

Microencapsulação de Própolis em Matrizes de Polissacáridos e Estudos de Libertação Controlada

Diana Filipa Lopes Penim

Dissertação para a obtenção do Grau de Mestre em
Engenharia Alimentar

Orientador: Doutor Vitor Manuel Delgado Alves

Coorientadora: Doutora Maria Luísa Beirão da Costa

Júri:

Presidente: Doutora Margarida Moldão Martins, 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

É com grande consideração que agradeço a todos os que directa ou indirectamente, contribuíram e ajudaram na realização deste trabalho.

Ao professor Vitor Alves por toda a ajuda, apoio e esclarecimentos prestados durante a realização da tese de mestrado e pela disponibilidade e paciência que demonstrou ter.

À professora Maria Luísa Beirão da Costa que introduziu o tema da tese e que forneceu material de apoio introdutório à técnica de Spray-Drying.

À professora Margarida Moldão que deu sempre uma palavra de apoio e incentivo no decorrer da parte experimental do trabalho.

À minha família e amigos que me apoiaram durante a realização do trabalho, sem eles este trabalho não seria possível. A eles agradeço tudo que fizeram por mim.

Um agradecimento especial aos meus pais, à Laura, Joana, Liane e Margarida por nunca desistirem de mim, por não me deixarem desistir da tese e por me apoiarem nos momentos mais difíceis, mas também por estarem presentes durante os bons momentos.

Resumo

O própolis é uma resina elaborada pelas abelhas, que apresenta diversas propriedades bioactivas, sendo uma das mais importantes a sua actividade antioxidante. No presente trabalho procedeu-se à microencapsulação, *por spray drying*, de um extracto etanólico de própolis, utilizando goma-arábica, quitosano e inulina como materiais de revestimento. O extracto etanólico de própolis analisado apresentou uma quantidade de compostos fenólicos totais de cerca 44,3 mg EAG/ g. Relativamente à actividade antioxidante esta foi 0,191 M Trolox/ g de própolis e 0,251 M Trolox/ g de própolis através do método DPPH e FRAP, respectivamente. Os compostos encapsulados nas micropartículas continuaram a apresentar actividade antioxidante. As micropartículas obtidas são cápsulas, e apresentaram uma forma esférica com uma superfície lisa e o seu tamanho variou entre 5 e 25 μm . Em relação à libertação controlada dos compostos fenólicos, destaca-se a libertação por parte das micropartículas de goma-arábica ser menor em relação às outras matrizes em meio ácido, e ser maior em meio neutro. A velocidade de libertação de compostos fenólicos é elevada, no entanto em meio neutro há uma maior libertação do que em meio ácido.

Palavras-chave: Própolis, actividade antioxidante, spray-drying, goma-arábica, inulina, quitosano.

Abstract

Própolis is a resin produced by bees, which has several bioactive properties, the most important being its antioxidant activity. In the present work we proceeded to the microencapsulation, by spray drying, of a própolis ethanolic extract by using gum arabic, inulin and chitosan as a coating material. The ethanol extract analyzed própolis presented a quantity of phenolic compounds of about 44.3 mg GAE / g. In relation to the antioxidant activity that was 0.191 M Trolox / g of propolis and 0.251 M Trolox / g of propolis by DPPH method and FRAP, respectively. Compounds encapsulated in microparticles have continued to antioxidant activity. Microencapsulation of própolis in different matrices produced spherical microparticles having a smooth surface, their size varied between 5 and 25 micrometers. Regarding the controlled release of phenolic compounds, the release by gum arabic microparticles be smaller than the other matrices in acid media, and be higher in the neutral media. It was observed that the phenolic compounds release from the microparticles was low in both media, however in neutral medium, there it was a greater than in acidic medium.

Keywords: própolis, antioxidant activity, spray-drying, gum arabic, inulin, chitosan.

Extended Abstract

Própolis is a natural resin produced by bees, composed of several resinous and balsamic substance, sap flowers, bee saliva, pollen and wax. Because of these mixing elements, própolis has a complex chemical composition and various bioactive properties, one of them are the antioxidant activity.

