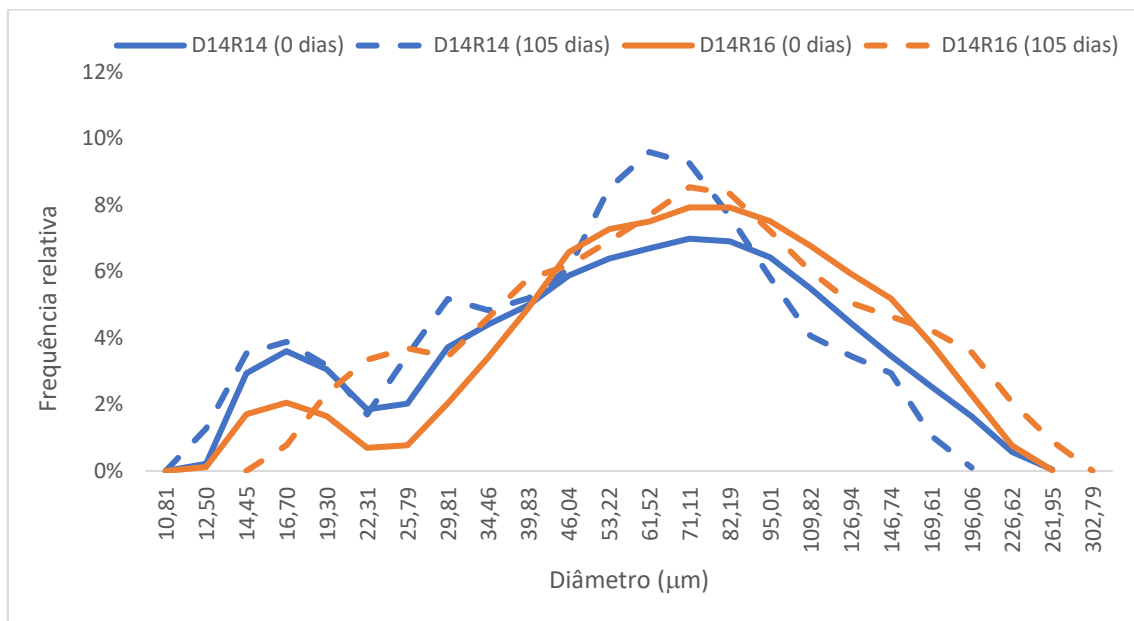
Fonte: Autoria própria

Apêndice C - Distribuição de tamanho das partículas obtidas por *spray chilling*.



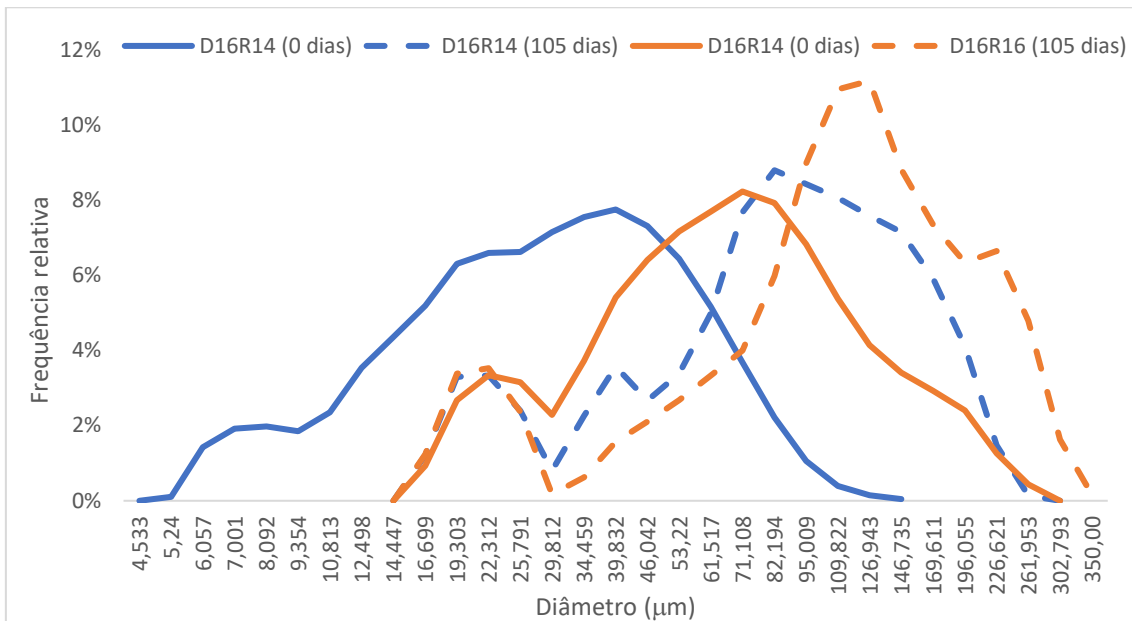
Fonte: Autoria própria

Apêndice D - Distribuição de tamanho das partículas D14 recobertas por *spray chilling*.



Fonte: Autoria própria

Apêndice E - Distribuição de tamanho das partículas D16 recobertas por *spray chilling*.



Fonte: Autoria própria