

Encapsulamento de extratos de própolis por secagem por atomização e estudos de libertação controlada

Marta Sofia Ribeiro Beijoca

Dissertação para a obtenção do Grau de Mestre em
Engenharia Alimentar

Orientador: Doutor Vitor Manuel Delgado Alves

Coorientadora: Doutora Margarida Gomes Moldão Martins

Júri:

Presidente: Doutora Maria Luísa Lopes de Castro e Brito, Professora Auxiliar com agregação do Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa

Vogais: Doutor Vitor Manuel Delgado Alves, Professor Auxiliar do Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa

Doutora Maria Margarida Canas Mendes de Almeida Cardoso, Professora Auxiliar Convidada da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa

AGRADECIMENTOS

A realização desta dissertação reflete 5 anos de trabalho e formação. Diversos obstáculos foram ultrapassados e sem o apoio dos melhores não seria alcançável. Quero assim expor a minha admiração, respeito e enorme consideração por todos os que interferiram na minha vida académica e sobretudo nesta dissertação agradecendo:

Ao Doutor Vitor Alves pela paciência e colaboração em todo o desenvolvimento experimental bem como pela disponibilidade e apoio no decorrer do trabalho escrito, dignos de um orientador;

À Doutora Margarida Moldão Martins pelo entusiasmo, boa disposição e conselhos admiráveis;

À Engenheira Joaquina Pinheiro que foi sempre uma pessoa muito prestável e forneceu um apoio essencial para a realização da fase experimental do trabalho;

A toda a minha família que sempre esteve a meu lado tanto a nível académico como pessoal. Em especial aos meus pais que tornaram este curso possível, por todo o carinho, prontidão, admiração e por nunca deixarem de acreditar em mim.

Ao meu irmão pela disponibilidade, apoio e boa disposição de sempre;

Ao meu namorado pelo apoio incondicional tendo sido sempre uma pessoa incansável e pronta a ajudar;

Aos meus amigos de dentro e fora do ISA, em particular à Rita Lemos, Luzia Barata, Maria Gonçalves pela força e amizade demonstradas. Realço ainda o meu grupo de trabalho que ultrapassou diversos obstáculos juntos, Sandra Santos, João Pereira, Inês Lopes e Francisca Alves, por toda a força e incentivo sem esquecer pessoas que marcaram este curso sempre de forma positiva, Irina Godinho, Joana Valença e Mónica Baeta;

A todo o pessoal de Genética pela disponibilidade imediata, sobretudo à Engenheira Daniela Silva pela ajuda durante todo o trabalho bem como pelo entusiasmo e boa disposição sempre presentes;

À minha professora de Dança pela compreensão e apoio demonstrados;

Um enorme obrigado a todos!

RESUMO

O própolis é conhecido pelas suas propriedades bioativas, no entanto, apresenta características sensoriais que o tornam pouco adequado à incorporação direta em alimentos.

Neste trabalho estudou-se o potencial do processo de microencapsulação de própolis com o objetivo de contornar as suas características sensoriais desagradáveis mantendo as suas propriedades bioativas, designadamente, a atividade antioxidante. O encapsulamento foi realizado por *spray-drying* usando diferentes matrizes: quitosano; quitosano/ácido cítrico; quitosano/tripolifosfato; amido de arroz; amido de arroz/gelatina.

Em termos de compostos fenólicos totais, o carregamento das partículas variou entre 0,049 e 0,062 mg EAG/mg partículas, sendo uma concentração superior à do extrato de própolis (0,023 mg EAG/mg própolis).

O perfil de liberação de própolis das partículas foi estudado monitorizando a concentração de fenólicos totais em meio ácido (pH=3,9) e neutro (pH=7,3). A percentagem total de fenólicos libertada em meio neutro foi cerca de 100% para todos os tipos de partículas. Em meio ácido as partículas que libertaram uma menor percentagem de massa de compostos encapsulada foram as de quitosano/tripolifosfato (27%), seguindo-se as de quitosano/ácido cítrico (39%), amido/gelatina (46%), amido (52%) e quitosano (100%).

Os perfis de liberação observados permitem inferir que é possível desenhar partículas com perfis de liberação específicos, adequados a diferentes aplicações finais.

Palavras-chave: Própolis; Microencapsulação; Atividade Antioxidante; Quitosano; Amido; Liberação

ABSTRACT

Propolis is known for its bioactive properties, however, it presents sensory characteristics that limit its direct incorporation in food products.

In this study, the potential of the microencapsulation of propolis was studied, in order to mask its unpleasant flavor, while maintaining its bioactive properties such as the antioxidant activity. The encapsulation process was carried by spray-drying using different materials: chitosan, chitosan with citric acid, chitosan with tripolyphosphate, rice starch and rice starch with gelatin.

In terms of total phenolic compounds, the loading of the particles ranged between 0.049 and 0.062 mg EAG/mg particles, being a higher concentration when compared to the propolis itself (0.023 mg EAG/mg propolis).

The release profile of propolis from the particles was studied by monitoring the concentration of total phenolics in acidic and neutral media. The percentage of total phenolics released in neutral solution was approximately 100% for all particles. In acid medium, the particles presenting a lower release of phenolics were chitosan with tripolyphosphate (27%), followed by chitosan with citric acid (39 %), rice starch with gelatin (46%), rice starch (52%) and chitosan (100%).

The observed different release profiles allow us to infer that it is possible to design suitable particles for diverse end-use applications.

Keywords: Propolis; Microencapsulation; Antioxidant Activity; Chitosan; Starch; Release.

EXTENDED ABSTRACT

Propolis is a natural product produced by bees from the harvest of resins and other plant materials. This product presents a strong interest in the area of health due to its beneficial properties such as antimicrobial and antioxidant activity, which also makes this product interesting to apply in the food industry. However, its direct application in food products is limited by its unpleasant sensorial properties.

In this study, the potential of the microencapsulation of propolis in microparticles was studied, in order to mask its unpleasant flavor, while maintaining its bioactive properties such as the antioxidant activity.

The total phenolic content of propolis was expressed as Gallic Acid Equivalents (GAE) and the value was 0.0234 mgGAE/mg propolis. Two methods were used in the study of the antioxidant activity: FRAP and DPPH. The results were expressed as TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Activity) being 0,335 MTrolox/g propolis and 0.200 MTrolox/g propolis, respectively.

Two wall materials were chosen for the encapsulation of propolis: chitosan and rice starch. Microparticles were obtained with only chitosan (Q+P), chitosan chemically modified with citric acid (Q+P+AC) and chitosan reticulated with tripolyphosphate (Q+P+TPF). In the case of starch, it was applied alone (A+P) and with gelatin (A+P+G).

The chitosan based microparticles consisted of capsules with a spherical shape and a smooth surface, while rice starch produced microparticles composed of porous aggregates of starch granules. The propolis loading of the encapsulates, expressed as total phenolic content, varied between 0,049 and 0,062 mg EAG/mg particles.

The measured antioxidant activity of the encapsulates, (0,0166-0,0223 M Trolox/ g particles for the FRAP method and 0.0068-0.0411 M Trolox/g particles for the DPPH method) was lower than that observed for the propolis itself. This fact is probably a result of the protection conferred by the wall material to the bioactive compounds encapsulated.

The release profile of propolis from the particles was studied by monitoring the concentration of total phenolics in acidic and neutral media. It was observed a higher release rate and a higher amount of mass released in neutral medium (pH= 7.3) than in acidic medium (pH= 3.9). The percentage of total phenolics released in neutral solution was approximately 100% for all types of particles. In acid medium, the particles presenting a lower amount of mass of compounds encapsulated that was released were those of Q+P+TPF (27%), followed by those of Q+P+AC (39 %), A+P+G (46%), A+P (52%) and Q+P (100%).

The observed different release profiles in acid and neutral media allow us to infer that it is possible to design appropriate particle for diverse end-use applications. In the future, it is essential to evaluate the limit of sensory detection of all types of particles studied in model aqueous solutions and in real systems, and correlate the respective limit concentrations to the antioxidant and antimicrobial activities achieved.

Keywords: Propolis; Microencapsulation; Antioxidant Activity; Chitosan; Starch; Release

ÍNDICE

AGRADECIMENTOS	I
RESUMO	II
ABSTRACT	III
EXTENDED ABSTRACT	IV
LISTA DE FIGURAS	VIII
LISTA DE TABELAS	X
LISTA DE ABREVIATURAS	XI
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS	2
3. ENQUADRAMENTO TEÓRICO	3
3.1 ANTIOXIDANTES.....	3
3.2 PRÓPOLIS	6
3.2.1 Definição e Produção	6
3.2.2 Propriedades físicas e químicas	6
3.2.3 Propriedades bioativas	8
3.2.4 Utilização do própolis.....	9
3.3 MICROENCAPSULAÇÃO	11
3.3.1 Definição e aplicações	11
3.3.2 Requisitos gerais na realização da microencapsulação	13
3.3.3 Técnicas de microencapsulação	14
3.3.3.1 Microencapsulação por atomização (<i>spray-drying</i>)	16
3.3.3.2 Microencapsulação por <i>spray-drying</i> com quitosano.....	18
3.3.3.3 Microencapsulação por <i>spray-drying</i> com amido	21
3.3.4 Microencapsulação de própolis.....	22
3.4 LIBERTAÇÃO CONTROLADA	23
4. MATERIAIS E MÉTODOS	25
4.1 Materiais.....	25
4.2 Métodos analíticos.....	25
4.2.1 Determinação dos fenólicos totais do extrato de própolis.....	25
4.2.2 Determinação da atividade antioxidante do extrato de própolis	26
4.2.3 Produção de micropartículas por <i>Spray drying</i>	29

4.2.4	Caraterização das micropartículas.....	33
4.2.5	Avaliação da velocidade de liberação	35
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
5.1	Determinação dos fenólicos totais do extrato de própolis	37
5.2	Determinação da atividade antioxidante do extrato de própolis	37
5.3	Caraterização das partículas	38
5.3.1	Morfologia e tamanho	38
5.3.2	Carregamento das partículas.....	44
5.3.3	Atividade antioxidante das partículas.....	45
5.4	Avaliação da velocidade de liberação	46
5.4.1	Libertação em Meio Ácido (ácido acético 1%)	46
5.4.2	Libertação em Meio Neutro (Tampão fosfato pH = 7,26)	50
5.4.3	Observação por Microscopia Ótica	53
6.	CONCLUSÕES.....	58
7.	TRABALHO FUTURO.....	59
	Referências bibliográficas	60

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: a) Extrato de própolis; b) Cápsulas de própolis; c) Produtos de higiene; d) Rebuçados de própolis.....	10
Figura 2: Processo de spray-drying (Etapas principais).....	16
Figura 3: Curva de calibração para a quantificação dos fenólicos totais (expressos em equivalentes de ácido gálico).	25
Figura 4: Curva de calibração com o Trolox para o método DPPH.....	27
Figura 5: Curva de calibração com o Trolox para o método FRAP	29
Figura 6: Preparação das soluções de quitosano e própolis para realização da secagem no spray-dryer	30
Figura 7: Preparação das suspensões de amido para realização da secagem no spray-dryer	32
Figura 8: Representação esquemática do processo de encapsulamento por spray-drying...33	
Figura 9: Curva de calibração com ácido gálico em solução tampão.....	36
Figura 10: Micropartículas de Quitosano com Própolis. Ampliação: a) 200 x; b) 2000 x.....	39
Figura 11: Micropartículas de Quitosano com Ácido cítrico e Própolis. Ampliação: a) 200 x; b) 2000 x	39
Figura 12: Esfera de quitosano com ácido cítrico colapsada	40
Figura 13: Distribuição do tamanho das partículas de Q+P	41
Figura 14: Distribuição do tamanho das partículas de Q+P+AC	41
Figura 15: Micropartículas de Amido com Própolis. Ampliação: a) 200 x; b) 2000 x.....	42
Figura 16: Micropartículas de Amido com Gelatina e Própolis. Ampliação a) 200x; b) 2000x	42

Figura 17: Distribuição do tamanho das partículas de A+P	43
Figura 18: Distribuição do tamanho das partículas de A+P+G.....	43
Figura 19: Perfis de liberação de compostos fenólicos a partir de micropartículas à base de quitosano em meio ácido.....	46
Figura 20: Reação entre grupos amina do quitosano com o ácido cítrico	47
Figura 21: Perfis de liberação de compostos fenólicos a partir de micropartículas à base de amido em meio ácido..	48
Figura 22: Análise comparativa do perfil de liberação a partir das partículas de Q+P+TPF, A+P+G e Q+P+AC em meio ácido.	49
Figura 23: Perfis de liberação de compostos fenólicos a partir de micropartículas à base de quitosano em meio neutro..	50
Figura 24: Perfis de liberação de compostos fenólicos a partir de micropartículas à base de amido em meio neutro.....	52
Figura 25: Análise comparativa de todas as liberações em tampão fosfato	53
Figura 26: Q+P após 30 minutos em ácido acético.....	54
Figura 27: Q+P+AC após 30 minutos em ácido acético.....	54
Figura 28: Q+P+TPF após 30 minutos em ácido acético.....	54
Figura 29: A+P após 30 minutos em ácido acético	55
Figura 30: A+P+G após 30 minutos em ácido acético	55
Figura 31: Q+P após 30 minutos em meio tampão.....	56
Figura 32: Q+P+AC após 30 minutos em meio tampão.....	56
Figura 33: Q+P+TPF após 30 minutos em meio tampão	56
Figura 34: A+P após 30 minutos em meio tampão	57
Figura 35: A+P+G após 30 minutos em meio tampão	57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Principais finalidades de encapsulamento na indústria alimentar.....	12
Tabela 2: Alguns métodos utilizados no encapsulamento de produtos alimentares (Adaptado de: (Duarte, 2011))	15
Tabela 3: Teor de fenólicos das partículas	44
Tabela 4: Atividade antioxidante das micropartículas pelos métodos DPPH e FRAP	45
Tabela 5: Velocidade inicial de liberação e quantidade máxima libertada (% m/m) nos ensaios de liberação a partir das partículas de quitosano em meio ácido.....	46
Tabela 6: Velocidade inicial de liberação e quantidade máxima libertada (% m/m) nos ensaios de liberação a partir das partículas de amido em meio ácido	48
Tabela 7: Velocidade inicial de liberação e quantidade máxima libertada (% m/m) nos ensaios de liberação a partir das partículas de quitosano em meio neutro	51
Tabela 8: Velocidade inicial de liberação e quantidade máxima libertada (% m/m) nos ensaios de liberação a partir das partículas de amido em meio neutro.....	52

LISTA DE ABREVIATURAS

Abs	Absorvância
AG	Ácido Gálico
C	Concentração
DPPH	2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl
EAG	Equivalentes em ácido gálico
FRAP	<i>Ferric Reducing Antioxidant Power</i>
Fe ³⁺ -TPTZ	lão férrico complexado com 2,4,6-triarydyl-s-triazina
Fe ²⁺ -TPTZ	lão ferroso complexado com 2,4,6-triarydyl-s-triazina
A+P	Micropartículas de amido e própolis
A+P+G	Micropartículas de amido com gelatina e própolis
Q+P	Micropartículas de quitosano e própolis
Q+P+AC	Micropartículas de quitosano com ácido cítrico e própolis
Q+P+TPF	Micropartículas de quitosano com tripolifosfato e própolis
RSA	<i>Radical Scavenging Activity</i>
SEM	<i>Scanning Electron Microscopy</i>
TPF	Tripolifosfato
TEAC	<i>Trolox Equivalent Antioxidant Capacity</i>

1. INTRODUÇÃO

A crescente preocupação com a saúde, o aumento da consciência da população para a importância da alimentação saudável e a sensibilização para o perigo da contaminação dos alimentos, resulta num aumento da exigência e da tendência dos consumidores para a aquisição de produtos alimentares de qualidade, tanto a nível de segurança como a nível de prazer e, de preferência, que contribuam para um aumento de saúde e bem-estar.

A indústria alimentar tem então um papel fulcral nesta temática, sendo essencial conseguir colocar no mercado os produtos com qualidade e segurança que satisfaçam as necessidades dos consumidores.

Apesar de existir ainda uma mentalidade um pouco fechada no que diz respeito aos aditivos alimentares, alguns começam já a ser procurados nos alimentos como sinal de composição benéfica para a saúde como é o caso dos compostos bioativos, nomeadamente, os antioxidantes. No entanto, o aumento do esclarecimento do consumidor acerca da restrição de utilização de alguns compostos sintéticos, por suspeitas de toxicidade, na indústria alimentar (das leis que restringem a aplicação de solventes orgânicos na indústria alimentar) permitiu a evolução e aumento do interesse, por parte das indústrias alimentar e de bebidas, farmacêutica, cosmética e naturopata, de antioxidantes naturais como substitutos dos sintéticos por todos os efeitos negativos que promovem na saúde.

Os compostos antioxidantes apresentam um papel importante na saúde do consumidor e a nível tecnológico uma vez que, além de protegerem contra os radicais livres, permitem adiar ou mesmo impedir fenómenos de oxidação durante o processamento e armazenamento dos produtos. Com recurso a estes compostos consegue-se melhorar a qualidade dos produtos alimentares e aumentar o período de vida útil dos mesmos.

O própolis, produto resultante da colheita e transformação de substâncias da natureza, nomeadamente de plantas, por parte das abelhas, é uma substância com elevados teores de compostos antioxidantes podendo ser uma forte aposta das indústrias alimentar, farmacêutica e cosmética. No entanto, a sua aplicação em alimentos é ainda limitada pois, além de não ser solúvel em água, apresenta um sabor e aroma intensos e desagradáveis. Torna-se assim necessário estudar metodologias que possam aliviar os referidos constrangimentos.

A microencapsulação, metodologia que permite incorporar agentes ativos em matrizes alimentares, pode ser uma via importante.

2. OBJETIVOS

O objetivo principal deste trabalho diz respeito à viabilização da incorporação de própolis em matrizes alimentares de modo a aproveitar a sua capacidade antioxidante e antimicrobiana. Para cumprir o objetivo proposto são necessários os seguintes objetivos específicos:

- Testar diversas matrizes encapsulantes;
- Analisar o grau de encapsulamento e a atividade antioxidante e teor de fenóis dos encapsulados;
- Verificar o perfil de liberação da substância ativa nas diferentes matrizes em meio ácido e em meio neutro para a possível adição em formulações alimentares diferentes.

3. ENQUADRAMENTO TEÓRICO

3.1 ANTIOXIDANTES

A alimentação saudável diz respeito não só ao consumo equilibrado dos nutrientes necessários para o bom funcionamento do organismo mas também à aquisição de alimentos com elevada qualidade e, de preferência, sem aditivos nocivos para o organismo.

Os consumidores cada vez mais procuram alimentos sem aditivos de síntese, uma vez que sintético é muitas vezes associado a pouco saudável, o que contribui em larga escala para o estudo e desenvolvimento de aditivos naturais que possam desempenhar funções idênticas às dos sintéticos.

Além destes fatores, o estilo de vida sedentário e pressionado pela tensão do quotidiano tem aumentado a preocupação dos consumidores com a saúde e com a alimentação o que contribuiu para o ganho de posição de um novo tipo de produtos no mercado, os alimentos funcionais, alimentos enriquecidos com substâncias, nomeadamente compostos bioativos, que irão contribuir para a saúde e bom funcionamento do organismo. Uma das funcionalidades que se tem privilegiado é a atividade antioxidante.

Os compostos antioxidantes desempenham um papel de defesa no organismo, prevenindo doenças como problemas cardiovasculares, cancro e doenças neurodegenerativas, através da proteção contra radicais livres (substâncias que reagem facilmente com o oxigénio) (Kaliora e Dedoussis, 2007).

Além da função ao nível da saúde, os compostos antioxidantes representam também um papel muito importante na qualidade e segurança alimentar podendo tirar partido dos mesmos para a conservação e melhoria dos géneros alimentícios.

Segundo Halliwell (2001) os antioxidantes são substâncias que, em determinadas concentrações, retardam ou inibem a oxidação de substratos oxidáveis presentes em géneros alimentícios.

Um bom exemplo de ação dos antioxidantes é a prevenção da oxidação lipídica que causa a deterioração dos alimentos, provocando cheiro e sabor a ranço, com conseqüente diminuição da qualidade nutricional e destabilização da segurança dos alimentos devido à formação de compostos potencialmente tóxicos (Chevolleau *et al.*, 1992).

Uma das grandes preocupações da indústria alimentar é precisamente a utilização de aditivos em produtos alimentares devido à possível influência na saúde dos consumidores e por questões tecnológicas. A utilização de aditivos impõe uma avaliação toxicológica rigorosa, por entidades internacionais como é o caso do comité conjunto da OMS (*Organização Mundial da Saúde*) e FAO (*Food and Agriculture Organization*) e o Comité Científico de Alimentação Humana. Entre os aditivos destacam-se os compostos antioxidantes cujo código Europeu é iniciado pela letra E.

Algumas propriedades são fundamentais para a obtenção de um antioxidante de qualidade. O antioxidante não pode apresentar qualquer toxicidade, não deve conferir aroma, sabor ou cor ao alimento, deve ser efetivo em baixa concentração, resistir a altas temperaturas, ser de fácil incorporação e estar disponível a um preço aceitável. Na verdade, é difícil encontrar um antioxidante que possua todas estas características sendo muito comum a realização de sinergismos (Coppen, 1989).

Existem, atualmente, antioxidantes de síntese e antioxidantes naturais.

Antioxidantes naturais são aqueles que são extraídos de tecidos de plantas e de animais ou que se formam durante o processamento de produtos alimentares de origem vegetal ou animal.

Estes compostos encontram-se presentes em quase todas as plantas, tecidos animais e microrganismos sendo na sua maioria compostos fenólicos sobretudo flavonóides, tocoferóis e ácidos fenólicos. O baixo risco que apresentam para o consumidor tem suscitado uma grande investigação de modo a conseguir melhorar e estabilizar a incorporação em géneros alimentícios (Pereira, 2010).

Os fenóis apresentam a facilidade de ceder um átomo de hidrogénio aos radicais, que permite assim quebrar as reações de propagação da oxidação, sendo este o mecanismo de atividade antioxidante dos mesmos. O radical fenólico que se forma é menos reativo e mais estável.

Os antioxidantes reagem tanto com os radicais alquilo ($R\cdot$) e alquilperóxido ($ROO\cdot$), permitindo interromper a cadeia de propagação e inibir a geração de hidroperóxidos, como com os radicais alcóxilo ($RO\cdot$), que se formam através da decomposição dos hidroperóxidos na presença de metais, com consequente diminuição da formação de aldeídos por decomposição dos mesmos (Pokorný *et al.*, 2005).

Os compostos antioxidantes têm a capacidade de captar radicais livres que se encontram presentes na totalidade dos sistemas biológicos. Estes radicais livres, por sua vez, oxidam proteínas, ácidos nucleicos, lípidos ou DNA, o que pode levar ao surgimento de doenças degenerativas. Os compostos antioxidantes, como é o caso dos polifenóis, ácidos fenólicos e flavonóides, vão então resgatar os radicais livres inibindo assim os mecanismos de oxidação que iriam conduzir a doenças degenerativas (Duarte, 2011). No caso dos alimentos, os antioxidantes, ao terem a capacidade de inibir reações de oxidação promovem uma melhor conservação dos mesmos aumentando o tempo de vida útil.

Segundo Duarte (2011) os métodos mais utilizados para a investigação da atividade antioxidante são FRAP, ABTS, DPPH e ORAC.

O método **FRAP** (*Ferric-Reducing Antioxidant Power*) avalia a capacidade que os antioxidantes têm para reduzir o complexo férrico-tripiridiltriazina (Fe^{III} -TPZ) ao complexo ferroso (Fe^{II} -TPZ) em condições ácidas (Frankel e Meyer, 2000; Sucupira *et al.*, 2012).