Since a few years the food with antioxidant properties have become important due to its health benefit, so própolis also became an attractive product due to their bioactive properties. However, própolis is also negatively characterized by its intense flavor and odor, hence the need to hide and/or cancel these two proprieties.

The present study, aimed at encapsulate an ethanolic própolis extract of in different matrices of polysaccharides such as chitosan gum arabic and inulin and understand whether it was feasible to carry out this procedure based on the physicochemical properties of the product concerned. Another additional objective was to study the behavior of active compound, when microparticles were released in acidic and neutral media analogously to what may occur in the stomach and intestine.

It was quantified the antioxidant activity of the própolis ethanolic extract by DPPH and FRAP methods, and total phenolics by Folin-Ciocalteu method. The antioxidant activity was 0.191 M Trolox / g of propolis and 0.251 M Trolox / g of propolis, from DPPH and FRAP methods, respectively. To total phenolics content was 44,3 mg GAE / g of própolis.

After the encapsulation process by drying process, different microparticles were obtained: Gum arabica with própolis (G.A*); Chitosan with própolis (Q₁*); Chitosan with citric acid and própolis (Q₂*); Inulin with própolis (I*).

Microparticles were characterized in terms of shape and size. In general, microparticles containing própolis had a spherical shape and a smooth surface. Regarding the mean diameter, it ranged between this 5 and 25 µm. It was observed that the average size of the microparticles increased when própolis was encapsulated, regarding to empty particles.

This study also showed that the microparticles with própolis still presented antioxidant activity, depending the value on the encapsulating matrix. The degree of encapsulation of various microparticles containing própolis were G.A*=6.56 and 8.95, Q₁*=12.28 and 17.52, Q₂*=4.09 and 6.82, I*=18.66 and 35.55 mg GAE / g of particles by Folin – Ciocalteu method and direct method respectively. The antioxidant activity values obtained by DPPH method were 0.169, 0.232, 0.092 and 0.572 M Trolox/ g of particles, for the FRAP method the values were 0.036, 0.7, 0.187 and 0.896 M Trolox/ g of particles, for G.A*, Q₁*, Q₂* and I*, respectively.

Release studies were performed in acidic medium (pH = 1.2) and neutral medium (pH = 7.0). It was found that the release of bioactive compounds was low in both media, however there was a greater release in the neutral medium. The release by gum arabic microparticles be smaller than the other

matrices in acid media, and be higher in the neutral media. The different chemical composition of Gum arabica for other matrices should be the main factor for this behavior.

Índice

Agradecimentos	I
Resumo	II
Abstract	III
Extended Abstract	IV
Lista de Figuras	IX
Lista de Tabelas	X
Lista de Abreviaturas	XI
I. Introdução e Objectivos	1
II. Enquadramento Teórico	2
1. Própolis	2
1.1. Composição Química.....	2
1.2. Propriedades Farmacológicas	3
1.3. Produtos com Própolis	3
2. Actividade Antioxidante	4
2.1. Quantificação dos Compostos Fenólicos	4
2.1.1. Método de Folin-Ciocalteu.....	5
2.1.2. Método Directo	5
2.2. Determinação da Actividade Antioxidante	5
2.2.1. Método baseado na reacção com o radical de DPPH	5
2.2.2. Método baseado na oxidação do ferro - FRAP	6
3. Microencapsulação	7
3.1. Processo de Secagem por Atomização.....	7
3.1.1. Etapas do Processo	8
3.1.2. Processo de Microencapsulação.....	9
3.1.3. Vantagens e Desvantagens do Processo de Atomização	11
3.2. Tipos de Matrizes Encapsulantes	11
3.2.1. Goma-Arábica.....	12
3.2.2. Inulina	12