O método **ABTS** baseia-se na capacidade dos compostos antioxidantes para captar o radical 2,2-azono-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato) (ABTS+). A grande crítica a este método diz respeito ao fato deste composto não ser encontrado em sistemas biológicos (Rodriguez-Amaya, 2010).

O método **DPPH** baseia-se na captação do radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilidrazil), encontrando-se este radical disponível no mercado. Além disso é um método prático e estável (Sucupira *et al.*, 2012). No entanto, também apresenta a desvantagem deste radical não possuir similaridades com os radicais altamente reativos resultantes da peroxidação lipídica (Frankel e Meyer, 2000).

O método **ORAC** (Oxygen Radical Absorbance) mede o resgate do radical livre peróxido (ROO•) sendo este o radical livre mais abundante e o método considerado para os sistemas biológicos (Frankel e Meyer, 2000).

Relativamente aos compostos fenólicos, a capacidade de resgate de radicais livres é o principal motor de funcionamento dos mesmos tornando, deste modo, a correlação entre a atividade antioxidante e o conteúdo em polifenóis bastante notável sendo estes os componentes dos alimentos que mais contribuem para a atividade antioxidante. Para a determinação dos polifenóis totais, normalmente, recorre-se ao método de Folin-Ciocalteu sendo este um dos métodos mais antigos (Prior *et al.*, 2005).

3.2 PRÓPOLIS

3.2.1 Definição e Produção

O própolis, muitas vezes referido como cola de abelha, é um produto da colmeia resultante da recolha e transformação, por intermédio de secreções salivares e enzimáticas por parte das abelhas, de resinas que recobrem os rebentos de plantas como carvalhos, freixos e choupos e as cascas de algumas plantas, nomeadamente, pinheiros, abetos e outras árvores do género *Pinus* (Sabatini e Carpana, 2002).

A palavra própolis resultante das palavras gregas “**pro**” e “**polis**” que significam, respetivamente, em defesa (na frente de) e cidade (Ghisalberti, 1979; Sabatini e Carpana, 2002) foi admitida por antigos apicultores que verificaram que as abelhas se serviam desta substância para fechar a entrada da sua colmeia a outros insetos ou corpos estranhos.

A produção da resina por parte das árvores serve de proteção aos ataques de insetos e fungos pois constitui um excelente filme impermeável com propriedades antibacterianas e antifúngicas. As abelhas recolhem o própolis, que é armazenado, de seguida, nas suas cestas de pólen localizadas nas patas traseiras, sendo iniciada a sua transformação ao chegar à colmeia, onde é misturada com cera e saliva das abelhas, onde atua a enzima 13-glicosidase promovendo a hidrólise de flavonóides glicosilados que a torna mais maleável (Pereira *et al.*, 2002).

O interesse por parte das abelhas no própolis deve-se a diferentes benefícios que o mesmo acarreta. Primeiramente, o própolis é um material de construção, isto é, que preenche fendas e outras falhas na colmeia por onde podem entrar predadores. As suas propriedades antibacterianas permitem a mumificação de intrusos mortos que sejam de grande porte, sendo difícil colocá-los fora da colmeia, evitando a sua decomposição e atração de germes (Bankova *et al.*, 2002). Finalmente, em camada fina, alisa as paredes e células que recebem os ovos da rainha (Sabatini e Carpana, 2002).

Após a colheita, por parte dos apicultores, o própolis é limpo e separado da cera através de um aquecimento em água a 70 °C. Segue-se depois a extração do própolis por álcool etílico que, segundo Sabatini e Carpana (2002), consegue extrair os compostos ativos do própolis.

3.2.2 Propriedades físicas e químicas

O própolis apresenta uma tonalidade variável (entre o amarelo e o preto) e o seu odor é geralmente agradável no entanto, apresenta um sabor forte e ligeiramente amargo podendo mesmo irritar as mucosas causando uma sensação leve de anestesia local. O ponto de fusão é aos 65-70°C, variando consoante a origem (Sabatini e Carpana, 2002).

Relativamente à solubilidade, o própolis é insolúvel em água e parcialmente solúvel em acetona, álcool, amoníaco, clorofórmio, éter, benzeno, tricloroetileno (Sabatini e Carpana, 2002).

✓ **Composição química**

Segundo Sabatini e Carpana (2002), o própolis, na sua composição, possui uma vasta gama de compostos químicos sendo, no entanto, variável devido a fatores climáticos e botânicos. Também a “raça” das abelhas que realizam a colheita e posterior transformação influencia a sua composição. Os principais constituintes são óleos essenciais, flavonóides, resinas, cera, sais minerais, açúcares, vitaminas, entre outros.

Segundo Mohammadzadeh *et al.* (2007), o própolis contém mais de 160 constituintes que desempenham papéis muito importantes na saúde humana principalmente no sistema imunológico.

Os **óleos essenciais**, que variam de 0,5 a 5%, são formados essencialmente por terpenos e seus derivados. Nestes óleos encontram-se **aldeídos aromáticos** (vanilina, isovanilina, octanal, decanal e aldeído cinâmico) que conferem o cheiro forte característico do própolis. Os **flavonóides** encontram-se nos vacúolos das células epidérmicas de muitas plantas. A grande quantidade de componentes que fazem parte desta família pode ser dividida por 4 grupos sendo eles as flavonas, os dihidroflavonóis, as flavononas e os flavonóis e são estes compostos os principais responsáveis pelas ações anti-inflamatória, anti-trombótica, vaso-protetora, gastro-protetora, anti radicais livres e moduladora das reações alérgicas. Os **hidroxiácidos aromáticos**, onde se encontram o ácido benzóico e o ácido ferúlico, contribuem para o efeito bacteriostático e bactericida. Os **ácidos alifáticos**, dos quais fazem parte o ácido palmítico, esteárico, oleico, entre outros, também estão presentes em pequenas quantidades no própolis. As **resinas** integram cerca de 50% do própolis e são originadas por polimerização e oxidação dos terpenos dos óleos essenciais. As **ceras**, formadas por ácidos gordos de cadeia longa esterificados com álcoois superiores, integram cerca de 30% do própolis. Na preparação dos extratos este composto é eliminado pois não possui atividade biológica. No entanto, cada apicultor utiliza a sua técnica de deceração, que constitui um compromisso entre o afastamento total do material inerte e o empobrecimento inevitável em princípios ativos. O **pólen** corresponde a cerca de 5% da massa do própolis. Os **sais minerais** (alumínio, ferro, cálcio, manganésio, entre outros) encontram-se presentes em baixas concentrações. Os **açúcares** também se encontram em pequena quantidade sendo a sacarose, a frutose e a glucose os principais. O própolis contém ainda **vitaminas** (complexo B, C, A e E).

Os metais pesados podem facilmente contaminar o própolis sendo importante fazer sempre uma análise de modo a quantificar estes elementos. O limite do conteúdo em chumbo estabelecido pela Farmacopeia Oficial é de 3 mg/kg.

A época em que é recolhido o própolis vai resultar numa composição diferente. Na Primavera predominam as ceras enquanto no Outono há uma grande prevalência de substâncias resinosas (Sabatini e Carpana, 2002).

A composição do própolis é ainda fortemente influenciada pela região dada a forte dependência da vegetação.

3.2.3 Propriedades bioativas

O própolis possui inúmeras propriedades bioativas como é o caso da ação antibacteriana, antiviral, antioxidante, anti-inflamatória, cicatrizante e anestésica. O elevado teor de compostos fenólicos presentes no própolis conduz à expectativa de que o extrato favorece uma ação protetora contra os radicais livres (Sforcin e Bankova, 2011). Os flavonóides e outros fenóis são os compostos ativos mais importantes nesta área (Vennat *et al.*, 1995).

Um dos benefícios mais notáveis do própolis no organismo é o aumento da síntese de anticorpos bem como da atividade dos macrófagos. Deste modo, o sistema imunológico é estimulado e ocorre um aumento de resistência do organismo a certas doenças (Burdock, 1998).

Nos últimos tempos o própolis tem ganho uma posição importante na produção de bebidas e alimentos saudáveis devido ao seu espectro de propriedades biológicas, permitindo melhorar a saúde e prevenir doenças como inflamações, doenças cardíacas, diabetes e até mesmo cancro (Banskota *et al.*, 2000; Burdock, 1998).

A nível tecnológico, a ação antioxidante e antimicrobiana revela-se de muito interesse. No presente estudo são estas as propriedades visadas pois contribuem para o aumento do período de vida útil dos alimentos e qualidade dos mesmos.

✓ Ação antioxidante

Segundo Popeskovic *et al.* (1980) os flavonóides e vários fenólicos presentes no própolis mostraram ser capazes de captar radicais livres protegendo, deste modo, os lípidos e outros compostos, como a vitamina C, de serem oxidados e alterados.

Mohammadzadeh *et al.* (2007) estudaram a atividade antioxidante de diferentes amostras de própolis para perceberem a influência do meio ambiente na mesma e concluíram que existia uma dependência forte do ambiente por parte do própolis.

Como referido anteriormente, a composição do própolis varia consoante a região uma vez que depende da vegetação da área onde é coletada. As primeiras amostras de própolis de Portugal que

foram analisadas pertenciam a Bornes e ao Fundão cujos resultados indicaram que as mesmas eram uma importante fonte de fenóis com propriedades antioxidantes (Moreira *et al.*, 2008).

✓ **Ação antimicrobiana**

A atividade antimicrobiana é a característica mais apreciada no própolis atraindo os consumidores do mesmo pela prevenção de diversas doenças. No entanto, também em termos de conservação dos alimentos é extremamente importante aumentando a segurança aliada à qualidade dos mesmos.

A atividade antimicrobiana deve-se sobretudo aos flavonóides galangina, pinocembrina e aos ácidos benzóico, ferúlico e cinâmico. Também o óleo essencial contribui para esta atividade devido ao seu elevado poder antibacteriano embora se encontre em quantidade bastante inferior aos componentes anteriormente referidos (Sabatini e Carpana, 2002).

No que diz respeito aos extratos, a atividade antimicrobiana vai depender de vários fatores como é o caso da proveniência do produto, armazenamento e conservação e o modo de produção do extrato.

Vários estudos demonstraram que o extrato etanólico de própolis inibe o crescimento de *Staphylococcus aureus* (Gonsales *et al.*, 2006; Lu *et al.*, 2005; Muli e Maingi, 2007).

De acordo com Marghitas *et al.* (2010) após um estudo intensivo acerca da atividade antimicrobiana com amostras de diferentes zonas da Transilvânia, os resultados obtidos demonstraram uma sensibilidade diferente para bactérias gram-positivas e gram-negativas. No caso de bactérias gram-positivas (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*), foi verificada uma forte sensibilidade sobretudo com as amostras de própolis de maior quantidade de polifenóis. Por sua vez, os resultados obtidos no estudo de bactérias gram-negativas foram muito diferentes. A bactéria *Escherichia coli* demonstrou alguma sensibilidade ao própolis enquanto que no caso da *Pseudomonas aeruginosa* não foi verificada qualquer atividade antimicrobiana por parte do própolis, bactéria esta também conhecida pela sua resistência a antibióticos.

3.2.4 Utilização do própolis

O início da utilização do própolis por parte do Homem já remete a um passado muito longínquo no entanto, tem crescido imenso a investigação e o interesse pelo mesmo. Os primeiros fatos surgiram na utilização como anti-séptico por parte dos Gregos e Egípcios (Abd El Hady e Hegazi, 2002). Estes últimos recorriam ao própolis para embalsamar as suas múmias e afastar possíveis parasitas (Sabatini e Carpana, 2002).

Já nos séculos XVIII e XIX, em França, se começou a recorrer ao própolis para o tratamento de feridas mas foi sobretudo por volta de 1900 que ocorreu o foco máximo de atenção para a sua

utilização devido às propriedades desinfetantes e cicatrizantes que apresentava (Sabatini e Carpana, 2002).

O própolis tornou-se uma alternativa a certos medicamentos e antibióticos químicos relacionando-se, uma vez mais, as suas propriedades biológicas e terapêuticas com a composição fenólica (Lahouel, 2004). Deste modo, as indústrias aumentaram o interesse pelo desenvolvimento de produtos à base de própolis para o tratamento de diversos problemas como doenças de pele e variadas infecções.

O crescente interesse científico tem sido suscitado pela sua vasta atividade biológica sendo também notório o aumento do consumo deste produto (Sabatini e Carpana, 2002; Ghisalberti, 1979; Marcucci, 1995).

✓ **Produtos com própolis existentes no mercado**

Diversos são já os produtos de própolis que se encontram no mercado, entre eles, extratos alcoólicos e aquosos, cápsulas, cremes, geles, shampoos e rebuçados (Figura 1 a, b, c, d).



Figura 1: a) Extrato de própolis; b) Cápsulas de própolis; c) Produtos de higiene; d) Rebuçados de própolis

O recurso ao própolis nas áreas de medicina e cosmética diz respeito a extratos de própolis uma vez que a hidrólise dos princípios ativos, por parte das enzimas existentes no nosso corpo, é prolongada e, portanto, uma anterior quebra mediante extração facilita a assimilação. Além disso, os extratos são mais fáceis de trabalhar, contêm os princípios ativos de interesse e são a forma em que mais se encontra o própolis no mercado (Sabatini e Carpana, 2002).

Os solventes utilizados na extração são comumente álcoois, isto é, o metanol e o etanol, sendo este último o mais utilizado podendo estar diluídos com diferentes percentagens de água (Bankova *et al.*, 1992). Os processos utilizados para a extração são a maceração ou em alguns casos (com metanol ou etanol a 96%) a Extração Soxhlet. A extração assistida por ultrassom permite tornar o processo mais rápido (Trusheva *et al.*, 2007).

O extrato alcoólico é obtido deixando macerar o própolis em álcool etílico por períodos que podem durar até 3 semanas, com agitação periódica.

3.3 MICROENCAPSULAÇÃO

3.3.1 Definição e aplicações

A microencapsulação é a tecnologia através da qual gotas de líquido, partículas sólidas ou compostos gasosos são aprisionados por um agente encapsulante. Algumas substâncias são totalmente envolvidas pelo agente encapsulante ou fixadas/incorporadas numa matriz homogénea ou heterogénea de modo a formar microcápsulas que também podem ser designadas por micropartículas ou micro esférulas com diversas propriedades benéficas (Gosh, 2006).

Segundo Duarte (2011), a microcápsula é referida por diferentes autores de forma diversificada. Entre as diferentes designações destaca-se o invólucro, a membrana, a parede, o revestimento, a matriz ou ainda o agente encapsulante. Já o conteúdo protegido encontra-se como recheio, carga, agente ativo, composto ativo ou “core”. O material encapsulado pode ser encontrado distribuído ou incrustado numa matriz mais ou menos contínua do agente encapsulante ou ainda fazer parte de um complexo molecular.

É possível a produção de microcápsulas com matrizes simples ou compostas e uma ou várias substâncias ativas (Desai e Park, 2005).

Esta técnica evita interações entre o composto ativo e os componentes dos alimentos e ainda reações químicas que podem levar à deterioração do composto ativo com resultados indesejáveis ao nível do sabor, odor ou ainda efeitos nocivos para a saúde (Sanguansri e Augustin, 2010).

A microencapsulação permite assim uma barreira física entre o composto do núcleo e outras substâncias presentes no produto.

Pode recorrer-se à encapsulação por três razões: proteção dos ingredientes, melhoria dos produtos alimentares e simplificação do processo de fabrico (Versic, 1988; Brazel, 1999; Clark, 2002; Varadachari, 2002). Na tabela 1 encontram-se as principais finalidades da utilização da microencapsulação do ingrediente ativo.

Tabela 1: Principais finalidades de encapsulamento na indústria alimentar

Motivo de Encapsulação	Finalidade
Proteção dos ingredientes	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Proteger nutrientes importantes ou instáveis; ✓ Libertar de forma controlada durante o processamento e armazenamento; ✓ Reter compostos voláteis.
Melhoria dos produtos alimentares	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Preservar o valor nutricional ou aromas de forma a prolongar o prazo de validade; ✓ Dissimular aromas ou cores de determinados ingredientes; ✓ Melhorar a sensação na boca associada à textura.
Simplificação do processo de fabrico	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Facilitar operações de limpeza ✓ Permitir a incorporação de aditivos em pontos específicos dos processos de fabrico sem necessidade de novas linhas de alimentação ou novas operações.

O tamanho e a estrutura das microcápsulas dependem, além dos materiais utilizados, do processo de produção. No entanto, são geralmente pequenas esferas com diâmetros num intervalo de valores entre poucos micrómetros (1-1000 μm) e poucos milímetros (He *et al.*, 1999; Versic, 1998).

O componente a ser encapsulado normalmente encontra-se no núcleo da cápsula envolvido pelo agente encapsulante ou disperso numa matriz contendo o agente encapsulante. As microcápsulas podem ainda ter mais do que um agente encapsulante construindo diferentes paredes com diferentes propriedades químicas e físicas (Gosh, 2006). A escolha do agente encapsulante e do processo de encapsulação são interpedendentes (Desai e Park, 2005).

3.3.2 Requisitos gerais na realização da microencapsulação

Para a realização da microencapsulação é fulcral o conhecimento de: 1- composto ativo; 2- matrizes apropriadas para a encapsulação; 3- interações entre o composto ativo, a matriz e o ambiente; 4- processo de encapsulamento; 5- estabilidade do composto microencapsulado não só em armazenamento mas também quando incorporado no alimento; 6- os mecanismos de liberação controlada do composto ativo (Sanguansri e Augustin, 2010).

De acordo com de Vos *et al.* (2008), a estrutura molecular do composto ativo é normalmente conhecida mas a forma como este interage com o alimento, o destino após consumo, o local de ação no caso de ser um bioativo e a sua função no organismo depois de consumido podem não estar esclarecidos.

A escolha do agente encapsulante influencia bastante a eficiência da microencapsulação e a estabilidade das microcápsulas. Os critérios utilizados para a escolha do mesmo são baseados nas propriedades físico-químicas da substância a encapsular e do agente encapsulante, na compatibilidade entre ambos e nos fatores económicos e de processamento (Azeredo, 2005; Freiberg e Zhu, 2004; Gharsallaoui *et al.*, 2007). O tamanho das microcápsulas também pode ser um critério utilizado (Gosh, 2006).

A escolha do material de encapsulamento segundo a aplicação pretendida é muito importante. Nesta área deve ser considerada a toxicidade, a eficiência de encapsulação, a estabilidade, o grau de proteção do material do núcleo, as propriedades microscópicas da superfície das micropartículas, entre outros. Dependendo do material do núcleo e das características pretendidas no produto final, o material da parede pode ser selecionado de uma vasta gama de polímeros naturais ou sintéticos (Azeredo, 2005; Gharsallaoui *et al.*, 2007).

A fonte dos biopolímeros utilizados na microencapsulação de ingredientes alimentares é variada. Como exemplos podem ser referidos polissacáridos como o amido, quitosano, maltodextrinas e dextrose, gomas como goma arábica, goma acácia, alginatos, carragenina e proteínas como proteínas de leite ou gelatina (Gharsallaoui *et al.*, 2007; Gouin, 2004).

Essencialmente, as matrizes devem proteger os compostos ativos da luz, oxidação, humidade e de outras substâncias, mascarar sabores e aromas, controlar o tempo de liberação dos compostos ativos, impossibilitar a saída de constituintes voláteis, facilitar o manuseamento e introdução das microesferas na produção de alimentos.

Segundo Pegg e Shahidi (1999) e Desai e Park (2005) para uma boa eficiência do encapsulamento a matriz deverá possuir os seguintes atributos:

- Baixa viscosidade a elevadas concentrações facilitando deste modo a técnica de encapsulamento;

- Boa capacidade para dispersar e emulsionar as partículas e para estabilizar a emulsão gerada;
- Não reagir com as partículas a encapsular;
- Aptidão para selar e suportar as partículas na sua estrutura durante todo o processo de encapsulamento e durante o armazenamento;
- Aptidão para a liberação do solvente utilizado durante o encapsulamento bem como outras substâncias extra;
- Conseguir proteger ao máximo o encapsulado contra condições exteriores;
- Ser solúvel em solventes utilizados pela indústria alimentar como é o caso da água e do etanol;
- Ser portadora de qualidade alimentar e apresentar baixo custo.

Os materiais utilizados devem ainda ser formadores de filme, flexíveis, inodoros, insípidos e não higroscópicos. Outras propriedades podem apresentar relevância, estando, no entanto, dependentes da substância ativa e da incorporação no produto alimentar, como é o caso de exibir temperaturas de transição de fase, como a fusão ou a gelificação, apropriadas. Na formulação podem ainda ser adicionados alguns aditivos como emulsionantes, plastificantes ou anti-espumas permitindo melhorar as propriedades do produto final (Sanguansri e Augustin, 2010).

3.3.3 Técnicas de microencapsulação

Existem diversas técnicas de microencapsulação que variam nas adaptações e especificidades, baseando-se a sua escolha no tipo da microcápsula pretendida (tamanho e aplicações), nas propriedades físicas e químicas do composto a encapsular e do agente encapsulante, nos mecanismos de liberação e na escala de produção (de Vos *et al.*, 2010; Santos, 2005).

Ao nível da indústria alimentar podem ser salientados alguns métodos utilizados, encontrando-se os mais recorrentes na tabela 2 bem como as suas aplicações.

Tabela 2: Alguns métodos utilizados no encapsulamento de produtos alimentares (Adaptado de: Duarte(2011))

Método de encapsulamento	Aplicações
Atomização (“Spray-drying”)	Produtos de confeitaria, leite em pó, sobremesas instantâneas, produtos aromáticos, bebidas instantâneas
Coacervação	Pastilhas elásticas, pasta de dentes, alimentos processados termicamente
Leito fluidizado	Pratos preparados, produtos de confeitaria
“Spray cooling/chilling”	Pratos preparados, gelados
Extrusão	Bebidas instantâneas, produtos de confeitaria, chás
Inclusão Molecular	Produtos de confeitaria, bebidas instantâneas, snacks extrudidos

Os processos referidos anteriormente podem ser englobados em dois grandes grupos, processos mecânicos (atomização, “spray cooling/chilling”, leito fluidizado e extrusão) ou processos químicos (coacervação e inclusão molecular) (Duarte, 2011).

O *spray-drying* também designado por técnica de atomização ou secagem por atomização é, no entanto, a escolha mais frequente devido ao seu baixo custo aliado à sua eficiência (Pu *et al.*, 2011; Rattes e Oliveira, 2007; Schafroth *et al.*, 2011; de Vos *et al.*, 2010). Também a disponibilidade do equipamento no mercado (Ribeiro, 2007), a retenção eficaz de compostos voláteis e a estabilidade adequada dos materiais encapsulados (Reineccius, 1988; Desobry e Debeaufort, 2011) constituem importantes vantagens desta técnica. Este método tem sido utilizado com sucesso na indústria

alimentar sendo um dos processos de microencapsulação mais antigos, para preparar os primeiros sabores encapsulados (Gouin, 2004).

3.3.3.1 Microencapsulação por atomização (*spray-drying*)

A técnica de *spray-drying* é utilizada desde os anos 50 na indústria alimentar. Inicialmente era aplicada para proteger sabores da degradação ou oxidação e para secar suspensões sólidas. Presentemente, também se aplica a compostos bioativos e probióticos (Gouin, 2004; Pu *et al.*, 2011).

O Processo de *spray-drying* é de custo relativamente reduzido, rápido e fácil de reproduzir, quando comparado com outras tecnologias utilizadas na microencapsulação, explicando assim a preferência desta técnica a nível industrial (Pu *et al.*, 2011; Rattes e Oliveira, 2007; Schafroth *et al.*, 2011; de Vos *et al.*, 2010). Além de ser um processo flexível, pois oferece variações substanciais na matriz de microencapsulação, é ainda adaptável a equipamentos comuns e produz partículas de elevada qualidade. Ao nível da indústria alimentar a maioria das formulações utilizadas no processo de *spray-drying* são aquosas (Desai e Park, 2005).

O *spray-drying* é uma operação unitária na qual um produto líquido é atomizado em ar quente para instantaneamente produzir um pó, as microcápsulas. O líquido utilizado na alimentação pode ser uma solução, uma suspensão ou uma emulsão (Gharsallaoui *et al.*, 2007). As etapas principais que decorrem no processo de *spray-drying* encontram-se esquematizadas na figura 2.

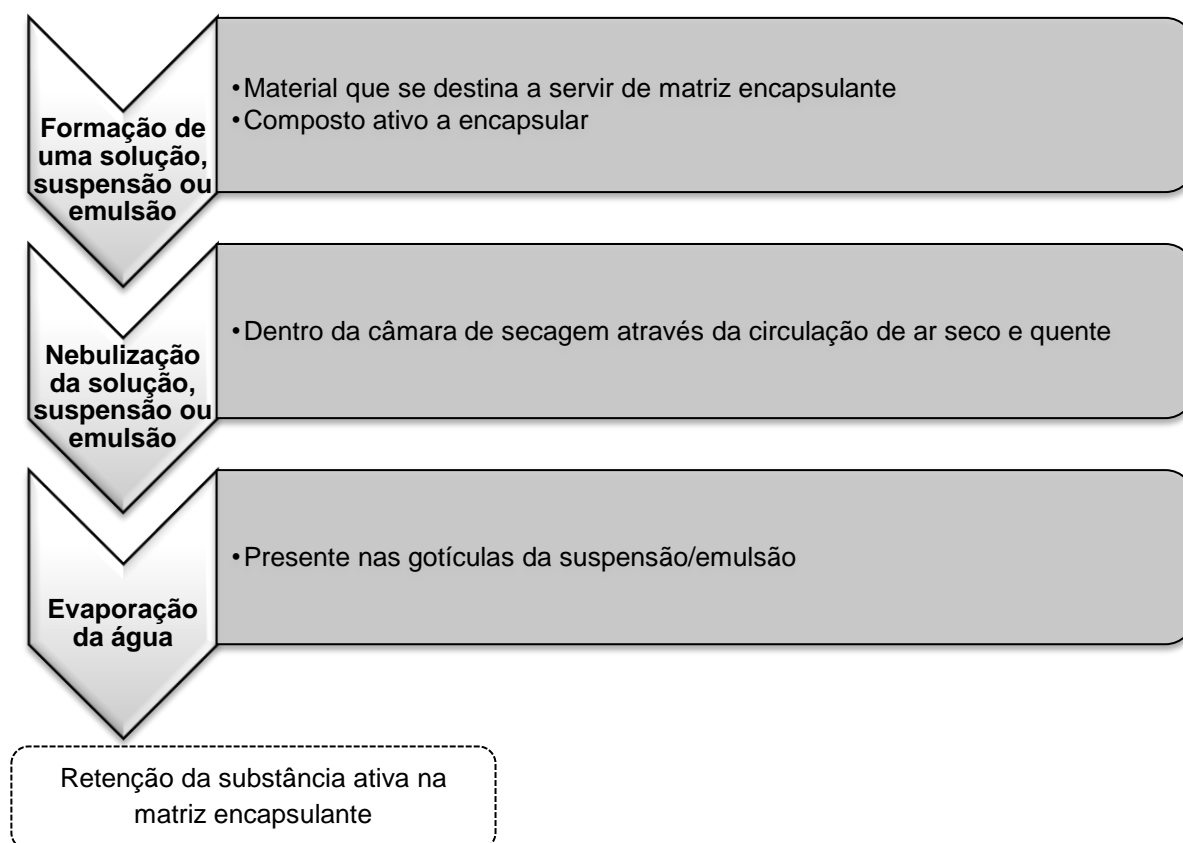


Figura 2: Processo de *spray-drying* (Etapas principais)

De um modo mais pormenorizado, a suspensão ou emulsão, previamente formulada, é bombeada para a câmara de atomização onde se transforma num aerossol de finas gotículas que, quando entram em contato com o ar quente gerado no interior da câmara de secagem, perdem água levando à solidificação do material e, conseqüentemente, ao aprisionamento da substância que se pretende proteger (Tuley, 1996).

Na indústria alimentar podem ser encontrados diferentes tipos de atomizadores devido à sua forma, dimensão e geometria (Reineccius, 1988).

Alguns exemplos de atomizadores são então: atomizadores pneumáticos; injetor com pressão; disco giratório; injetor fluido e injetor sónico. As gotículas formadas são tão menores quanto maior o aumento de energia fornecida ao atomizador. Para a mesma energia o tamanho das partículas aumenta com o aumento da taxa de alimentação que corresponde à solução com agente encapsulante e composto para encapsular. Também o aumento da viscosidade e da tensão superficial no líquido de alimentação promovem um aumento da dimensão das partículas (Gharsallaoui *et al.*, 2007).

O ar quente na entrada atinge uma temperatura entre os 150 e 220°C ocorrendo rapidamente a evaporação. Seguidamente, a temperatura diminui para um intervalo de temperaturas entre 50 e 80°C (Azeredo, 2005; Gharsallaoui *et al.*, 2007; de Vos *et al.*, 2010). O tempo de exposição das micropartículas a elevadas temperaturas é curto (segundos), não ultrapassando os 100°C no núcleo das mesmas (Azeredo, 2005).

As partículas produzidas podem ser um pó muito fino (10-15 µm) ou partículas maiores (2-3 mm) que dependem tanto do material de alimentação como das condições de operação (Gharsallaoui *et al.*, 2007; de Vos *et al.*, 2010). Posteriormente à sua produção, estas partículas são separadas num ciclone (de Vos *et al.*, 2010).

As microcápsulas resultantes do processo de *spray-drying* são normalmente tipo matriz, onde a substância que se quer encapsular se encontra distribuída no agente encapsulante, sendo os mecanismos de liberação normalmente controlados por ação de solventes ou por difusão (Azeredo, 2005).

As condições do *spray-drying* deverão ser optimizadas de forma a obter uma boa eficiência de microencapsulação.

Apesar da aplicabilidade vantajosa deste processo de atomização existem alguns inconvenientes e restrições de utilização uma vez que se torna menos apropriado em alguns casos como, por exemplo, em produtos termossensíveis devido à utilização de temperaturas elevadas com produção de partículas muito pequenas (10-100 µm de diâmetro) que necessitam por vezes de sofrer aglomeração (Desobry e Debeaufort, 2011). A permeabilidade que as matrizes encapsulantes apresentam pode ainda originar fenómenos de oxidação com perdas de componentes voláteis e estabilidade durante o período de armazenamento, diminuindo conseqüentemente o período de vida útil (Reineccius, 1988).

O princípio do encapsulamento por atomização ou *spray-drying* é o proposto por Rulkens e Thijssen em 1967, especificamente a “teoria de difusão seletiva”. Os compostos do aroma, na generalidade, são muito voláteis e, como tal, poderá não ser muito adequado o encapsulamento com recurso a temperaturas altas como as utilizadas durante a secagem por atomização (Ribeiro, 2007). No entanto, durante o processo no mínimo 90% da água, componente maioritário na mistura de alimentação, é vaporizada e os componentes mais voláteis da mistura são retidos quase totalmente desde que a secagem seja realizada nas condições ótimas (Reineccius, 1988).

Este fenómeno pode ser esclarecido pela formação de uma camada externa controlada devido à rápida desidratação da matriz encapsulante, nos primeiros estágios de secagem, quando em contato com o ar quente. No momento em que os níveis de humidade alcançam valores entre 23 e 7% a camada externa torna-se impermeável aos compostos do aroma continuando, ainda assim, razoavelmente permeável às moléculas de água devido à sua menor dimensão (Reineccius, 1988). Deste modo, pode-se afirmar que a camada representa uma membrana semipermeável que retém eficazmente as moléculas dos aromas (o reduzido coeficiente de difusão destas não permite o movimento através da matriz seca e, conseqüentemente, não conseguem atingir a superfície para aí se vaporizarem) e admite a perda contínua de água por difusão (Ribeiro, 2007).

O teor de sólidos, a viscosidade e a temperatura do material na alimentação do atomizador, a massa molecular, a concentração e a pressão de vapor dos compostos, o tipo e massa molecular do agente encapsulante, a velocidade do ar de secagem, temperaturas de entrada e saída do ar, humidade do ar à entrada e dimensão da esférula atomizada são os parâmetros que maior influência têm na retenção dos constituintes do aroma (Reineccius, 1998).

Uma parte do material a encapsular pode permanecer à superfície das partículas e não retido dentro das mesmas, designando-se por material ativo de superfície e pode acarretar alguns problemas de estabilidade como é o caso de se tornar um alvo para reações de degradação (Ribeiro, 2007).

3.3.3.2 Microencapsulação por *spray-drying* com quitosano

O crescente aumento de interesse pelo quitosano, produto natural, deve-se às propriedades intrínsecas que lhe estão associadas como é o caso da biocompatibilidade e biodegradabilidade (Aranaz *et al.*, 2009);

Ao nível da indústria alimentar o quitosano oferece propriedades interessantes, como é o caso do poder antioxidante e antimicrobiano (Aranaz *et al.*, 2009), apresentando ainda uma gama extensa de aplicações únicas onde se inclui a conservação dos alimentos (Kanatt *et al.*, 2008), formação de filmes biodegradáveis (Singh e Ray, 1998) e de microcápsulas (Azeredo, 2005; Champagne e Fustier, 2007).

O quitosano é um polímero policatiônico obtido pela desacetilação alcalina da quitina (N-acetylglucosamine). A quitina é o segundo polímero natural mais abundante, sendo o primeiro a celulose, e encontra-se na estrutura de um grande número de invertebrados como é o caso dos crustáceos, exoesqueleto de insetos, cutículas, entre outros (Kumar, 2000).

Em relação à sua solubilidade, o quitosano apenas é solúvel em soluções ácidas devido à sua estrutura cristalina rígida e à desacetilação. No entanto, esta estrutura pode ser modificada para formar quitosano solúvel em água que é facilmente solúvel em soluções aquosas neutras (Sashiwa *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2010).

O fato de ser um polissacárido biocompatível, biodegradável e de baixa toxicidade torna-o apelativo para o desenvolvimento de microesferas em sistemas de liberação controlada (He *et al.*, 1999).

Uma característica importante do quitosano para a liberação controlada de substâncias é a biodegradabilidade que o mesmo apresenta. Segundo Estevinho *et al.* (2013), a biodegradabilidade diminui com a diminuição do grau de desacetilação. No entanto, uma distribuição uniforme dos grupos acetilados também contribui para a redução da biodegradabilidade (Aranaz *et al.*, 2009).

As micropartículas de quitosano não só protegem a substância ativa da degradação mas permitem ainda aumentar a sua absorção e biodisponibilidade (Wang *et al.*, 2006). Estas esferas apresentam boa esfericidade, distribuição uniforme de tamanho de partículas e uma morfologia de superfície lisa mas distorcida sobretudo nas microesferas não reticuladas (He *et al.*, 1999).

Outra importante característica do quitosano consiste na possibilidade de estabelecer ligações covalentes ou iônicas com agentes de reticulação permitindo a retenção da substância ativa (Estevinho *et al.*, 2013). O quitosano pode, com a sua carga positiva, reagir com compostos poli-aniónicos com consequente formação de complexos poli-eletrolíticos onde são facilmente incorporadas substâncias ativas (Berger *et al.*, 2004; Boonsongrit *et al.*, 2006; Gupta e Jabrail, 2006). Agentes de reticulação utilizados nesta situação são por exemplo o tripolifosfato, o citrato, o sulfato e o fosfato (Shu e Zhu, 2002a, 2002b).

Microesferas de quitosano sem reticulação não podem ser mantidas suspensas em água devido ao intumescimento e dissolução. A adição de agentes de reticulação permite então estabilizar as microesferas de quitosano (Estevinho *et al.*, 2013; He *et al.*, 1999)

A quantidade de agente reticulante influencia diretamente o tamanho das partículas pois com uma menor quantidade são formadas esférulas maiores (He *et al.*, 1999).

Segundo Vehring *et al.* (2007) tanto as condições de secagem como a viscosidade da solução de quitosano representam algum efeito na morfologia das partículas devido à sua influência na taxa de evaporação do solvente ou na taxa de difusão do soluto no decorrer do processo de *spray-drying*.

A temperatura utilizada no *spray-drier* à entrada exerce pouca influência nas características das partículas, nomeadamente, no tamanho. No entanto, a taxa de fluxo de ar influencia bastante o tamanho das partículas sendo maiores com menores fluxos de ar. Também a bomba e a largura do bocal de entrada do produto são relevantes uma vez que se formam maiores partículas com um bombeamento mais rápido e com uma largura maior da abertura (He *et al.*, 1999).

O armazenamento das partículas influencia ainda grandemente a sua morfologia. As partículas de quitosano, logo após o processo de *spray-drying*, apresentam forma esférica ocorrendo com o passar do tempo algumas modificações (Liu *et al.*, 2011).

Relativamente ao quitosano, este influencia as micropartículas em tamanho, forma, tempo de liberação e eficiência do processo de *spray-drying* devido às suas propriedades (Aranaz *et al.*, 2009; Lorenzo-Lamosa *et al.*, 1998; Rege *et al.*, 2003). Por exemplo, o aumento da massa molecular do quitosano provoca um aumento da viscosidade da solução, o que torna o processo mais difícil e promove partículas mais irregulares (Lorenzo-Lamosa *et al.*, 1998).

Também Liu *et al.* (2011) afirmam que a viscosidade da solução de quitosano aumenta com a concentração uma vez que a mesma se traduz num acréscimo de emaranhamento intermolecular devido à menor liberdade de movimentos das diferentes cadeias moleculares. Uma maior concentração produz partículas maiores, sendo possível ajustar o tamanho das partículas com um ajuste na concentração de quitosano. No entanto, de acordo com Oliveira *et al.* (2005), soluções de concentração superior a 2,5% de quitosano são demasiado viscosas o que impede a formação de gotas de morfologia e tamanho controlado.

Os parâmetros do *spray-drying* que devem ser otimizados são a taxa de entrada de ar, taxa de alimentação do líquido, a temperatura do ar à entrada e a temperatura do ar à saída. O conteúdo de sólidos na solução bem como a viscosidade devem também ser considerados para a otimização do processo. Elevados teores de sólidos dificultam o processo de *spray-drying* no entanto, baixos valores de sólidos aumentam o consumo de energia para evaporar a água sendo a otimização importante (Gharsallaoui *et al.*, 2007)

Pode-se afirmar que as melhores condições de *spray-drying* são um compromisso entre a temperatura elevada do ar, o elevado conteúdo de sólidos na solução e a fácil secagem sem resultar expansão e quebra nas partículas (Gharsallaoui *et al.*, 2007; Gouin, 2004).

A morfologia superficial das microesferas de quitosano produzidas em *spray-dryer* é bastante influenciada pelo agente de reticulação. Quanto maior o aumento da concentração deste último maior será a rugosidade da superfície das microesferas (Estevinho *et al.*, 2013).

De acordo com Estevinho *et al.* (2013), a combinação quitosano e tripolifosfato (TPF) é 10 vezes mais forte que qualquer outra ligação estabelecida entre o quitosano e outro agente de reticulação.

A solução de quitosano normalmente é preparada numa concentração de 1% em ácido acético e a solução de TPF a uma concentração inferior a 4% (Estevinho *et al.*, 2013).

3.3.3.3 Microencapsulação por *spray-drying* com amido

O amido é um polímero natural abundante na natureza podendo ser extraído de diversas fontes como tubérculos e cereais onde constitui o principal polissacárido destas fontes vegetais. Na forma nativa, o amido apresenta-se na forma de grânulos insolúveis com características diferentes consoante a sua origem (Duarte, 2006).

Da constituição do amido fazem parte principalmente duas frações, a amilose e a amilopectina, sendo a sua proporção variável consoante a fonte mas, geralmente, encontram-se numa razão de 25% de amilose e 75% de amilopectina. Contém ainda uma fração residual de lípidos, proteínas e minerais (Duarte, 2006).

De acordo com Pegg e Shahidi (1999), a amilose produz filmes fortes e flexíveis devido a ter uma cadeia linear longa, contrariamente à amilopectina que é muito ramificada mas contribui para a estabilidade e transparência dos géis produzidos.

A sua vasta aplicabilidade bem como o baixo custo associado e a qualidade nutricional que apresenta tornam este polímero aplicável nas diversas áreas industriais, entre elas, a indústria alimentar e farmacêutica (Duarte, 2006).

O amido mais comumente utilizado em encapsulação é o amido modificado, de diferentes fontes naturais, originando cápsulas de paredes contínuas lisas. No entanto, pequenos grânulos de amido quando submetidos ao processo de *spray-drying* formam agregados esféricos porosos com potencial de encapsulação não necessitando de qualquer modificação. (Zhao e Whistler, 1994; Trindade e Grosso, 2000; Tari *et al.*, 2003; Ribeiro, 2007). Estes agregados, esférulas, são obtidos por atomização de suspensões aquosas de amido sendo um recurso viável como matriz encapsulante para a indústria alimentar (Ribeiro, 2007).

Zhao e Whistler (1994) quando presenciaram a formação dos agregados de amido na microencapsulação compararam com bolas de pipocas que transportam os ingredientes alimentares nos espaços abertos da estrutura porosa.

Um fator importante a ter em conta nesta aplicação de amido como matriz encapsulante é a realização da secagem numa gama de temperaturas com as quais não ocorra gelatinização do amido. Ribeiro (2007) concluiu ainda que o processo de atomização aplicado em suspensões de amido de arroz com uma temperatura do ar de secagem de 120°C produz esférulas com características desejáveis sem necessidade de adição de adjuvantes.

De acordo com Ribeiro (2007) e Beirão-da-Costa *et al.* (2012) é possível formar esférulas de amido mesmo na ausência de agentes de ligação, no entanto, a presença de gelatina origina diferenças nas estruturas formadas. As diferenças são observadas tanto ao nível da distribuição do tamanho das partículas (menores) como na cristalinidade das estruturas secas.

Mais importante ainda é o impacto na porosidade interna das estruturas em que se observa que o maior volume de vazio interno acompanha concentrações mais elevadas na suspensão inicial de ambos os constituintes da matriz (amido e gelatina) (Beirão-da-Costa *et al.*, 2012).

Beirão-da-Costa *et al.* (2012) salientam ainda que a gelatina alia o seu papel de ligação a um papel de estruturação afetando o tamanho das partículas, a cristalinidade e o volume de vazio interno das estruturas resultantes do processo. Também o volume dos poros e a distribuição do tamanho de poro, na estrutura porosa, afetam, provavelmente, a aptidão para a retenção do material do núcleo e o grau de proteção do mesmo, não esquecendo que a geometria dos poros formados pode influenciar a liberação do composto encapsulado.

3.3.4 Microencapsulação de própolis

Bruschi *et al.* (2003) produziram micropartículas de própolis por spray-drying utilizando manitol numa das formulações. As micropartículas mantiveram a atividade do própolis contra *Staphylococcus aureus*, no entanto, as micropartículas das diferentes formulações apresentaram características morfológicas distintas. Concluíram ainda que estas micropartículas não tinham um sabor tão desagradável nem um odor tão intenso.

Nori *et al.* (2011) promoveram a microencapsulação do extrato etanólico de própolis através da técnica de coacervação e verificaram que as micropartículas mantinham a atividade antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus*, bem como a atividade antioxidante sem a presença de álcool o que as tornaria interessantes para a aplicação em liberação controlada em alimentos.

3.4 LIBERTAÇÃO CONTROLADA

A liberação controlada consiste no processo de liberação de um ou mais agentes ativos a uma velocidade previamente definida, geralmente, num período de tempo prolongado após a sua aplicação (Fernandes, 2013).

Os mecanismos de liberação dependem do tipo de agente encapsulante utilizado, o método de preparação e o ambiente no qual a liberação ocorre. Os processos mais comuns de liberação controlada são a **degradação**, a **difusão**, o **intumescimento** por absorção de solvente e a **osmose** (Pothakamury e Barbosa-Cánovas, 1995).

Segundo Fernandes (2013), os sistemas de difusão são os de maior ocorrência. Neste sistema ocorre a difusão do composto ativo através da matriz seguindo-se a dissolução no meio envolvente. A liberação por inchamento (intumescimento) ocorre quando a água entra na matriz tornando esta mais flexível permitindo a liberação das moléculas de princípio ativo, dependendo do material polimérico. A osmose e o inchamento estão ligados uma vez que a osmose é a passagem de água do meio de menor concentração para o meio de maior concentração que leva a um inchamento. Também a degradação da matriz promove a liberação do composto ativo. A ocorrência deste fenómeno é, geralmente, resultante da hidrólise das cadeias do polímero.

O encapsulamento de uma substância a incluir num género alimentício, como é o caso de um nutriente ou aroma, pode impedir a difusão do mesmo durante o processamento e/ou potenciar a liberação durante o consumo.

Por outro lado, um aditivo pode sofrer liberação durante uma etapa do processamento e estar protegido nas etapas seguintes (exemplo: ácidos, agentes levedantes, agentes de ligações cruzadas) (Duarte, 2006).

Os fatores que controlam a retenção e liberação das substâncias ativas são principalmente a volatilidade dos seus componentes, sendo este de cariz termodinâmico, e a resistência à transferência de massa, fator cinético (de Roos, 2006).

Segundo Pothakamury e Barbosa-Cánovas (1995), os benefícios resultantes da ocorrência de liberação controlada são os seguintes: prolongamento do período de tempo de liberação dos compostos ativos; durante o processamento e cozedura podem ser evitadas ou pelo menos diminuídas as perdas de ingredientes importantes como é o caso de vitaminas e minerais; as substâncias reativas ou incompatíveis podem ser separadas.

Segundo Desobry e Debeaufort (2011), os fatores que mais afetam a migração das substâncias ativas são: a concentração do composto encapsulado, a massa molecular, a solubilidade, a difusividade, o coeficiente de partição entre o polímero e o alimento, o polímero e a composição do

alimento, a temperatura, o tempo e a estrutura, ou seja, densidade, cristalinidade e cadeias ramificadas.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Materiais

Durante o desenvolvimento experimental foram utilizados três materiais principais, sendo eles:

- Extrato etanólico de própolis a 10% (Propex gotas);
- Quitosano, grau de desacetilação > 85%, GoldenShell Chemical, China;
- Amido de arroz, Remy.

4.2 Métodos analíticos

4.2.1 Determinação dos fenólicos totais do extrato de própolis

Para a realização da análise aos fenólicos totais foi efetuada uma diluição do extrato etanólico de própolis prefazendo o volume com etanol. A solução obtida continha uma concentração de 6,15g de própolis/L solução.

A medição de fenólicos totais foi realizada tendo como base o método Ribéreau-Gayon (1970), que se baseia na medição da absorvância a um comprimento de onda de 280 nm. No presente estudo foi utilizado um espectrofotômetro UNICAM, UV/Vis Spectrometer- UV4.

Foi realizada uma curva de calibração com o ácido gálico (Sigma Aldrich), cujas concentrações utilizadas foram: 5 mg/L, 10 mg/L, 15 mg/L, 20 mg/L. A curva encontra-se apresentada na figura 3.

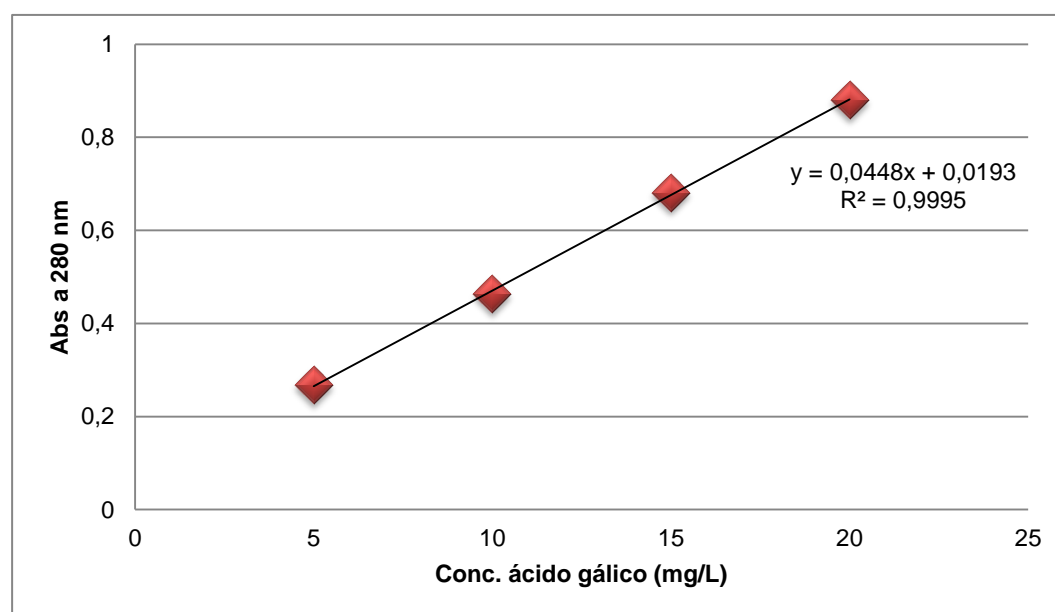


Figura 3: Curva de calibração para a quantificação dos fenólicos totais (expressos em equivalentes de ácido gálico).

De seguida procedeu-se à medição da absorvância de várias soluções de própolis, obtidas por diluição da solução de concentração de 6,15g/L, para obter valores de absorvância contidos na curva de calibração.

O teor de fenólicos totais do extrato de própolis foi expresso em Equivalentes de Ácido Gálico (EAG)/massa de própolis.

4.2.2 Determinação da atividade antioxidante do extrato de própolis

Para a avaliação da atividade antioxidante foi também necessário diluir a solução de extrato etanólico de própolis original. Para isso, transferiu-se 0,694 g de extrato para um balão volumétrico de 100 mL, perfazendo o volume com etanol (Fisher Chemicals). Assim, a solução de trabalho apresentava uma concentração de própolis de 6,94 g/L.

A atividade antioxidante do extrato etanólico de própolis foi determinada recorrendo a 2 métodos distintos, **DPPH** e **FRAP**.

Método DPPH

O método DPPH baseia-se na captura por parte dos antioxidantes do radical livre DPPH (**2,2-difenil-1-picril-hidrazil**), reduzindo-o e promovendo, conseqüentemente, um decréscimo da absorvância a 517nm. A estabilização do DPPH• ocorre com a passagem de violeta escuro para um tom violeta claro até amarelo (Rufino *et al.*, 2006).

O radical DPPH apresenta uma coloração violeta em solução de metanol que ao ser colocado em contato com a amostra é consumido de acordo com o poder antioxidante que a mesma apresenta, passando, gradualmente, para uma tonalidade amarela. Quanto maior for a quantidade de radical consumido, maior é a capacidade antioxidante da amostra e, conseqüentemente, a absorvância após reação será menor (Sales, 2012).

Primeiramente foi preparada uma solução mãe, pesando 24 mg de radical DPPH (Sigma Aldrich) para um balão volumétrico de 100mL, perfazendo o volume com MeOH (Metanol – Sigma Aldrich). Esta solução pode ser armazenada ao abrigo da luz e em ambiente refrigerado durante uma semana.

Após a espera de pelo menos 2 horas, foi preparada a solução diária de DPPH por diluição da solução mãe com metanol, de modo a que a absorvância obtida a 517 nm (Abs DPPH) fosse inferior a 1,1.

Para a medição da atividade antioxidante do própolis transferiu-se 3 mL da solução diária de DPPH para um frasco âmbar ao qual se adicionou, posteriormente, 0,150 mL da solução de própolis (C=6,94 g/L), deixando-se reagir durante 40 minutos no escuro à temperatura ambiente. Após esse tempo,

mediu-se a absorvância no espectrofotómetro (Unicam, UV/Vis Spectrometer- UV4) a um comprimento de onda de 517 nm. O procedimento foi realizado em triplicado.

Na leitura foram obtidos 2 valores com absorvância diferentes isto é, um para “radical DPPH” (branco para posterior comparação) e outro para “matriz+radical”, tendo sido então possível calcular o RSA (*Radical Scavenging Activity*) da amostra, expresso em percentagem, cuja fórmula é a seguinte:

$$\text{RSA}(\%) = \frac{(\text{Abs radical} - \text{Abs“matriz+radical”})}{\text{Abs radical}} * 100 \quad (1)$$

Foi efetuada uma curva de calibração com o Trolox (Sigma Aldrich) que consiste num antioxidante de referência (figura 4). Para a sua realização preparou-se uma solução inicial de 800 µM com a qual foram preparadas diluições de 600 µM, 400 µM, 200µM, 100µM, 50µM e 25µM.

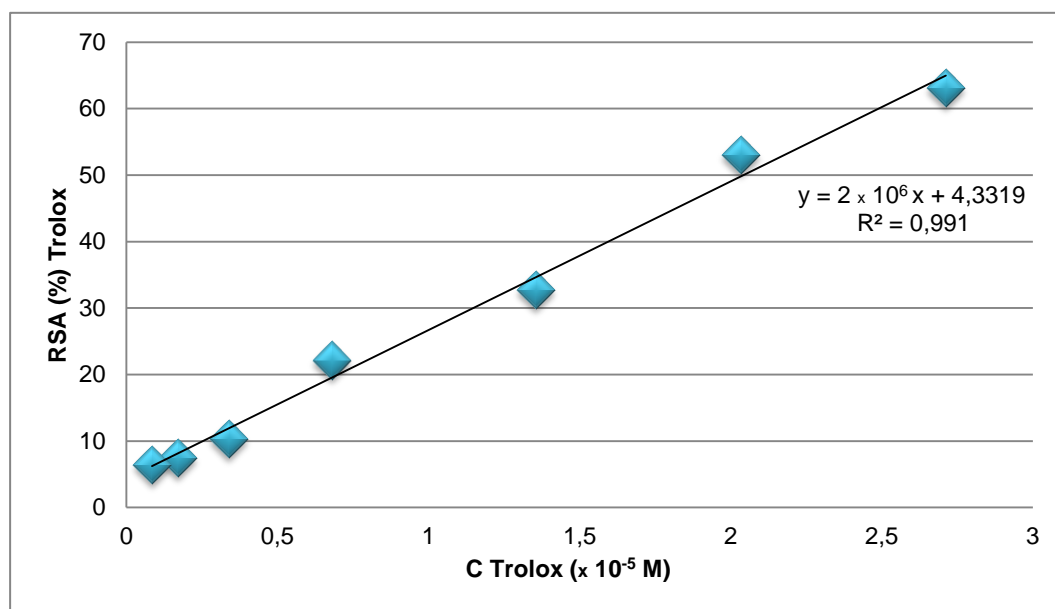


Figura 4: Curva de calibração com o Trolox para o método DPPH

Através da equação da curva foi possível converter o RSA(%) obtido nos cálculos anteriores para Trolox(M) através da seguinte expressão:

$$\text{Trolox}(\text{M}) = \frac{\text{RSA}(\%) - b}{m} \quad (2)$$

na qual **b** é a ordenada na origem e **m** o declive.

Os resultados finais obtidos foram expressos em TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity = Trolox (M)/g de amostra). Logo, quanto maior for o valor de TEAC obtido maior é atividade antioxidante da amostra.

Método FRAP

O método FRAP (**Ferric Reducing Antioxidant Power**- Poder antioxidante de redução do ferro) baseia-se na redução do complexo Fe^{3+} -TPTZ (ferritripiridiltriazina) a Fe^{2+} -TPTZ (ferroso-tripiridiltriazina). Esta reação é acompanhada pela alteração da cor azul claro a azul escuro, cuja alteração da tonalidade varia consoante o poder antioxidante dos compostos (mais poder antioxidante origina uma cor mais escura) (Rufino et al, 2006; Costa, 2012), ocorrendo a absorção máxima a 595 nm (Costa, 2012).

Para a aplicação deste método foi necessária a preparação do reagente FRAP, obtido a partir de uma mistura de 3 soluções previamente preparadas, sendo elas uma solução de tampão acetato 0,3M (V=25 mL), uma solução de TPTZ (**2,4,6-Tris(2-piridil)-s-triazina** (Sigma Aldrich) 10mM (V=2,5 mL) e uma solução aquosa de cloreto férrico (Panreac) 20mM (V=2,5 mL) (Rufino et al, 2006).

Transferiu-se para um tubo de ensaio 2,7 mL de reagente FRAP, 0,270 mL de água destilada e 0,09mL de solução de própolis (C=6,94 g/L). Em paralelo, usou-se como padrão, um tubo de ensaio sem própolis, no qual se adicionou apenas água destilada (270+90 μ l) ao reagente FRAP. Os tubos foram homogeneizados e colocados durante 30min em banho-maria a 37°C. Após esse tempo mediu-se a absorvância no espectrofotómetro a um comprimento de onda de 595nm. O procedimento foi realizado em triplicado.

Em simultâneo foi realizada uma curva de calibração com o Trolox, que se encontra apresentada na figura 5. Para a sua obtenção preparou-se uma solução inicial de 800 μ M com a qual foram preparadas diluições de 600 μ M, 400 μ M, 200 μ M, 100 μ M, 50 μ M e 25 μ M.

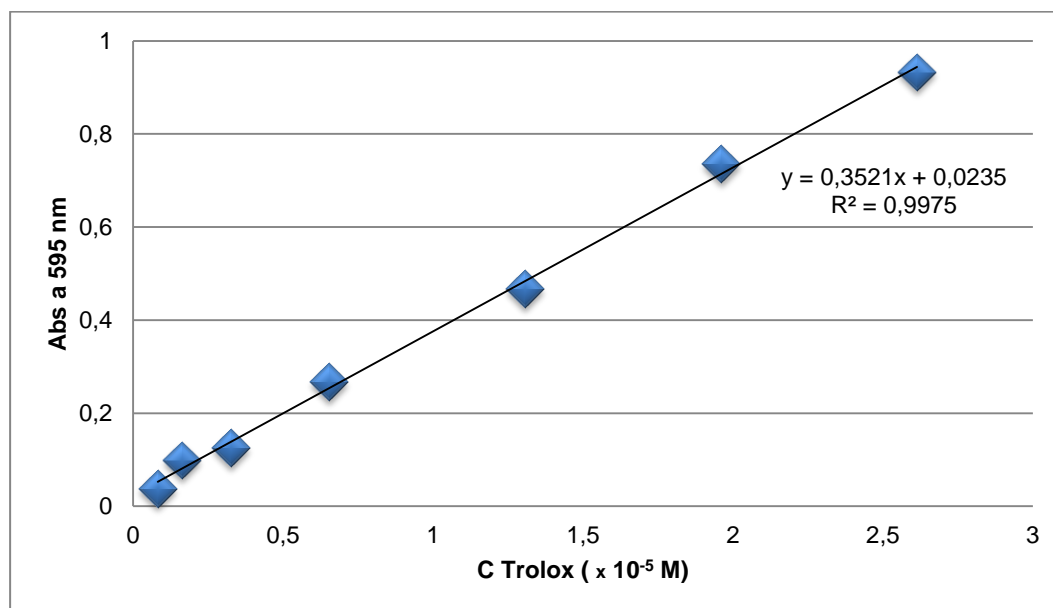


Figura 5: Curva de calibração com o Trolox para o método FRAP

Através da equação da curva foi possível converter a absorvância medida para Trolox(M) através da seguinte fórmula:

$$\text{Trolox(M)} = \frac{\text{Abs (595nm)} - b}{m} \quad (3)$$

na qual que b é a ordenada na origem e m o declive.

Os resultados finais obtidos foram expressos em TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity = Trolox (M)/g de amostra).

4.2.3 Produção de micropartículas por *Spray drying*

4.2.3.1 Preparação das soluções e suspensões com própolis

Soluções com Quitosano

O procedimento encontra-se esquematizado na figura 6. Primeiramente foi preparada uma solução de ácido acético (Fisher Chemical) a 1% (m/m), na qual o quitosano é solúvel. Uma parte dessa solução (700 g) foi utilizada para dissolução do quitosano (20 g), agitando durante cerca de 20 horas. Em paralelo, adicionou-se à restante solução de ácido acético (300 g) o extrato de própolis (a 10%). A quantidade de extrato de própolis adicionado foi calculada de modo a ter na solução final (1000 g) um

teor de 20% de própolis em relação à massa de quitosano (20 g). A preparação foi realizada desta forma para evitar a precipitação do quitosano pela adição do extrato etanólico de própolis.

Em seguida foram misturadas as 2 soluções, uma contendo quitosano e a outra contendo o própolis. A solução final, com uma concentração de 2% m/m de quitosano e 20% de própolis (em base de quitosano) foi posteriormente dividida em duas partes. A uma parte foi adicionado ácido cítrico (Panreac), numa proporção de 50% (em base que quitosano), com a finalidade de aumentar a resistência das esferas de quitosano através de uma modificação química na presença do ácido cítrico.

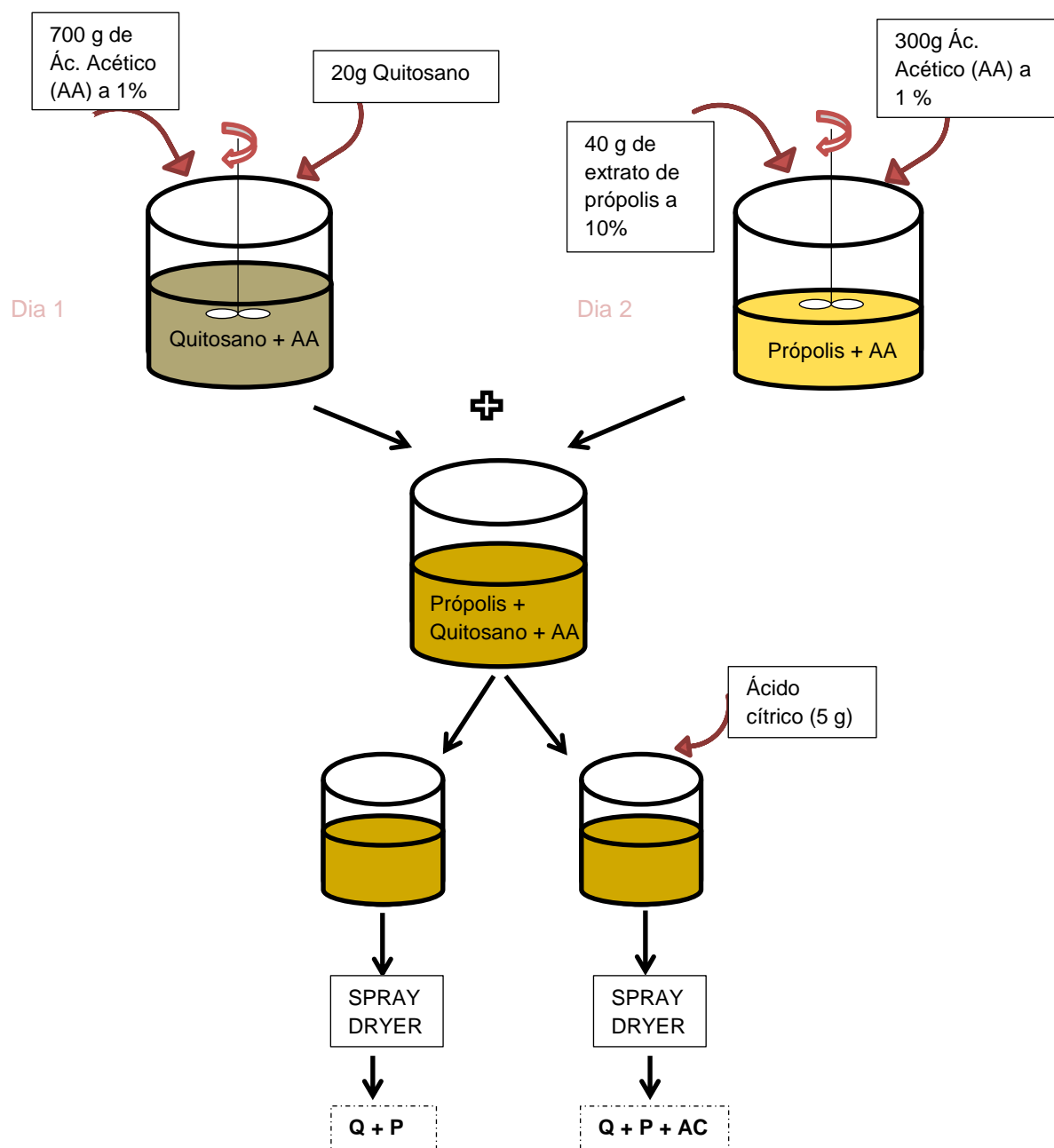


Figura 6: Preparação das soluções de quitosano e própolis para realização da secagem no *spray-dryer*

As duas soluções, **solução de quitosano a 2%** sem adição de outro composto e **solução com 2% de quitosano com ácido cítrico**, foram posteriormente secas por *spray-drying*.

Após a secagem de cada solução foram obtidos dois tipos de micropartículas:

- Micropartículas de quitosano e própolis (Q+P);
- Micropartículas de quitosano com ácido cítrico e própolis (Q+P+AC)

Além dos tipos de micropartículas com quitosano já referidas - Quitosano + Própolis (Q+P), Quitosano + Própolis + Ácido Cítrico (Q+P+AC), foram estudadas também partículas de quitosano reticuladas com tripolifosfato (Sigma Aldrich). Estas apenas foram preparadas no início dos ensaios de liberação, processo descrito mais a frente no ponto **4.2.5.2**.

Suspensões de Amido

O Amido utilizado foi o amido de arroz (Remy). Neste caso, foram também preparadas duas suspensões, da seguinte forma (Figura 7):

→ **Suspensão de amido sem gelatina**, na qual se adicionaram 17,5g de amido a 32,5g de água destilada, o que equivale a 35% de amido na solução aquosa total (50g). A suspensão foi agitada durante 30 minutos. Seguidamente foram adicionadas 35g de extrato etanólico de própolis a 10% para que na suspensão se conseguisse ter um teor de 20% de massa de própolis (em base de massa de amido);

→ **Suspensão de amido com gelatina**, na qual a diferença consiste na adição de gelatina com a função de agente ligante. Na preparação desta solução inicialmente adicionou-se o amido (17,5g) e o extrato de própolis (35g) a uma parte da água total e dissolveu-se à parte a gelatina (Sigma Aldrich) na restante água sob agitação a 40°C. Posteriormente foram misturadas as duas soluções. A concentração de gelatina na solução final foi de 1% m/m.

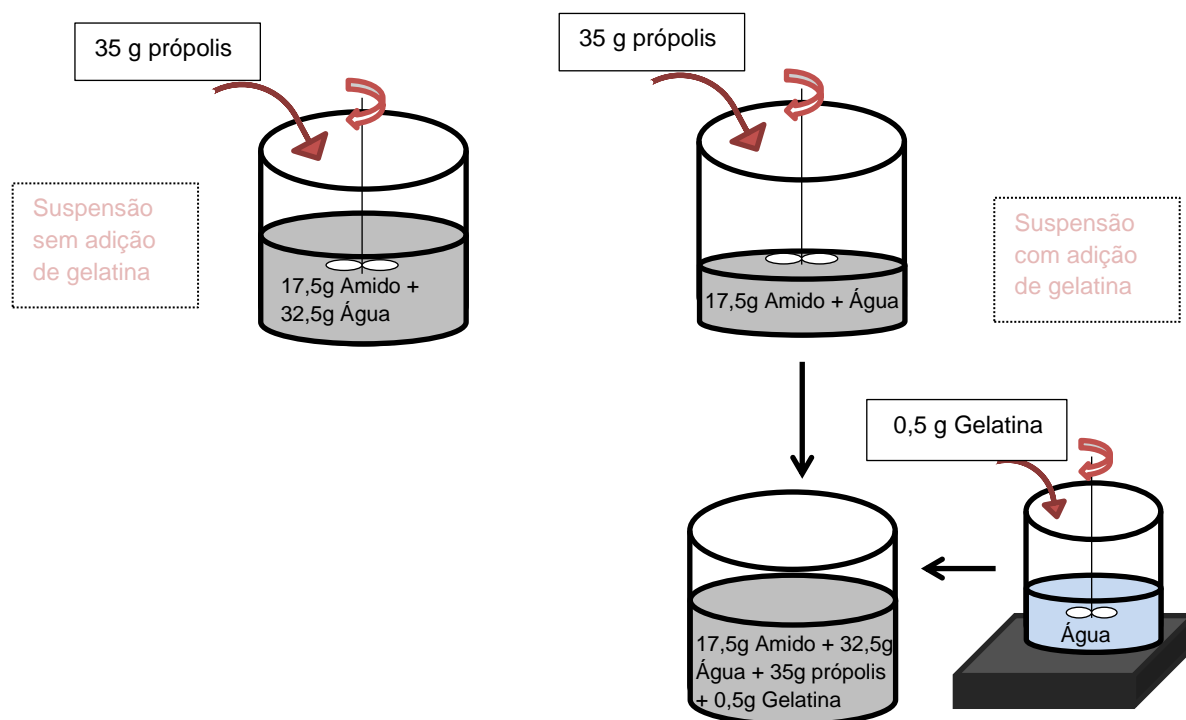


Figura 7: Preparação das suspensões de amido para realização da secagem no *spray-dryer*

4.2.3.2. Condições de operação do *Spray-dryer*

Na figura 8 encontra-se representado um esquema do processo de secagem por *spray-dryer*. O equipamento utilizado para a secagem das soluções foi um *Spray-dryer*, LabPlant, modelo SD-05, equipado com um *nozzle* de 0,5 mm de diâmetro, usando uma corrente de ar comprimido à pressão de 1,7 bar. A alimentação das soluções e suspensões a secar foi efetuada usando uma bomba peristáltica.

No caso das soluções com **quitosano**, a temperatura do ar à entrada foi de 180°C e a velocidade de alimentação foi de 9,3 mL/min

Para as suspensões de **amido** a temperatura do ar à entrada definida foi de 120°C e a velocidade de alimentação foi de 4,7 mL/min.

A realização do processo foi idêntica, apenas os fatores anteriormente referidos (temperatura e velocidade de bomba) divergiram caso fosse uma suspensão de amido ou uma solução de quitosano.

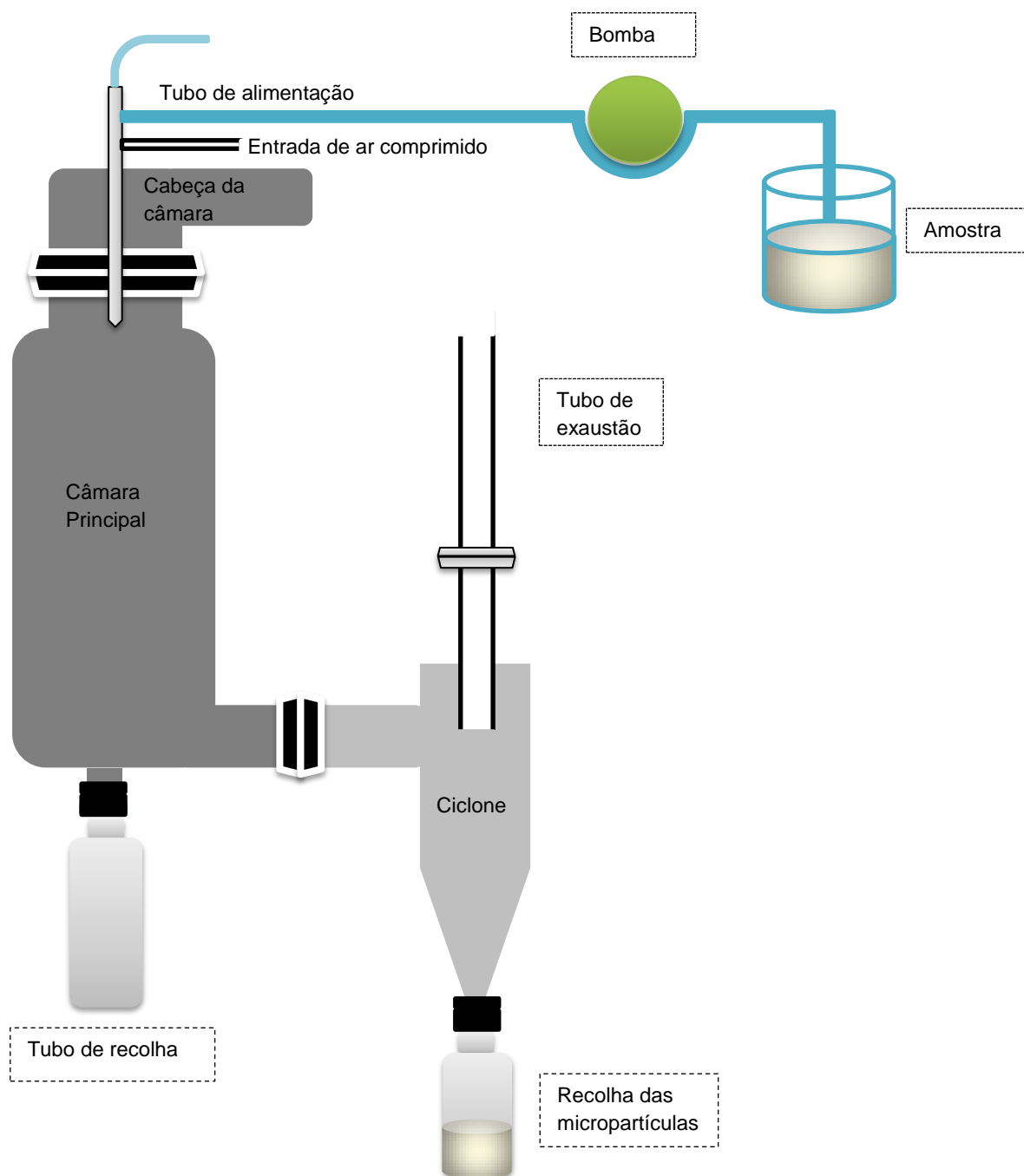


Figura 8: Representação esquemática do processo de encapsulamento por *spray-drying*

4.2.4 Caracterização das micropartículas

4.2.4.1 Morfologia e tamanho

A microscopia eletrônica de varrimento é utilizada para a caracterização das partículas, mais especificamente, da morfologia externa das partículas.

As amostras foram colocadas num suporte de amostras de alumínio, revestidas com ouro e paládio e, finalmente, analisadas por microscopia eletrônica de varrimento (Hitachi, modelo 52400).

4.2.4.2 Carregamento/ Grau de encapsulamento

A quantidade de própolis incorporado nas micropartículas foi quantificada em termos de fenólicos totais. As partículas foram desintegradas misturando 50 mg de partículas em 20 mL de solução de ácido acético e procedendo a agitação vigorosa com um homogeneizador Ultraturrax (IKA Labortechnik T25 Basic). Mediu-se a absorvância do sobrenadante a 280 nm e expressou-se o resultado em EAG, como descrito no ponto **4.2.1**.

4.2.4.3 Atividade antioxidante das partículas produzidas

As partículas foram ainda analisadas em termos de atividade antioxidante, aplicando os métodos utilizados na avaliação da atividade antioxidante do extrato de própolis (ponto **4.2.2**). A diferença consistiu no fato de se adicionarem as partículas, com o própolis encapsulado, diretamente às soluções de DPPH e de reagente FRAP, de acordo com o método usado. A atividade antioxidante foi expressa em termos de TEAC (Mtrolox/g própolis).

✓ Método DPPH

No método DPPH, as quantidades de amostra adicionadas à solução diária DPPH (2,850 ml) foram as seguintes:

Quitosano + Própolis (Q+P): 2 mg

Quitosano + Própolis + Ácido Cítrico (Q+P+AC): 3 mg

Amido + Própolis (A+P): 1 mg

Amido + Própolis + Gelatina (A+P+G): 1 mg

Posteriormente à incubação durante 40 minutos, e de modo a não ocorrer qualquer interferência na leitura das amostras, foram separadas as partículas por filtração tendo sido medida a absorvância do filtrado a 517 nm.

✓ Método FRAP

No método FRAP, adicionou-se à solução composta por água destilada (270µl) e reagente FRAP (2,7 ml) uma massa de 0,9 mg de cada tipo partículas.

Após a reação durante 30 minutos em banho-maria a 37°C, as partículas foram separadas por filtração e foi medida a absorvância do filtrado a 595 nm.

4.2.5 Avaliação da velocidade de liberação

Foi realizado um estudo da velocidade de liberação e da quantidade total de própolis libertada das diferentes micropartículas em dois meios aquosos distintos, numa solução de ácido acético a 1% v/v (pH = 3,98) e em tampão fosfato (pH = 7,26) de modo a avaliar o comportamento das partículas quando incorporadas em formulações com diferentes valores de pH. A solução de ácido acético foi escolhida sobretudo pela possibilidade de incorporação posterior das partículas em revestimentos e filmes bioativos comestíveis de quitosano.

4.2.5.1 Meios de liberação

Para o ensaio de liberação em meio ácido foi preparada uma **solução de ácido acético a 1%**, cujo pH foi de 3,89.

Para o ensaio em meio neutro foi preparada uma solução de **tampão fosfato**, que resultou da adição de duas soluções previamente preparadas: **Na₂HPO₄ 0,1M** e **HCl 0,1M**, obtendo-se uma solução com pH = 7,26.

4.2.5.2 Ensaio de liberação

Os ensaios de liberação envolveram os seguintes passos:

- 1- A solução aquosa (V = 100 mL) foi introduzida num vaso com agitação magnética;
- 2- Adicionam-se as partículas (m = 100 mg) à solução sob agitação;
- 3- Foram retiradas amostras (V = 1 mL) em intervalos regulares de tempo;
- 4- Cada amostra foi imediatamente centrifugada, sendo o depósito sólido (partículas) devolvido ao vaso. O sobrenadante foi posteriormente analisado;
- 5- Por cada amostra retirada introduziu-se imediatamente 1 mL de solução aquosa original ao vaso, de modo a manter o volume constante.

Adicionalmente aos tipos de micropartículas já referidas - Quitosano + Própolis (Q+P), Quitosano + Própolis + Ácido Cítrico (Q+P+AC), Amido + Própolis (A+P) e Amido + Própolis + Gelatina (A+P+G) - foram estudadas também partículas de quitosano reticuladas com tripolifosfato (Sigma Aldrich). Estas foram preparadas *in-situ* no início do ensaio de liberação, adicionando micropartículas de Quitosano + Própolis (Q+P) à solução aquosa (de ácido acético ou tampão fosfato) contendo 1% m/m de tripolifosfato, e são designadas por Q+P+TPF.

A quantidade de própolis presente em cada amostra foi quantificada e expressa em termos de teor de fenólicos totais, como descrito no ponto 4.2.1.

Para o ensaio em ácido acético utilizou-se a curva de calibração com ácido gálico apresentada na figura 3. A quantificação da massa de fenólicos libertada no ensaio de liberação em solução tampão foi realizada usando a curva de calibração da figura 9, obtida dissolvendo o ácido gálico em solução tampão.

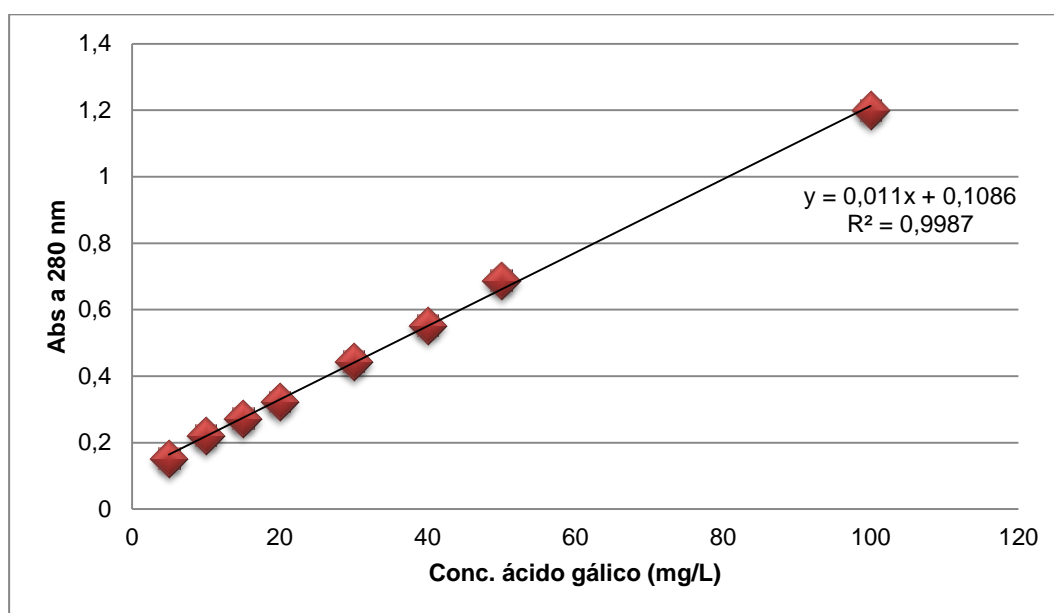


Figura 9: Curva de calibração com ácido gálico em solução tampão

4.2.5.3 Observação por Microscopia ótica

As micropartículas foram observadas por microscopia ótica durante os ensaios de liberação, ao fim de 30 minutos, com o objetivo de verificar a sua integridade física. Para isso usou-se um microscópio de fluorescência (Ernst Leitz Wetzlar GMBH).

Nos ensaios em ácido acético as partículas foram observadas numa ampliação de 25x e nos ensaios em tampão fosfato as amostras foram observadas numa ampliação de 100x.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Determinação dos fenólicos totais do extrato de própolis

O valor obtido, expresso em equivalentes de ácido gálico, foi de **0,0234 mg Ác. Gálico/ mg de própolis**, o que corresponde a cerca de 2,3% m/m. Este valor está dentro do intervalo de valores apresentado por Mohammadzadeh *et al.* (2007) (1,22-7,79 % m/m).

Porém, no trabalho de Moreira *et al.* (2008) são referidos os valores de 0,329 mg EAG/mg própolis e 0,151 mg EAG/mg própolis para duas amostras provenientes de diferentes regiões de Portugal. Por outro lado, Silva (2008) refere valores entre 13,2 e 18,7 %m/m e Silva (2009) apresenta valores que variam entre 8,51 e 10,11 %m/m, o que indica uma maior concentração de fenólicos quando comparada com a obtida neste trabalho.

A variabilidade do teor de fenólicos totais apresentados está relacionada com a complexidade do própolis em termos de composição química, que é dependente da flora de onde é produzido assim como da época do ano em que é recolhido.

Segundo vários autores, existe uma forte relação entre a quantidade de fenólicos e a atividade antioxidante sendo estes alguns dos componentes que mais contribuem para a mesma. Também é importante referir que estes compostos podem ser bastante influenciados por fatores externos como manuseamento, armazenamento, temperatura, entre outros (Mohammadzadeh *et al.*, 2007; Moreira, 2008), sendo natural e expectável encontrar valores diferentes em amostras diferentes.

5.2 Determinação da atividade antioxidante do extrato de própolis

A atividade antioxidante foi avaliada com base na captura do radical livre de DPPH (**método DPPH**) e na capacidade de redução do ferro (**método FRAP**). Os resultados foram convertidos em TEAC (*Trolox Equivalent Antioxidant Capacity*).

No caso da realização do **método DPPH**, os valores obtidos de RSA (Radical Scavenging Activity) e TEAC (Trolox Equivalent Antioxidante Capacity) foram os seguintes:

RSA da amostra (%): 46

TEAC: 0,200 M Trolox/ g própolis

O valor obtido de TEAC indica que o própolis tem capacidade para a redução do radical DPPH.

Os estudos da atividade antioxidante do própolis pelo método DPPH, onde a mesma é expressa em TEAC são escassos. No entanto, existem referências que indicam a atividade antioxidante em termos de "Radical Scavenging Activity" (RSA).

Silva (2008) refere valores de RSA de um extrato com uma concentração de própolis de 25 µg/mL, que variam entre 10,5 e 18,56 %. O extrato utilizado neste trabalho tem uma concentração 694 µg/mL pelo que apresenta uma capacidade de captação de radicais de DPPH inferior. Este fato está em linha com o teor de fenólicos totais. Silva (2008) refere valores entre 13,2 e 18,7 % m/m de fenólicos totais enquanto que a amostra de própolis estudada neste trabalho apresenta uma concentração desses compostos de 2,3% m/m.

Moreira *et al.* (2008) analisaram extratos com a mesma concentração de própolis, cujo local de recolha era diferente, e observaram valores de RSA bastante diferentes, variando entre 1% e 54%. Estes valores foram comparados com o teor de fenólicos notando-se uma relação entre ambos uma vez que a amostra com maior teor de fenóis era a que apresentava maior capacidade antioxidante. O aumento da capacidade antioxidante com o aumento do teor de fenólicos foi também referido por Silva (2009).

Na realização do **método FRAP**, o valor de TEAC obtido foi de **0,335 M Trolox/g própolis**.

Através do valor de TEAC obtido é possível afirmar que o própolis apresenta atividade em termos de redução do complexo férrico F^{3+} -TPTZ.

Mohammadzed *et al.* (2007) utilizou o método FRAP na análise de amostras de própolis com diferentes concentrações e de regiões diferentes. Verificou que extratos diferentes, mesmo com a mesma concentração, apresentaram uma capacidade de redução do complexo F^{3+} -TPTZ completamente distintos concluindo que o própolis é extremamente dependente do ambiente onde é produzido.

5.3 Caraterização das partículas

5.3.1 Morfologia e tamanho

A morfologia e a distribuição de tamanho de partículas foram estudadas recorrendo a microscopia eletrónica de varrimento.

Micropartículas à base de quitosano

Nas figuras 10 e 11 estão apresentadas imagens das micropartículas de quitosano com própolis (Q+P) e das micropartículas de quitosano com própolis e ácido cítrico (Q+P+AC), respetivamente. Para uma análise complementar na figura 12 encontra-se uma esfera de quitosano reticulada com o ácido cítrico.

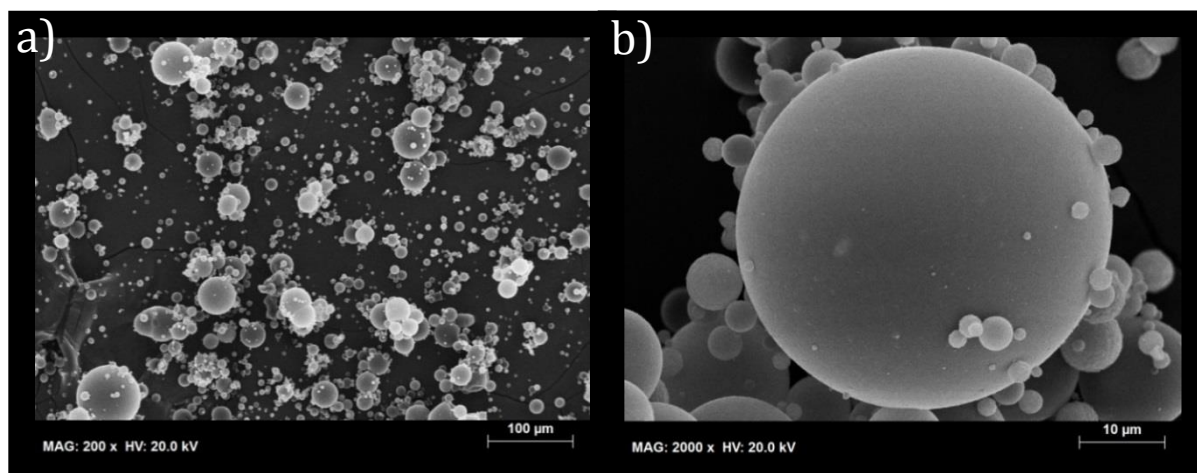


Figura 10: Micropartículas de Quitosano com Própolis. Ampliação: a) 200 x; b) 2000 x

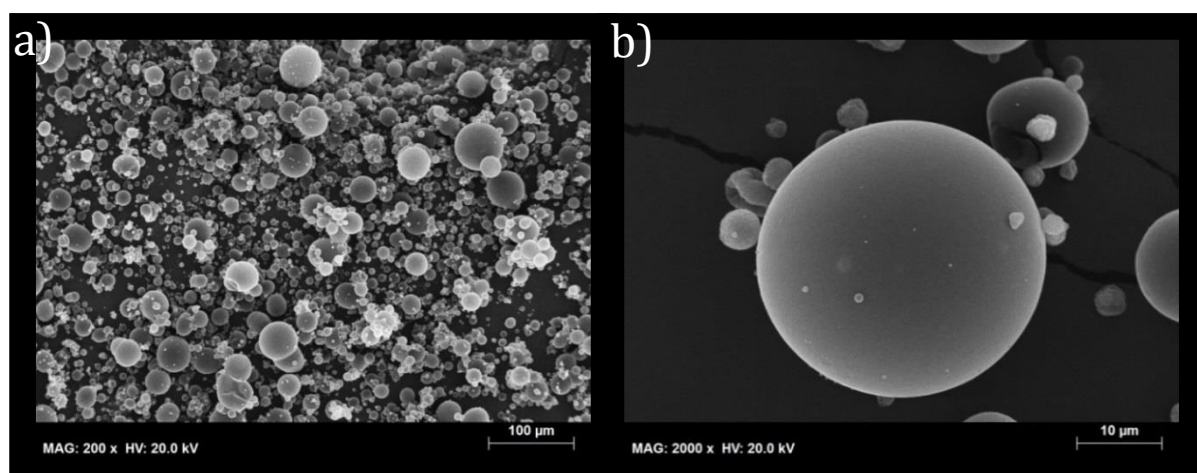


Figura 11: Micropartículas de Quitosano com Ácido cítrico e Própolis. Ampliação: a) 200 x; b) 2000 x

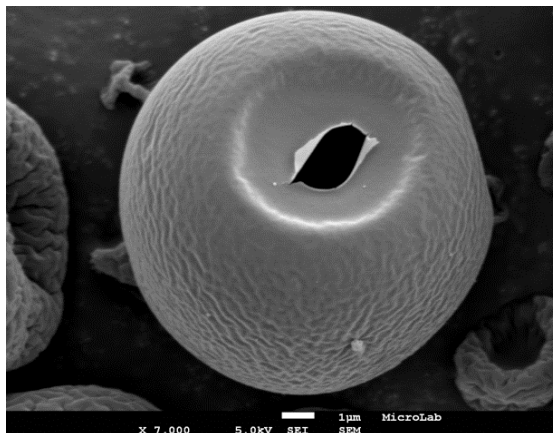


Figura 12: Esfera de quitosano com ácido cítrico colapsada

Verifica-se que, em ambos os casos, as partículas são esféricas com uma superfície lisa. É possível observar também, através da figura 12, que estas esferas são ocas com uma parede de baixa espessura.

Em termos de morfologia externa, a cápsula apresentada na figura 12, apresenta uma superfície mais irregular (com uma região colapsada), quando comparada com as esferas obtidas com quitosano e ácido cítrico e com própolis encapsulado (figura 11). O mesmo efeito foi observado entre as cápsulas de quitosano (imagens não apresentadas) e quitosano com própolis. Este fato pode ser devido ao vácuo aplicado no compartimento das amostras durante a análise. O vácuo poderá provocar uma deformação das cápsulas que apresentam uma parede menos resistente. É possível que a presença de própolis reforce a parede das esferas, atribuindo-lhe uma resistência mecânica que resista à sucção do ar interior por aplicação de vácuo, mantendo a sua integridade física e superfície lisa.

Assume-se que nestas cápsulas à base de quitosano, o encapsulamento dos compostos do extrato de própolis se dê essencialmente na matriz polimérica que compõe a parede das cápsulas dado que se encontram solubilizados na solução de alimentação.

Nas figuras 13 e 14 apresenta-se a distribuição de tamanhos das partículas de quitosano com própolis (Q+P) e de quitosano com própolis e ácido cítrico (Q+P+AC), respetivamente.

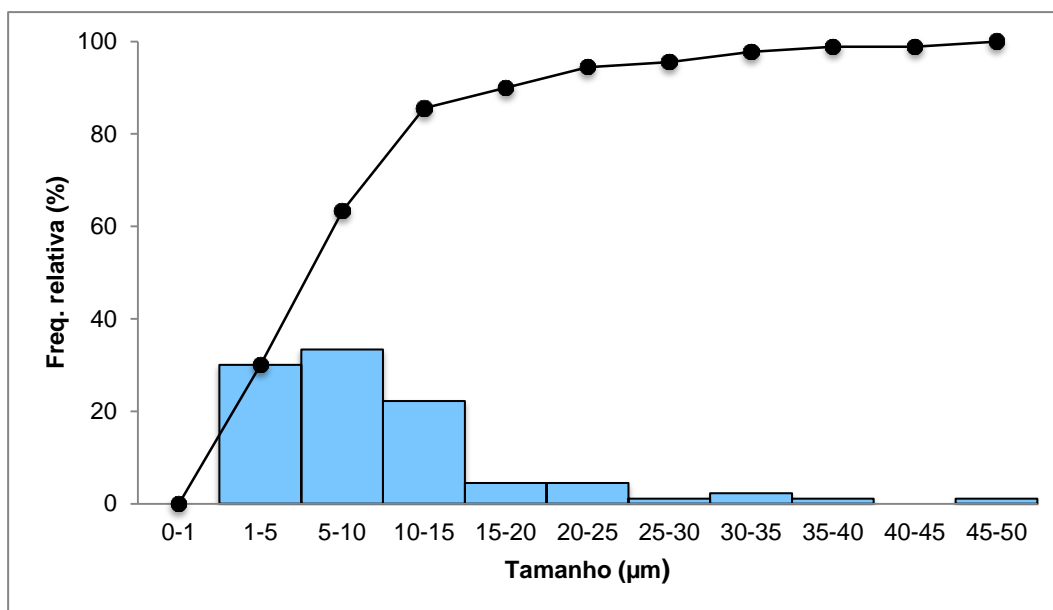


Figura 13: Distribuição do tamanho das partículas de Q+P

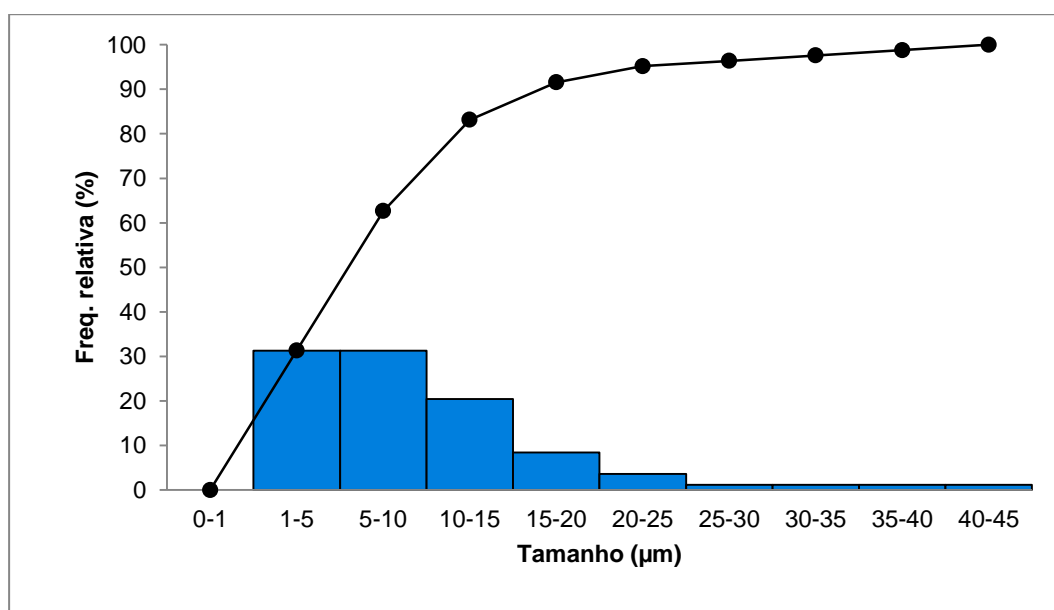


Figura 14: Distribuição do tamanho das partículas de Q+P+AC

Os dois tipos de partículas apresentam uma distribuição de tamanhos muito semelhante. O diâmetro das esferas varia entre cerca de 1 μm e 50 μm , sendo que cerca de 90% das partículas tem um diâmetro entre 1 e 15 μm . O diâmetro médio é de 9,9 μm e 9,7 μm para as esferas Q+P e Q+P+AC, respectivamente.

As esferas de quitosano com própolis reticuladas com tripolifosfato (Q+P+TPF) não foram analisadas por microscopia eletrônica de varrimento, dado que a reticulação só foi realizada no início dos ensaios de liberação controlada.

Micropartículas à base de amido

Nas figuras seguintes (15 e 16) são apresentadas imagens das micropartículas de amido sem e com gelatina.

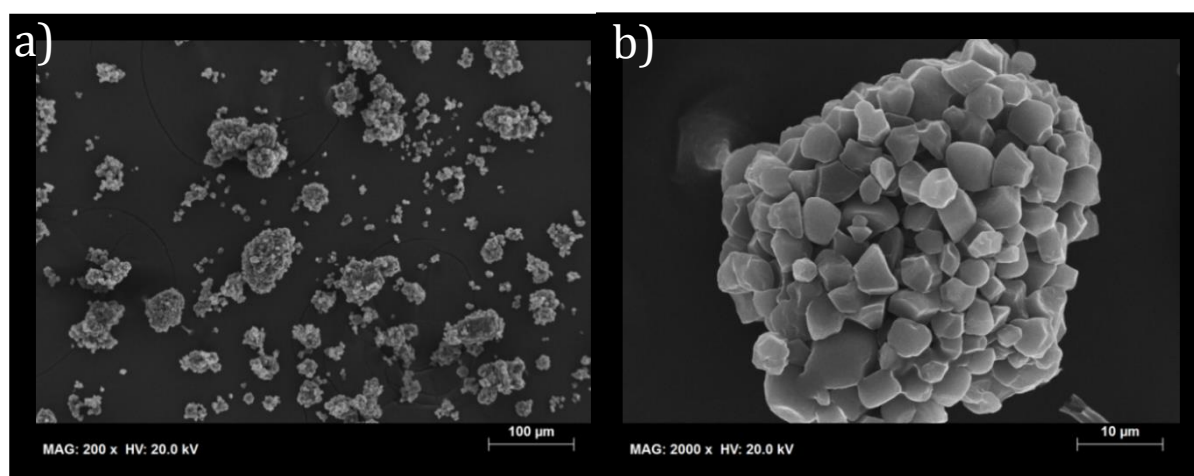


Figura 15: Micropartículas de Amido com Própolis. Ampliação: a) 200 x; b) 2000 x

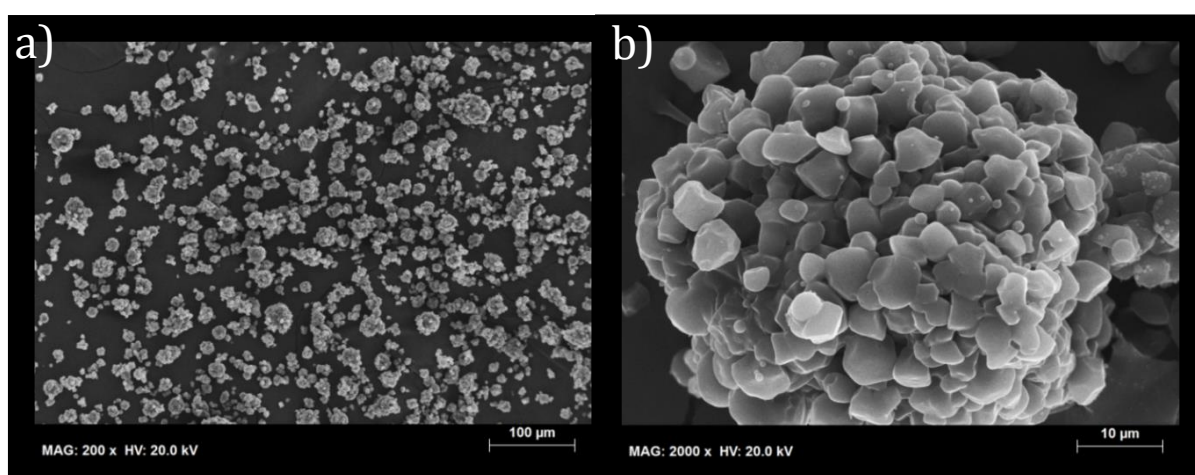


Figura 16: Micropartículas de Amido com Gelatina e Própolis. Ampliação a) 200 x; b) 2000 x

Estas micropartículas apresentam uma morfologia totalmente diferente das de quitosano. São constituídas por agregados de grânulos de amido formando uma estrutura tridimensional com espaços vazios entre os grânulos. A forma das partículas é irregular aproximando-se, na maior parte

dos casos, de uma forma esférica. Durante o processo de encapsulamento, os compostos do extrato de própolis ficam essencialmente aprisionados nos espaços vazios entre os grânulos de amido.

Nas figuras 17 e 18 apresenta-se a distribuição do tamanho das partículas de amido sem e com gelatina, respetivamente.

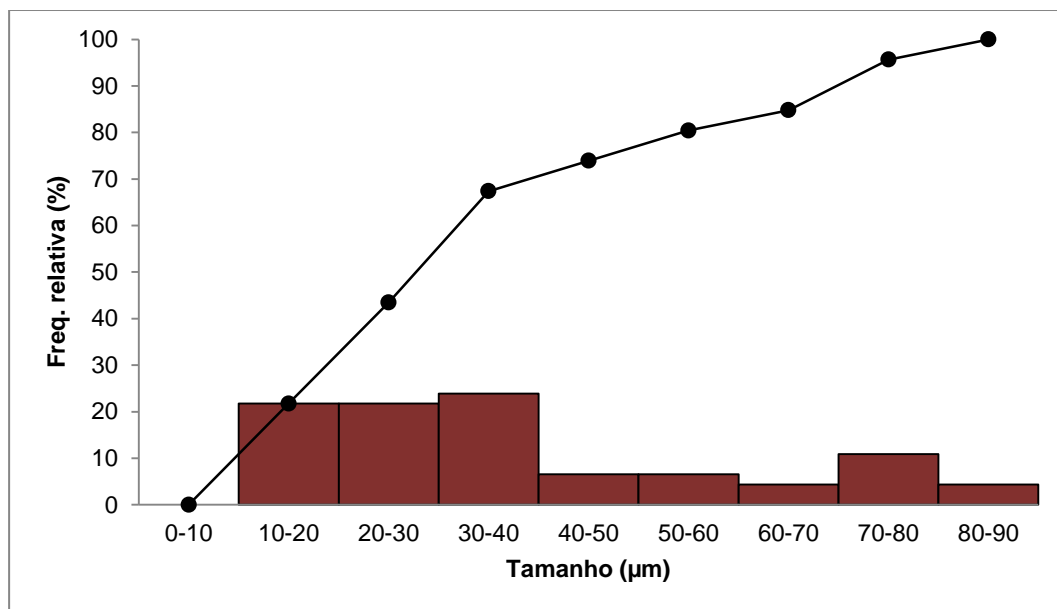


Figura 17: Distribuição do tamanho das partículas de A+P

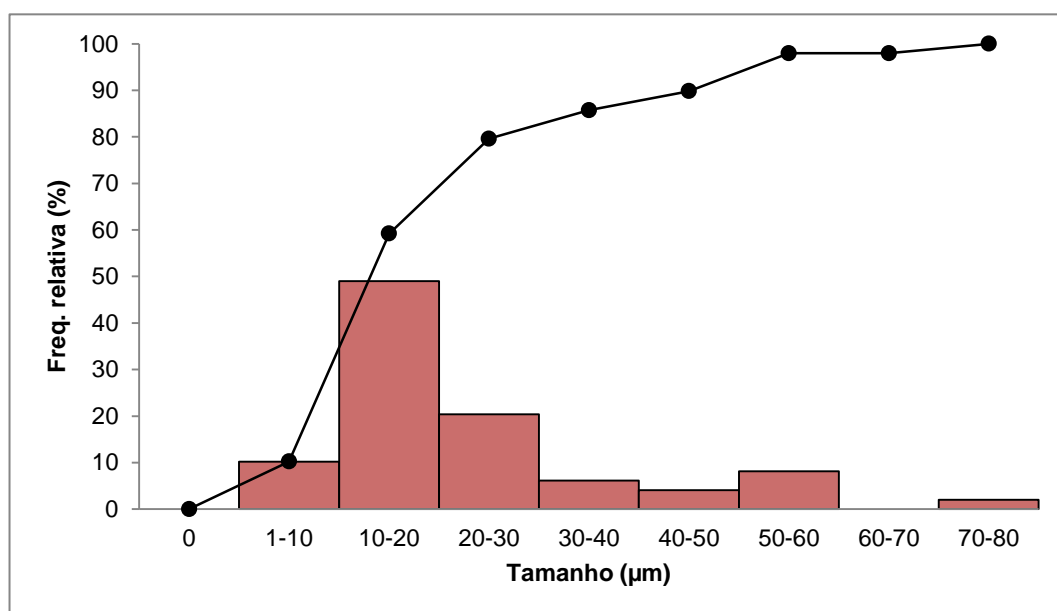


Figura 18: Distribuição do tamanho das partículas de A+P+G

Verifica-se que ambas apresentam uma gama alargada de tamanhos. Porém, as partículas produzidas com gelatina apresentam uma maior frequência para tamanhos mais baixos: cerca de

80% das partículas têm um tamanho entre 1 e 30 μm , sendo que 50% têm um tamanho entre 20 e 30 μm . Por outro lado, as partículas produzidas sem gelatina apresentam um tamanho superior. Neste caso, cerca de 70% apresentam um tamanho compreendido entre 10 e 40 μm . O fato de a gelatina favorecer a formação de uma maior fração de partículas menores, muitas delas correspondendo a grânulos de amido isolados, foi também observado por Beirão-da-Costa *et al.* (2011). O diâmetro médio é de 23,4 e 37,5 μm para as partículas com e sem gelatina, respectivamente, sendo superior ao obtido para as esferas de quitosano (cerca de 10 μm).

5.3.2 Carregamento das partículas

Na tabela 3 apresentam-se os valores de massa de fenólicos encapsulada nas partículas, expressa em mg EAG por massa de partículas.

Tabela 3: Teor de fenólicos das partículas

Tipo de micropartículas	Fenólicos totais (mg EAG / mg partículas)
Quitosano + Própolis	0,0492
Quitosano + Própolis + AC	0,0534
Quitosano + Própolis + TPF	0,0492
Amido + Própolis	0,0537
Amido + Propolis + Gelatina	0,0617

Verifica-se que a maior incorporação se obteve nas partículas de amido com gelatina sendo, no entanto, o grau de incorporação muito semelhante para todas as partículas produzidas.

É de salientar que o teor de fenóis no extrato de própolis (cerca de 2,3% m/m) é inferior à sua concentração nas micropartículas. Desta feita, é de afirmar que, para além de um papel de

estabilização dos compostos bioativos, o processo de encapsulamento por *spray-drying* promove uma concentração desses compostos numa matriz sólida.

5.3.3 Atividade antioxidante das partículas

A atividade antioxidante das partículas resultante da análise com os métodos DPPH e FRAP encontra-se na tabela 4.

Tabela 4: Atividade antioxidante das micropartículas pelos métodos DPPH e FRAP

Método	Micropartículas			
	Q+P	Q+P+AC	A+P	A+P+G
DPPH TEAC ($\mu\text{M}/\mu\text{g}$)	0,0178	0,0068	0,0411	0,0385
FRAP TEAC ($\mu\text{M}/\mu\text{g}$)	0,0223	0,0204	0,0175	0,0166

Pela análise dos fenóis verificou-se um aumento da sua concentração no sentido do própolis em extrato para as partículas. No entanto, este aumento da concentração não foi acompanhado de um aumento da atividade antioxidante cujos valores obtidos foram bastante mais baixos que os observados para o extrato. Por outro lado, tendo em conta os teores de fenólicos totais das partículas apresentados na tabela 3, poder-se-ia esperar uma atividade antioxidante semelhante entre elas, o que não se verificou. Estes resultados podem ser devidos ao fato de, nestas medições, as próprias partículas serem colocadas em contato direto com o radical de DPPH e com o reagente FRAP. Nestas condições, a extensão das reações de captura de radicais e de redução do ferro por parte dos fenólicos encapsulados é influenciada por limitações difusionais que serão diferentes consoante a matriz encapsulante.

5.4 Avaliação da velocidade de liberação

5.4.1 Liberação em Meio Ácido (ácido acético 1%)

Na figura 19 são apresentados os perfis de liberação de compostos fenólicos a partir das micropartículas que contêm quitosano na sua constituição (Q+P; Q+P+AC; Q+P+TPF), e na tabela 5 encontra-se a quantidade máxima de compostos fenólicos libertados bem como a velocidade inicial de liberação.

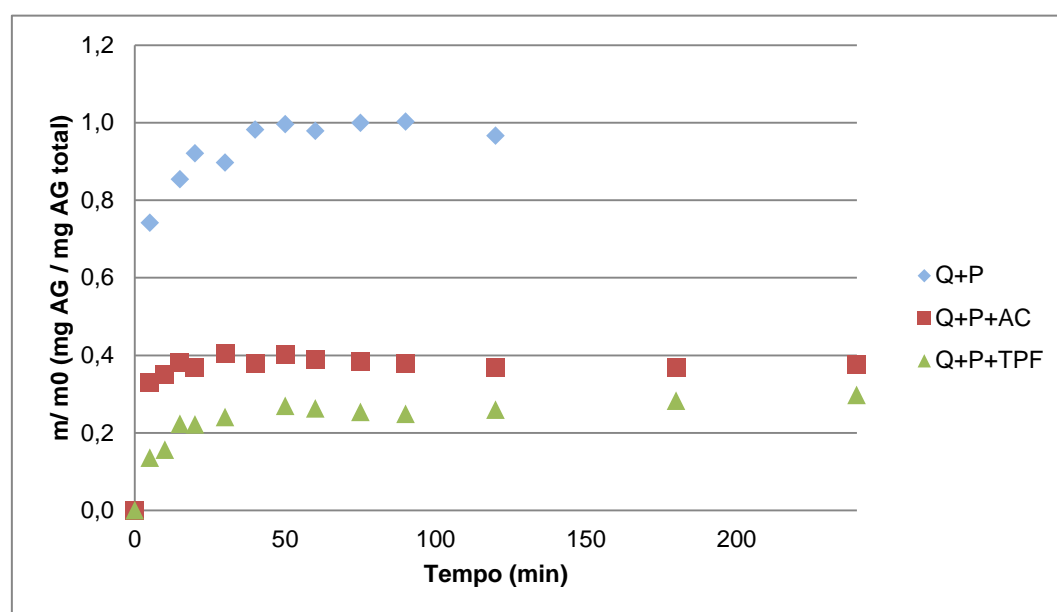


Figura 19: Perfis de liberação de compostos fenólicos a partir de micropartículas à base de quitosano em meio ácido. **m** refere-se à massa libertada em função do tempo e **m0** a massa total presente nas micropartículas no início do ensaio.

Tabela 5: Velocidade inicial de liberação e quantidade máxima libertada (% m/m) nos ensaios de liberação a partir das partículas de quitosano em meio ácido

Partículas	Libertação no patamar (%)	Velocidade Inicial de Liberação (mg EAG/min)
Q + P	100	0,726
Q + P + AC	39	0,352
Q + P + TPF	27	0,027

Verifica-se que as micropartículas de quitosano permitem um maior aprisionamento dos compostos fenólicos quando se encontram reticuladas ou modificadas quimicamente por ação do ácido cítrico, caso contrário, a liberação ocorre com uma velocidade elevada e na totalidade. De fato, no ensaio de liberação a partir das partículas Q+P, ocorreu a liberação total após cerca de 40 minutos o que indica uma fraca capacidade por parte do quitosano por si só para o aprisionamento do própolis em meio ácido.

Com a modificação química com ácido cítrico reduziu-se para cerca de metade a velocidade de liberação inicial, face à obtida com partículas não modificadas, e a massa total libertada desceu para cerca de 40%. A reticulação com tripolifosfato foi ainda mais eficiente na medida em que se conseguiu reter nas partículas, durante o período de tempo estudado, 73% da massa de compostos fenólicos passível de ser libertada.

Os processos de reticulação promovem o estabelecimento de ligações cruzadas entre as moléculas de quitosano, aumentando a sua rigidez, diminuindo a solubilidade e o grau de “swelling” (intumescimento por absorção de água) quando introduzidas em soluções aquosas. Assim, em partículas reticuladas, o processo de difusão de compostos no seu interior é dificultado devido ao menor espaço livre entre as moléculas do polímero. As reações de reticulação com o tripolifosfato envolvem interações iônicas entre os grupos negativos deste composto com os grupos $-NH_3^+$ do quitosano. Este processo dá origem a um grau de reticulação elevado obtendo-se uma matriz polimérica rígida.

Por outro lado, na presença de ácido cítrico, existe uma modificação química do quitosano resultante da reação entre os grupos amina do mesmo com o ácido cítrico levando à formação de estruturas amida laterais, que aumentam a resistência das esferas à entrada de água (figura 20).

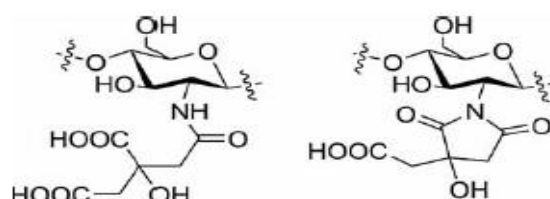


Figura 20: Reação entre grupos amina do quitosano com o ácido cítrico

Este fenómeno foi observado em filmes de quitosano, cujo grau de absorção de água diminuiu de forma significativa quando os filmes foram produzidos na presença de ácido cítrico (Cui *et al.*, 2011). As moléculas de ácido cítrico que não participam nas reacções mas que se mantêm na matriz polimérica podem funcionar como agente plastificante. Estas diferenças entre o modo de atuação do

ácido cítrico e do tripolifosfato podem estar na origem da diminuição da velocidade inicial de liberação e da massa total libertada na ordem observada: Q+P --> Q+P+AC --> Q+P+TPF.

Na figura 21 são apresentados os perfis de liberação de compostos fenólicos a partir das micropartículas à base de amido (A+P; A+P+G) e na tabela 6 encontra-se a quantidade máxima de compostos fenólicos libertados bem como a velocidade inicial de liberação.

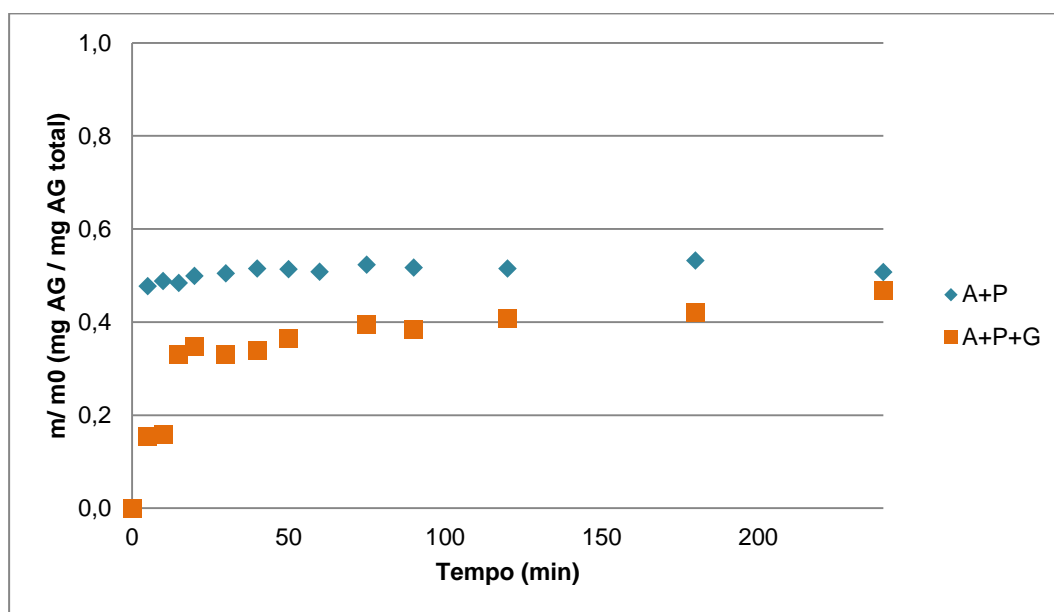


Figura 21: Perfis de liberação de compostos fenólicos a partir de micropartículas à base de amido em meio ácido. **m** refere-se à massa libertada em função do tempo e **m0** à massa total presente nas micropartículas no início do ensaio.

Tabela 6: Velocidade inicial de liberação e quantidade máxima libertada (% m/m) nos ensaios de liberação a partir das partículas de amido em meio ácido

Partículas	Libertação no patamar (%)	Velocidade Inicial de Libertação (mg EAG/min)
A + P	52	0,510
A + P + G	46	0,191

Verifica-se que nas partículas de amido sem gelatina (A+P) existe uma elevada velocidade inicial de liberação atingindo-se um patamar ao fim de cerca de 10 minutos, que corresponde a 50% da massa total de fenólicos passível de ser libertada. Por outro lado, para as partículas de amido com gelatina (A+P+G) o valor de 50% também é atingido mas só ao fim de 240 minutos. Existe portanto uma liberação mais lenta quando as partículas contêm a gelatina na sua formulação.

Segundo Beirão-da-Costa *et al.* (2011), a adição de gelatina (1% m/m) à suspensão de amido com concentração de 20% m/m tende a aumentar em cerca de 9% o diâmetro médio dos poros dos agregados formados e em cerca de 30% a porosidade intrapartícula. Os autores atribuem à gelatina não só a função de ligante mas também de material estruturante. Estes dados parecem estar em contradição com a menor velocidade de liberação observada a partir das partículas com gelatina, uma vez que nestas existiria mais espaço para a difusão dos compostos fenólicos. Porém, a gelatina é um material muito facilmente hidratável em solução aquosa, produzindo uma matriz de elevada viscosidade que reveste os grânulos de amido nos agregados. Esta camada poderá ser responsável pela diminuição do coeficiente de difusão dos compostos fenólicos no interior das partículas, tendo como resultado a menor velocidade de liberação observada.

Uma vez que o objetivo é avaliar a aptidão das diferentes micropartículas para aplicação em matrizes alimentares aproveitando a capacidade antioxidante e antimicrobiana e mascarar o sabor desagradável do própolis, as partículas potencialmente mais interessantes na indústria alimentar poderão ser as que retêm durante mais tempo os compostos do própolis. Anteriormente verificou-se que o grau de liberação mais baixo se deu nas micropartículas de quitosano reticulado, com tripolifosfato, de quitosano modificado por reação com ácido cítrico e de amido com gelatina. Na figura 22, encontram-se os 3 perfis de liberação em ácido acético referentes a estas partículas para uma mais fácil comparação.

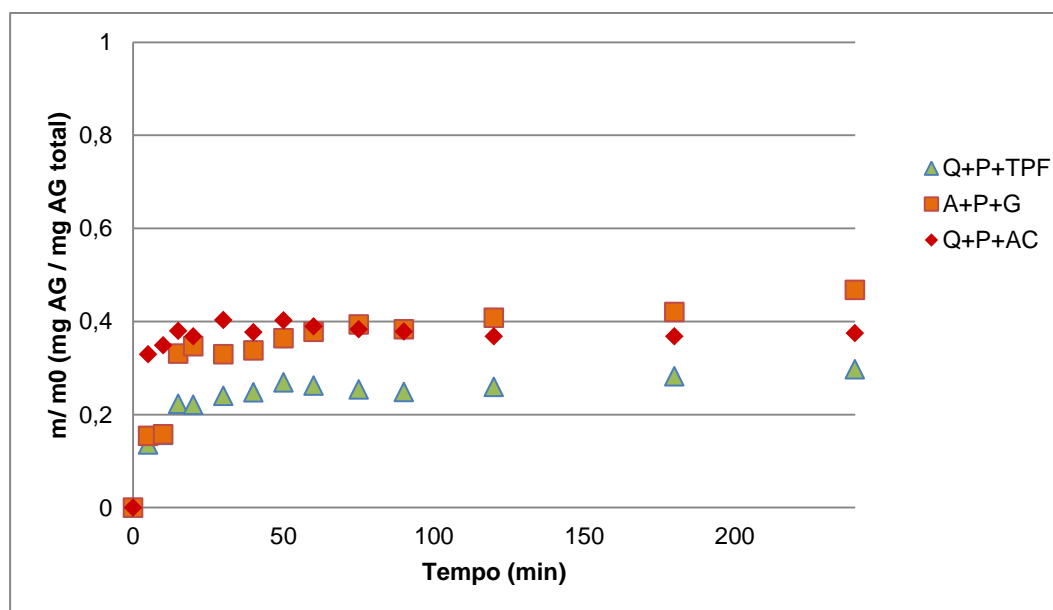


Figura 22: Análise comparativa do perfil de liberação a partir das partículas de Q+P+TPF, A+P+G e Q+P+AC em meio ácido.

Verifica-se uma liberação inicial mais rápida com as partículas Q+P+AC, sendo que se atinge uma massa máxima libertada de cerca de 40%, encontrando a liberação máxima das partículas de A+P+G um pouco mais acima (cerca de 46%). Adicionalmente, as partículas Q+P+TPF são as que retêm uma maior quantidade de compostos encapsulados.

Os diferentes perfis de liberação em meio ácido observados para as partículas estudadas permitem inferir que é possível desenhar partículas otimizadas, com um perfil de liberação específico, adequado às aplicações finais pretendidas.

5.4.2 Libertação em Meio Neutro (Tampão fosfato pH = 7,26)

Na figura 23 são apresentados os perfis de liberação de compostos fenólicos a partir das micropartículas que contêm quitosano na sua constituição (Q+P; Q+P+AC; Q+P+TPF) e na tabela 7 encontra-se a quantidade máxima de compostos fenólicos libertados bem como a velocidade inicial de liberação.

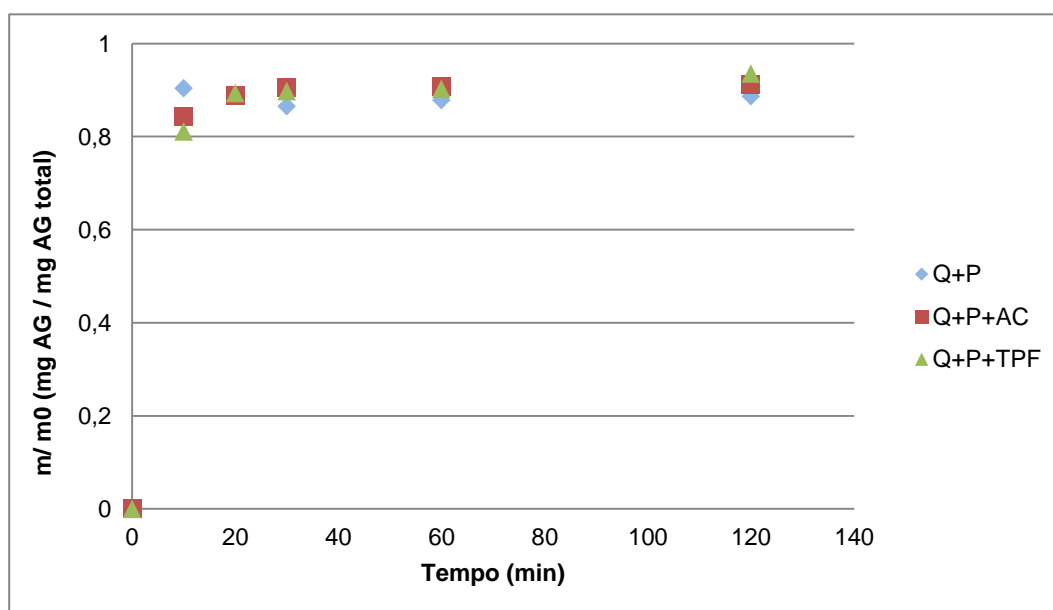


Figura 23: Perfis de liberação de compostos fenólicos a partir de micropartículas à base de quitosano em meio neutro. **m** refere-se à massa libertada em função do tempo e **m0** a massa total presente nas micropartículas no início do ensaio.

Tabela 7: Velocidade inicial de libertação e quantidade máxima libertada (% m/m) nos ensaios de libertação a partir das partículas de quitosano em meio neutro

Partículas	Libertação no patamar (%)	Velocidade Inicial de Libertação (mg EAG/min)
Q + P	89	0,443
Q + P + AC	91	0,448
Q + P + TPF	90	0,397

Verifica-se uma libertação rápida e quase total a partir de todas as micropartículas à base de quitosano, mesmo aquelas reticuladas com tripolifosfato e as modificadas quimicamente com ácido cítrico. A retenção dos compostos fenólicos do própolis em meio neutro é muito inferior à observada em meio ácido, especialmente para as partículas Q+P+AC e Q+P+TPF.

Este fato pode ser devido ao grau de protonação dos grupos amina das moléculas de quitosano. Em meio ácido, o número de grupos protonados é superior, tendo como consequência um maior número de cargas positivas nas partículas passíveis de formar interações eletrostáticas com os grupos hidroxilo dos compostos fenólicos, que apresentam uma densidade de carga negativa nos átomos de oxigénio. Esta interação pode ter como consequência uma diminuição de velocidade de difusão dos compostos fenólicos através da matriz polimérica, resultando numa menor libertação desses compostos. Em meio neutro, o grau de protonação do quitosano é inferior, o que leva a uma menor densidade de cargas positivas na matriz polimérica, tendo como consequência uma facilitação da difusão dos compostos fenólicos.

Adicionalmente, no caso das partículas Q+P+TPF, como foi referido anteriormente, a reticulação com tripolifosfato foi efectuada no início do ensaio de libertação, estando o meio de libertação complementado com 1% m/m desse composto. Sendo esta uma reacção de reticulação iónica, dependente da interacção entre as cargas positivas dos grupos amina protonados do quitosano e as cargas negativas do tripolifosfato, esta reacção será muito menos extensa em meio neutro, situação em que existe uma menor densidade de cargas positivas na matriz de quitosano. Deste modo, as partículas reticuladas em meio neutro apresentarão um grau de “swelling” superior ao que existe em meio ácido, favorecendo a libertação dos compostos encapsulados.

Na figura 24 são apresentados os perfis de libertação de compostos fenólicos a partir das micropartículas à base de amido (A+P; A+P+G) e na tabela 8 encontra-se a quantidade máxima de compostos fenólicos libertados bem como a velocidade inicial de libertação.

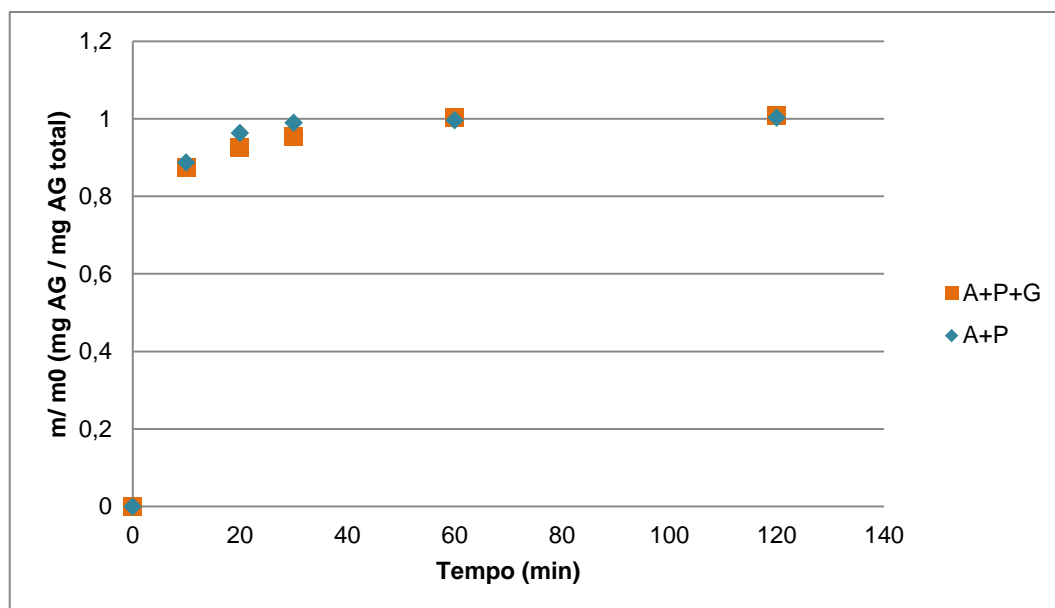


Figura 24: Perfis de liberação de compostos fenólicos a partir de micropartículas à base de amido em meio neutro. **m** refere-se à massa libertada em função do tempo e **m0** a massa total presente nas micropartículas no início do ensaio.

Tabela 8: Velocidade inicial de liberação e quantidade máxima libertada (% m/m) nos ensaios de liberação a partir das partículas de amido em meio neutro

Partículas	Libertação no patamar (%)	Velocidade Inicial de Liberação (mg EAG/min)
A + P	100	0,478
A + P + G	100	0,543

A liberação é muito idêntica em ambas as micropartículas ocorrendo liberação total num tempo inferior a 60 minutos.

Através da tabela 8 confirma-se a liberação total nas micropartículas de amido estando as velocidades muito próximas quer as partículas tenham gelatina ou não.

Na figura 25 resumem-se os perfis de liberação de todos os tipos de micropartículas estudados em meio neutro.

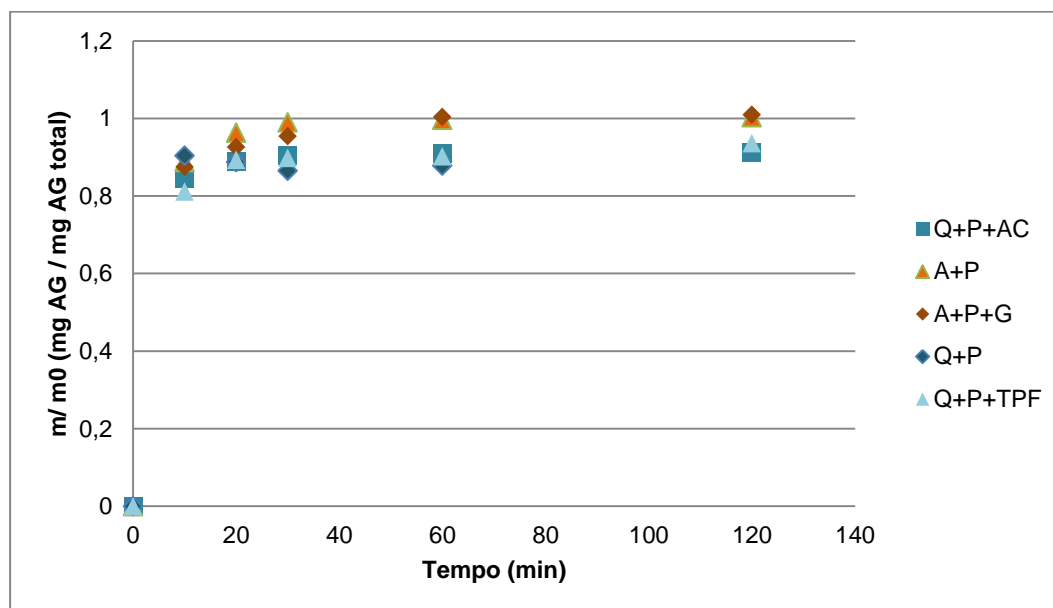


Figura 25: Análise comparativa de todas as liberações em tampão fosfato.

Através da figura 25 vê-se de forma mais clara que a velocidade de liberação é elevada por parte de todas as micropartículas estudadas, bem como a quantidade total libertada.

Fazendo uma avaliação global do comportamento das partículas nos dois meios estudados é possível inferir que existirá uma fraca retenção dos compostos encapsulados em produtos de origem animal (pH neutro) e uma maior retenção dos compostos em certos produtos de origem vegetal (pH ácido).

5.4.3 Observação por Microscopia Ótica

Nas figuras seguintes são apresentadas imagens das micropartículas obtidas durante os ensaios de liberação ao fim de 30 minutos (Figuras 26, 27, 28, 29 e 30 em meio ácido e figuras 31, 32, 33, 34 e 35 em meio neutro).

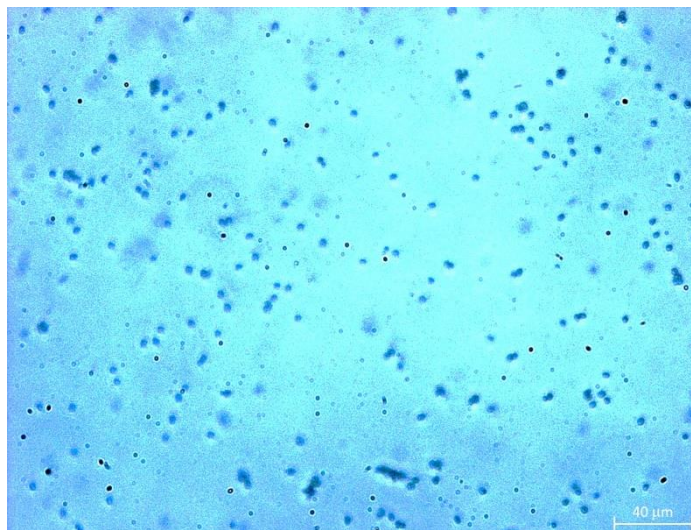


Figura 26: Q+P após 30 minutos em ácido acético

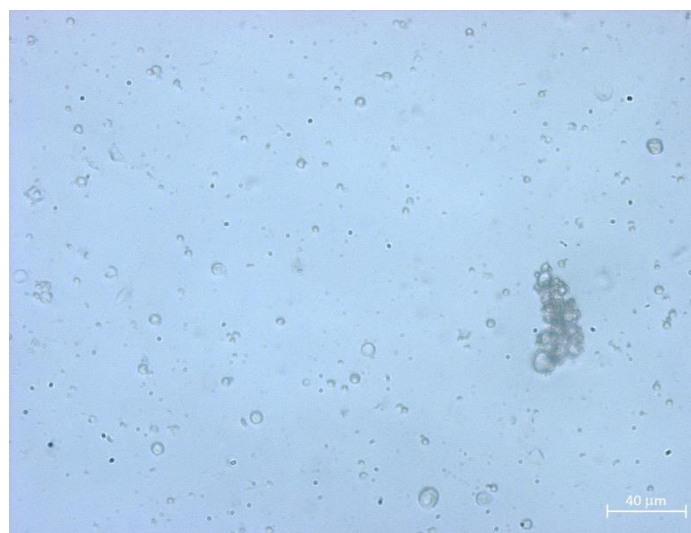


Figura 27: Q+P+AC após 30 minutos em ácido acético



Figura 28: Q+P+TPF após 30 minutos em ácido acético

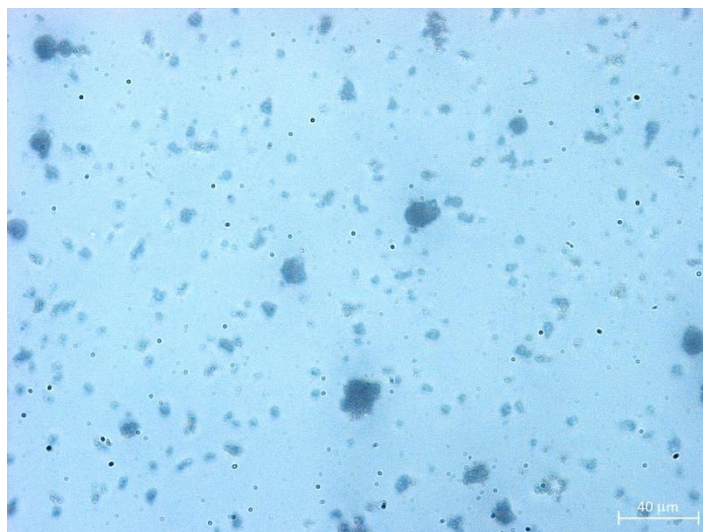


Figura 29: A+P após 30 minutos em ácido acético

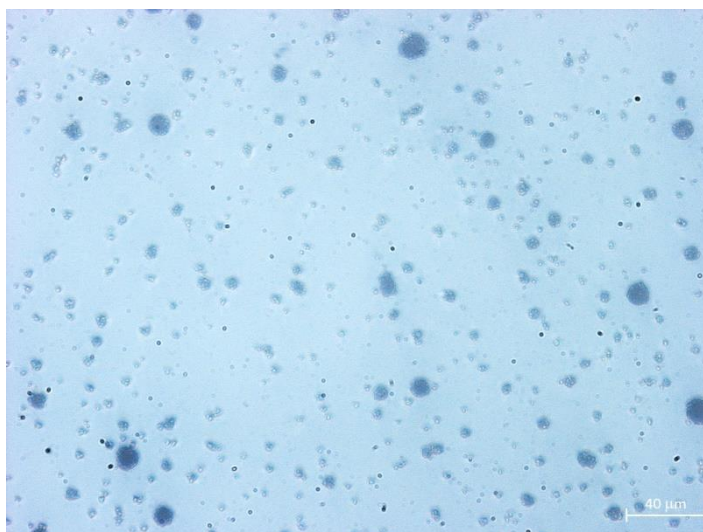


Figura 30: A+P+G após 30 minutos em ácido acético

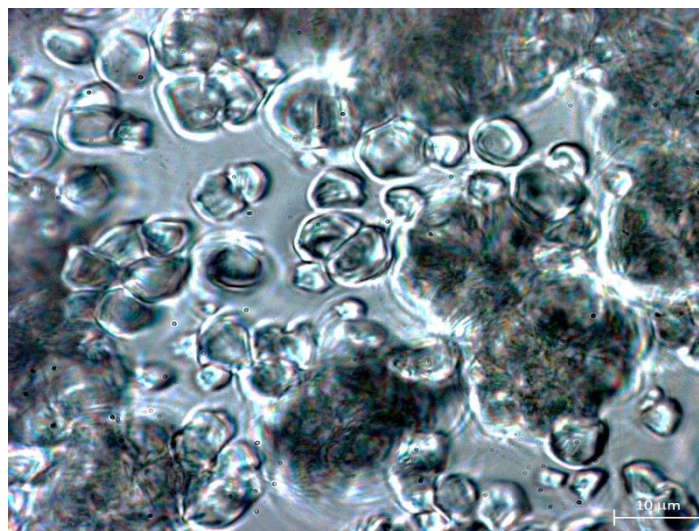


Figura 31: Q+P após 30 minutos em meio tampão

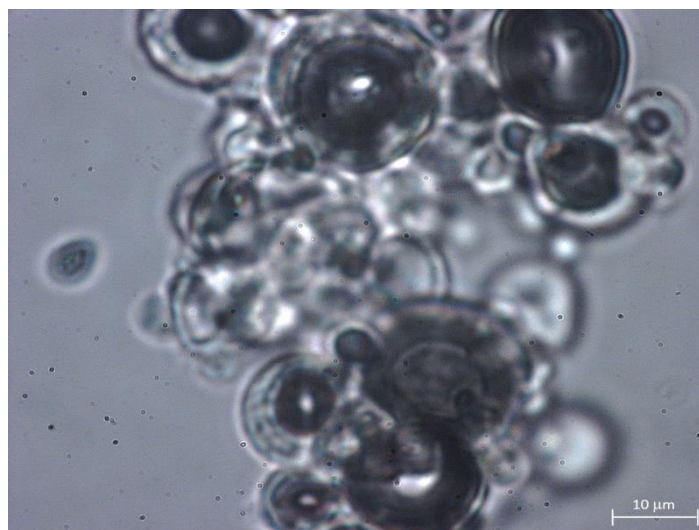


Figura 32: Q+P+AC após 30 minutos em meio tampão

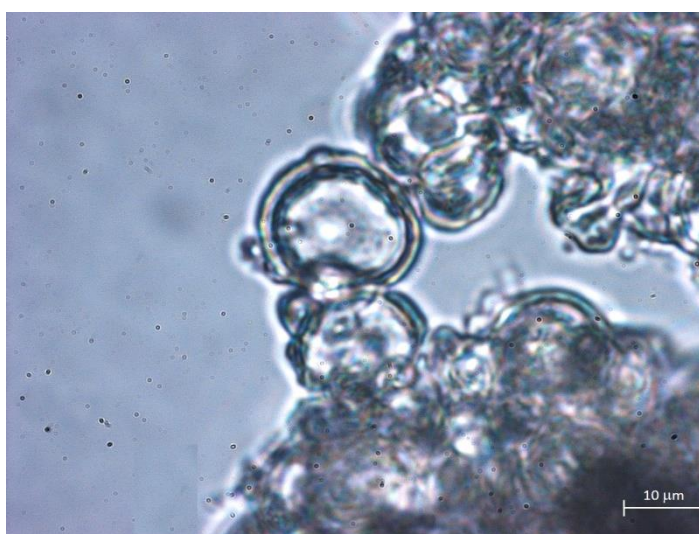


Figura 33: Q+P+TPF após 30 minutos em meio tampão

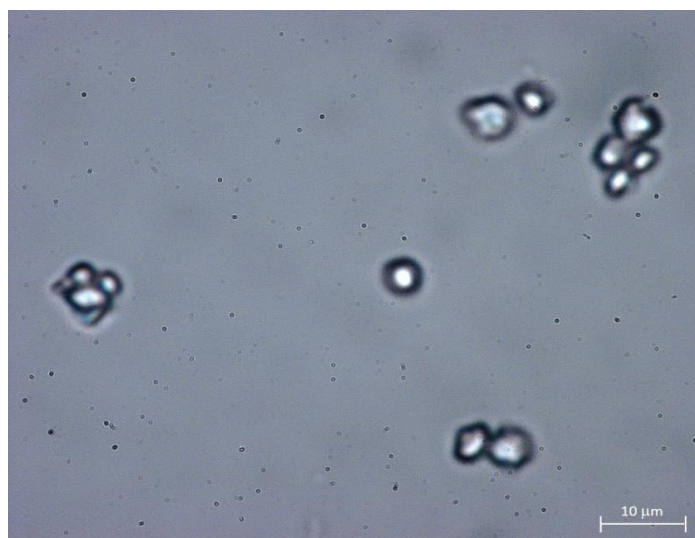


Figura 34: A+P após 30 minutos em meio tampão

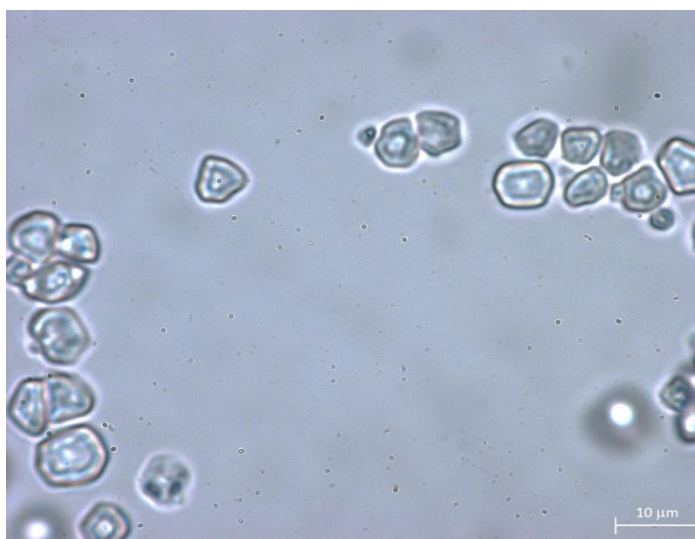


Figura 35: A+P+G após 30 minutos em meio tampão

Verifica-se que em todos os casos, quer em meio ácido, quer em meio neutro, as partículas se mantêm em suspensão, não ocorrendo solubilização total em nenhum dos casos. É possível observar também que as partículas de quitosano, sobretudo em meio neutro, tendem a formar agregados quando adicionadas ao meio de liberação e que estes se mantêm ao fim de 30 minutos. Já as partículas de amido no ensaio em meio ácido mantêm a sua estrutura original (aglomerados) ao fim de 30 minutos, no entanto, no ensaio em meio neutro há mais partículas soltas.

6. CONCLUSÕES

Neste trabalho efetuou-se o encapsulamento por “spray drying” de um extrato etanólico comercial de própolis em diferentes matrizes, designadamente: quitosano (Q+P), quitosano modificado por reação com ácido cítrico (Q+P+AC), quitosano reticulado com tripolifosfato (Q+P+TPF), amido de arroz (A+P) e amido de arroz com gelatina (A+P+G).

As partículas à base de quitosano consistem em cápsulas esféricas com uma parede de baixa espessura e uma superfície lisa, apresentando um diâmetro médio de cerca de 10 μm . As partículas à base de amido são esférulas compostas por agregados de grânulos de amido, sendo que as produzidas com gelatina apresentam um diâmetro médio inferior às produzidas sem gelatina (23,4 e 37,5 μm , respetivamente).

O carregamento das partículas produzidas, expresso em teor de fenólicos totais, foi idêntico para as várias matrizes estudadas, variando entre 4,9% m/m para as partículas Q+P e 6,2% m/m para A+P+G. Verificou-se um aumento da concentração de fenólicos face ao observado no extrato de própolis (2,3% m/m).

A atividade antioxidante do extrato de própolis foi superior à observada para as partículas com extrato encapsulado. Este fato indica o poder de proteção da matriz na medida em que limita a reação dos antioxidantes encapsulados com os radicais de DPPH e com o complexo Fe-TPTZ, reação essa que está na base dos métodos utilizados para a avaliação da atividade antioxidante.

Nos estudos de liberação dos compostos fenólicos encapsulados verificou-se uma velocidade de liberação mais elevada e uma maior quantidade de massa libertada em meio neutro (tampão fosfato, pH=7,3) que em meio ácido (ácido acético 1% m/m, pH=3,9). A massa total de compostos libertada em meio neutro foi perto de 100% para todos os tipos de partículas.

Apesar de a velocidade de liberação ser em geral menor em meio ácido, observou-se um aumento na seguinte ordem: Q+P+TPF < A+P+G < Q+P+AC < A+P < Q+P. As partículas que libertaram uma menor quantidade de massa de compostos encapsulada foram as Q+P+TPF (27%), seguindo-se as Q+P+AC (39%), A+P+G (46%), A+P (52%) e Q+P (100%).

Os diferentes perfis de liberação em meio ácido e neutro, observados para as partículas estudadas, permitem inferir que é possível desenhar partículas otimizadas, com um perfil de liberação específico, adequado a diferentes aplicações finais.

7. TRABALHO FUTURO

O presente trabalho pode ainda ser complementado com o estudo de alguns aspetos importantes.

Propõe-se então as seguintes análises:

Avaliar o limite de deteção sensorial de todos os tipos de partículas estudados, em soluções aquosas modelo e em sistemas reais, e relacionar a concentração de micropartículas correspondente ao limite de deteção sensorial com a sua atividade antioxidante e antimicrobiana.

Estudar outra matriz de encapsulamento em vez do amido uma vez que este ao ser consumido começa a ser digerido na boca podendo promover uma liberação do própolis e uma maior deteção sensorial do mesmo.

Efetuar uma caracterização química mais aprofundada das partículas produzidas, designadamente, a avaliação da distribuição dos compostos do própolis nas partículas, a análise das interações químicas entre os compostos e a matriz, a extensão da modificação química do quitosano pela ação do ácido cítrico e o grau de reticulação do quitosano com o tripolifosfato.

Avaliar de forma mais precisa as características físicas das partículas ao longo dos ensaios de liberação, de modo a perceber os mecanismos envolvidos na liberação, designadamente, a desintegração, degradação e “swelling” por absorção de solvente acompanhado por difusão.

Estudar a cinética de liberação recorrendo a modelos matemáticos referidos na literatura.

Referências bibliográficas

- Abd El-Hadi, F.K. e Hegazi, A.G. (2002). Egyptian propolis: 2. Chemical composition, antiviral and antimicrobial activities of East Nile Delta propolis. *Zeitschrift für Naturforschung*, 57c: 386–394;
- Aranaz, I., Mengíbar, M., Harris, R., Panos, I., Miralles, B., Acosta, N., Galed, G. e Heras, A. (2009). Functional characterization of chitin and chitosan. *Current Chemical Biology*, 3: 203-230;
- Azeredo, H.M.C. de (2005). Encapsulação: aplicação à tecnologia de alimentos. *Alimentos e nutrição Araraquara*: 89-97;
- Bankova, V., Christov, R., Stoev, G. e Popov, S. (1992). Determination of phenolics from propolis by capillary gas chromatography. *Journal of Chromatography*, 607: 150–153;
- Bankova, V., Popova, M., Bogdanov, S. e Sabatini, A. (2002). Chemical composition of European propolis: expected and unexpected results. *Zeitschrift für Naturforschung*, 57c: 530-533;
- Banskota, A.H., Tezuka, Y., Adnyana, I. K., Midorikawa, K., Matsushige, K., Message, D., Huertas, A.A.G. e Kadota, S. (2000). Cytotoxic, hepatoprotective and free radical scavenging effects of propolis from Brazil, Peru, the Netherlands and China. *Journal of Ethnopharmacology*, 72: 239–246;
- Beirão-da-Costa, S., Duarte, C., Moldão-Martins, M., Beirão-da-Costa, M.L. (2011). Physical characterization of rice starch spherical aggregates produced by spray-drying. *Journal of Food Engineering*, 104: 36-42;
- Beirão-da-Costa, S., Duarte, C., Bourbon, A. I., Pinheiro, A.C., Serra, A.T., Martins, M.M., Januário, M.I.N., Vicente, A.A., Delgadillo, I., Duarte, C. e Beirão-da-Costa, M. L. (2012). Effect of the matrix system in the delivery and in vitro bioactivity of microencapsulated Oregano essential oil. *Journal of Food Engineering*, 110: 190-199;
- Berger, J., Reist, M., Mayer, J.M., Felt, O., Peppas, N.A. e Gurny, R. (2004). Structure and interactions in covalently and ionically crosslinked chitosan hydrogels for biomedical applications. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 57(1): 19-34;
- Boonsongrit, Y., Mitrevej, A. e Muller, B.W. (2006). Chitosan drug binding by ionic interaction. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 62(3): 267-274;
- Brazel, C.S. (1999). Microencapsulation: offering solutions for the food industry. *Cereal Foods World*, 44(6): 388-393;
- Bruschi, M.L., Cardoso, M.L.C, Lucchesi, M.B., Gremião, M.P.D. (2003). Gelatin microparticles containing propolis obtained by spray-drying technique: preparation and characterization. *International Journal of Pharmaceutics*, 264: 45-55;

- Burdock, G.A. (1998). Review of the Biological Properties and Toxicity of Bee Propolis (Propolis). *Food and Chemical Toxicology*, 36: 347-363;
- Champagne, C.P. e Fustier, P. (2007). Microencapsulation for the improved delivery of bioactive compounds into foods. *Current Opinion in Biotechnology*, 18(2): 184-190;
- Chevolleau, S., Debal, A. e Ucciani, E. (1992) Détermination de l'activité antioxydante d'extraits végétaux. *Révue Française des CORPS GRAS*, 39^o année, n^o1/2: 3-8. Citado por Pereira, 2010;
- Clark, J.P. (2002). Food encapsulation: capturing one substance by another. *Food Technology*, 56(11): 63-65;
- Coppen, P.P. (1989). The use of antioxidants. *Rancidity in Foods*, Allen, J.C. e Hamilton, R.J. (Eds). 2^a Ed. Elsevier Applied Science, London. 83-104. Citado por Pereira, 2010
- Costa, M.A.P.R.N. (2012). Caracterização Química e Avaliação da Atividade Antioxidante da Farinha de Dreche. Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Engenharia Alimentar. Universidade Técnica de Lisboa. Instituto Superior de Agronomia;
- Cui, Z., Beach, E.S., Anastas, P.T. (2011) Modification of chitosan films with environmentally benign reagents for increased water resistance. *Green Chemistry Letters and Reviews*, 4(1): 35-40.
- de Roos, K.B. (2006). Understanding and controlling the behavior of aroma compounds in thermally processed foods. *Trends in Food Science & Technology*, 17: 236-243;
- de Vos, P., Faas, M.M., Spasojevic, M. e Sikkema, J. (2010). Encapsulation for preservation of functionality and targeted delivery of bioactive food components. *International Dairy Journal*, 20(4): 292-302;
- Desai, K. e Park, H. (2005). Recent developments in microencapsulation of food ingredients. *Drying Technology*, 23: 1361-1394;
- Desobry, S. e Debeaufort, F. (2011). Encapsulation of Flavors, Nutraceuticals and Antibacterials. *Edible coatings and Films to Improve Food Quality*. Boca Raton: 2^a Edição CRC Press Taylor and Francis Group. 333-372;
- Duarte, C.S.C. (2006). Encapsulamento de Aroma de Alho em Matriz de Amido. Utilização dos Encapsulados em Panificação. Relatório do Trabalho de Fim de Curso de Engenharia Alimentar. Universidade Técnica de Lisboa. Instituto Superior de Agronomia;
- Duarte, C.S.C. (2011). Extração e Encapsulamento de Compostos Bioativos do Bagaço de Azeitona. Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Engenharia Alimentar. Universidade Técnica de Lisboa. Instituto Superior de Agronomia;

- Estevinho, B.N., Rocha, F., Santos, L. e Alves, A. (2013). Microencapsulation with chitosan by spray drying for industry applications - A review. *Food Science & Technology*. 1-18;
- Fernandes, J.I.S. (2013). Produção de Partículas para Liberação Controlada de Fármacos. Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Engenharia Química e Bioquímica. Universidade Nova de Lisboa. Faculdade de Ciências e Tecnologia;
- Frankel, E.N. e Meyer, A.S. (2000). The problems of using one-dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80: 1925-1941;
- Freiberg, S. e Zhu, X.X. (2004). Polymer microspheres for controlled drug release. *International Journal of Pharmaceutics*, 282 (1-2): 1-18;
- Gharsallaoui, A., Roudaut, G., Chambin, O., Voilley, A. e Saurel, R. (2007). Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: an overview. *Food Research International*, 40(9): 1107-1121;
- Ghisalberti E.L. (1979) Propolis: a review. *Bee World*. 60: 59-84. Citado por Burdock,1998;
- Gonsales, G.Z., Orsi, R.O., Fernandez Junior, A., Rodrigues, P., e Funari, S.R.C. (2006). Antibacterial activity of propolis collected in different regions of Brazil. *Journal of Venomous Animals and Toxins*, 12(2): 276-284;
- Gosh, S. (2006). Functional coatings and microencapsulation: a general Perspective. In S. K. Gosh (Ed.). *Functional coatings*. 1-28;
- Gouin, S. (2004). Microencapsulation: industrial appraisal of existing technologies and trends. *Trends in Food Science & Technology*, 15(7-8): 330-347;
- Gupta, K.C. e Jabrail, F.H. (2006). Preparation and characterization of sodium hexameta phosphate cross-linked chitosan microspheres for controlled and sustained delivery of centchroman. *International Journal of Biological Macromolecules*, 38(3-5): 272-283;
- Halliwel, B. (2001) Free radicals and other reactive species in disease. *Nature Encyclopedia of Life Sciences*. Nature Publishing Group, London: 1-7;
- He, P., Davis, S.S. e Illum, L. (1999). Chitosan microspheres prepared by spray-drying. *Internacional Journal of Pharmaceutics*, 187, pp. 53-65;
- Kaliora, A.C. e Dedoussis, G.V. (2007). Natural antioxidant compounds in risk factors for CVD. *Pharmacological Research*, 56: 99-109;
- Kanatt, S.R., Chander, R. e Sharma, A. (2008). Chitosan glucose complex - a novel food preservative. *Food Chemistry*, 106(2): 521-528;

- Kumar, M.N.V.R. (2000). A review of chitin and chitosan applications. *Reactive and Functional Polymers*, 46: 1-27;
- Lahouel, M.B.S.S.N.F.J. (2004). Effet protecteur des flavonoides contre la toxicite de la vinblastine, du cyclophosphamide et du paracetamol par inhibition de la peroxydation lipidique et augmentation du glutathion hepatiche. *Pathologie Biologie*, 52: 314-322;
- Lorenzo-Lamosa, M.L., Remuñán-López, C., Vila-Jato, J.L. e Alonso, M.J. (1998). Design of microencapsulation chitosan microspheres for colonic drug delivery. *Journal of Controlled Release*, 52(1-2): 109-118;
- Liu, W., Wu, W.D., Selomulya, C. e Chen, X.D. (2011). Uniform Chitosan Microparticles Prepared by a Novel Spray-Drying Technique. *International Journal of Chemical Engineering*. 1-7;
- Lu, L-C., Chen, Y-W. e Chuo, C-C. (2005). Antibacterial activity of propolis against Staphylococcus aureus. *International Journal of Food Microbiology*, 102: 213-220;
- Marcucci M.C. (1995) Propolis: Chemical composition, biological properties and therapeutic activity. *Apidologie*. 26(2): 83-99;
- Marghitas, L.A., Mihai, C.M., Flore, C., Dezmiorean, D.S. e Fit, N. (2010). The Study of the Antimicrobial Activity of Transylvanian (Romanian) Propolis. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 38 (3). 40-44;
- Mohammadzadeh, S., Sharriatpanahi, M., Hamedi, M., Amanzadeh, Y., Ebrahimi, S.E.S. e Ostad, S.N. (2007). Antioxidant power of Iranian propolis extract. *Food Chemistry*, 103: 729–733;
- Moreira, L., Dias, L.G., Pereira, J.A. e Estevinho, L. (2008). Antioxidant properties, total phenols and pollen analysis. *Food and Chemical Toxicology*, 46: 3482-3485;
- Muli, E.M. e J.M. Maingi (2007). Antibacterial activity of Apis mellifera L. propolis collected in three regions of Kenya. *Journal of Venomous Animals and Toxins* 13(3): 655-663;
- Nori, M.P., Favaro-Trindade, C.S., Alencar, S.M.d., Thomazini, M., Balieiro, J.C.d.C, Castillo, C.J.C. (2011). Microencapsulation of propolis extract by complex coacervation. *Food Science and Technology*, 44(2), 429-435;
- Oliveira, B.F., Santana, M. e Ré, M. (2005). Spray-dried chitosan microspheres cross-linked with D, L-Glyceraldehyde as a potential drug delivery system: preparation and characterization. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 22(3): 353-360;
- Pegg, R.B. e Shahidi, F. (1999). Encapsulation and controlled release in food preservation. *Handbook of food preservation*. New York: Marcel Dekker, Cap. 21: 611-656;

Pereira, A.d.S., Seixas, F.R.M.S. e Neto, F.R.d.A. (2002). PRÓPOLIS: 100 ANOS DE PESQUISA E SUAS PERSPECTIVAS FUTURAS. *Química Nova*, 25 (2): 321-326;

Pereira, M.S. (2010). Estudo Comparativo de Métodos de Avaliação da Capacidade Antioxidante de Compostos Bioativos. Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Engenharia Alimentar. Universidade Técnica de Lisboa, Instituto Superior de Agronomia, Lisboa;

Pokorný, J., Yanishlieva, N. e Gordon, M. (2005). Antioxidants de los Alimentos. Aplicaciones prácticas. Editorial Acribia, S.A

Popeskovic, D., Kepcija, D., Dimitrijevic, M. e Stojanovic, N. (1980). The anti oxidative properties of propolis and some of its components. *Acta Veterinaria (Belgrade)*, 30: 133–136;

Pothakamury, U. e Barbosa-Cánovas, G.V. (1995). Fundamental aspects of controlled release in foods. *Trends in Food Science & Technology*, 6: 397-406;

Prior, R., Wu, X. e Schaich, K. (2005). Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53: 4290-4302;

Pu, J., Bankston, J.D. e Sathivel, S. (2011). Developing microencapsulated flaxseed oil containing shrimp (*Litopenaeus setiferus*) astaxanthin using a pilot scale spray dryer. *Biosystems Engineering*, 108(2): 121-132;

Rattes, A.L. e Oliveira, W. (2007). Spray drying conditions and encapsulating composition effects on formation and properties of sodium diclofenac microparticles. *Powder Technology*, 171(1): 7-14;

Rege, P.R., Garmise, R.J. e Block, L.H. (2003). Spray-dried chitosans. Part I: preparation and characterization. *International Journal of Pharmaceutics*, 252(1-2): 41-51;

Reineccius, G.A. (1988). Spray-drying of food flavor. In Risch, S.J., Reineccius, G.A. (eds). *Flavor encapsulation*. ACS Symposium Series 370. American Chemical Society, Washington, DC. 55-66;

Ribeiro, C.M.M. (2007). Encapsulamento de aromas alimentares. Estudo da Eficiência de Diferentes Matrizes e Tecnologias de Encapsulamento. Tese para obtenção do grau de Doutor em Engenharia Alimentar. Universidade Técnica de Lisboa. Instituto Superior de Agronomia;

Ribéreau-Gayon, P. (1970). Le dosage des composés phénoliques totaux dans le vins rouges. *Chim. Anal.* 52: 627- 631;

Rodriguez-Amaya, D. (2010). Quantitative analysis, in vitro assessment of bioavailability antioxidant activity of carotenoids - A review. *Journal of Food Composition and Analysis*, 23: 726-740;

Rufino, M.S.M., Alves, R.E., Brito, E.S., Morais, S.M., Sampaio, C.G., Pérez-Jiménez, J. e Saura-Calixto, F.D. (2006). Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pela Captura do Radical Livre DPPH. *Comunicado Técnico online* 125;

Rulkens, W.H. e Thijseen, H.A.C. (1967). Volatil organics retention in spray drying aqueous carbohydrate solutions. *Journal of Food Science and Technology*, 7: 95-105;

Sabatini, A. e Carpana, E. (2002). Apicultura, o sabor de uma historia. Os produtos da apicultura. Bragança: CoraNE;

Sales, B.A. (2012). Produção de Sucedâneos de Cereais de Pequeno-Almoço ricos em compostos bioativos a partir de subprodutos da indústria agro-alimentar. Tese para obtenção do grau de Doutor em Engenharia Alimentar. Universidade Técnica de Lisboa. Instituto Superior de Agronomia;

Sanguansri, L. e Augustin, M. A. (2010). Microencapsulation in functional food product development. In Smith, J. & Charter, E. (eds.). *Functional Food Product Development*. 3-19;

Santos, A.N. (2005). Obtenção de corante natural de beterraba por microencapsulação em secador de spray. Relatório de Fim de Curso de Engenharia Alimentar. Instituto Superior de Agronomia. Lisboa. 12 pp.;

Sashiwa, H., Kawasaki, N. e Nakayama, A. (2002). Chemical modification of chitosan. 14:1 Synthesis of water-soluble chitosan derivatives by simple acetylation. *Biomacromolecules*, 3(5): 1126-1128;

Schafroth, N., Arpagaus, C., Jadhav, U.Y., Makne, S. e Douroumis, D. (2011). Nano and microparticle engineering of water insoluble drugs using a novel Spray-Drying process. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 90: 8-15;

Sforcin, J.M. e Bankova, V. (2011). Propolis: Is there a potential for the development of new drugs?. *Journal of Ethnopharmacology*. 253-260;

Shu, X.Z. e Zhu, K.J. (2002a). The influence of multivalent phosphate structure on the properties of ionically cross-linked chitosan films for controlled drug release. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 54(2): 235-243;

Shu, X.Z. e Zhu, K.J. (2002b). Controlled drug release properties of ionically cross-linked chitosan beads: the influence of anion structure. *International Journal of Pharmaceutics*, 233(1-2): 217-225;

Silva, C.C.F.d. (2008). Análise química e atividades antioxidante e citotóxica de amostras de própolis de alecrim. Dissertação de Mestrado. Instituto de Biociências. São Paulo.

Silva, A.F.d. (2009). Própolis: Caracterização Físico-Química, Atividade Antimicrobiana e Antioxidante. Tese de Pós-Graduação em Tecnologia e Ciência dos Alimentos para obtenção do título de *Doctor Scientiae*. Universidade Federal de Viçosa, Brasil.

- Singh, D.K. e Ray, A.R. (1998). Carbohydrate Polymers. Characterization of grafted chitosan films. *Carbohydrate Polymers*, 36: 251-255;
- Sucupira, N.R., Silva, A.B.d., Pereira, G. e Costa, J.N.d. (2012). Métodos Para Determinação da Atividade Antioxidante de Frutos. *UNOPAR Científica Ciências Biológicas e da Saúde*, 14(4): 263-269;
- Tari, T.A., Annapure, U.S., Singhal, R.S., Kulkarni, P.R.(2003). Starch-based spherical aggregates: screening of small granule sized starches for entrapment of a model flavouring compound, vanillin. *Carbohydrate Polymers*, 53(1): 45-51
- Trindade M.A. e Grosso M.A. (2000). The stability of ascorbic acid microencapsulated in granules of rice starch and in gum arabic. *Journal of Microencapsulation*, 7(2): 69-176;
- Trusheva, B., Trunkova, D. e Bankova, V. (2007). Different extraction methods of biologically active components from propolis: a preliminary study. *Chemistry Central Journal*, 1(13): 1-4;
- Tuley, L. (1996). Update on controlled flavour release. *International food ingredients*, 3: 14-18;
- Varadachari, S. (2002). The science of creating a memorable flavor. *Cereal Foods World*, 47(3): 84-86;
- Vehring, R., Foss, W. e Lechuga-Ballesteros, D. (2007). Particle formation in spray drying. *Journal of Aerosol Science*, 38(7): 728-746;
- Vennat, B., Arvouet–Grand, A., Gross, D. e Pourrat, A. (1995). Qualitative and quantitative analysis of flavonoids and identification of phenolic acids from a propolis extract. *Journal de Pharmacie de Belgique*, 50: 438–444;
- Versic, R.J. (1988). Flavor encapsulation: an overview. Risch SJ, Reineccius GA (eds). *Flavor encapsulation*. ACS Symposium Series 370. American Chemical Society, Washington, DC. 1-6;
- Wang, L.-Y., Gu, Y.-H., Su, Z.-G. e Ma, G.-H. (2006). Preparation and improvement of release behavior of chitosan microspheres containing insulin. *International Journal of Pharmaceutics*, 311(1-2): 187-195;
- Zhang, H., Wu, S., Tao, Y., Zang, L. e Su, Z. (2010). Preparation and characterization of water-soluble chitosan nanoparticles as protein delivery system. *Journal of Nanomaterials*. 1-5;
- Zhao, J. e Whistler R. L. (1994). Spherical aggregates of starch granules as flavor carriers. *Food Technology*, 48(7): 104-105.