3.2.3. Quitosano	13
3.3. Estrutura das Micropartículas	14
4. Mecanismos de Libertação de Encapsulados.....	16
III. Desenvolvimentos Experimental	19
1. Quantificação dos Compostos Fenólicos e Determinação da Actividade Antioxidante	19
1.1. Preparação das Amostras.....	19
1.2. Quantificação dos Compostos Fenólicos.....	19
1.3. Determinação da Actividade Antioxidante	20
2. Microencapsulação do Extracto de Própolis	21
2.1. Preparação das Soluções	21
2.1.1. Solução de Goma-Arábica	21
2.1.2. Solução de Inulina	22
2.1.3. Solução de Quitosano	22
2.2. Condições do Processo de Secagem.....	23
3. Caracterização das Micropartículas	24
3.1. Morfologia das Micropartículas.....	24
3.2. Extracção dos Compostos Fenólicos das Micropartículas com Própolis.....	24
4. Libertação Controlada dos Encapsulados	25
IV. Resultados e Discussão	27
1. Determinação dos Compostos Fenólicos através do Método Folin-Ciocalteu	27
2. Actividade Antioxidante do Extracto de Própolis.....	27
2.1. Método DPPH	27
2.2. Método FRAP.....	28
3. Caracterização das Micropartículas	30
3.1. Morfologia das Micropartículas	30
3.1.1. Micropartículas à base de Goma-Arábica	30
3.1.2. Micropartículas à base de Quitosano	31
3.1.3. Micropartículas à base de Quitosano e Ácido Cítrico	32
3.1.4. Micropartículas à base de Inulina.....	33

3.2. Tamanho das Micropartículas	34
3.2.1. Micropartículas à base de Goma-Arábica	34
3.2.2. Micropartículas à base de Quitosano	35
3.2.3. Micropartículas à base de Quitosano e Ácido Cítrico	35
3.2.4. Micropartículas à base de Inulina	36
3.3. Grau de Encapsulamento	37
3.4. Actividade Antioxidante das Micropartículas	38
4. Liberação Controlada dos Encapsulados	39
6.1. Liberação em meio Ácido.....	39
6.2. Liberação em meio Neutro	41
V. Conclusões	43
VI. Trabalho Futuro	44
VII. Referências Bibliográficas	45
VIII. Anexos	51

Lista de Figuras

Figura 1. Exemplos de produtos formados por própolis. a) Própolis em bruto, b) Extracto de própolis, c) Gel para o rosto, d) Pasta dentífrica, e) Rebuçados.....	3
Figura 2. Spray Dryer, LabPlant SD-05.....	10
Figura 3. Spray Dryer.....	10
Figura 4. Exemplo de diferentes estruturas de micropartículas.....	15
Figura 5. Micropartículas G.A, ampliação: a) 200 x, b) 1000x. Micropartículas G.A*, ampliação: c) 200 x, d) 1000 x.....	30
Figura 6. Micropartículas Q ₁ , ampliação: a) 500 x, b) 1000 x. Micropartículas Q ₁ *, ampliação: c) 200 x, d) 1000 x.....	31
Figura 7. Micropartículas Q ₂ , ampliação: a) 500 x, b) 1000 x. Micropartículas Q ₂ *, ampliação: c) 500 x, d) 1000 x.....	32
Figura 8. Micropartículas I, ampliação: a) 200 x, b) 1000 x. Micropartículas I*, ampliação: c) 200 x, d) 1000 x.....	33
Figura 9. Microcápsula de Inulina com própolis, ampliação: 2,500 x.....	34
Figura 10. Distribuição de tamanhos, a) Micropartículas G.A, b) Micropartículas G.A*.....	34
Figura 11. Distribuição de tamanhos, a) Micropartículas Q ₁ , b) Micropartículas Q ₁ *.....	35
Figura 12. Distribuição de tamanhos, a) Micropartículas Q ₂ , b) Micropartículas Q ₂ *.....	35
Figura 13. Distribuição de tamanhos, a) Micropartículas I, b) Micropartículas I*.....	36
Figura 14. Libertação de compostos fenólicos das diversas micropartículas em meio ácido. G.A* - Goma-arábica + própolis; I* - Inulina + própolis; Q ₁ * - Quitosano + própolis; Q ₂ * - Quitosano + Ácido cítrico + própolis; Q ₃ * - Quitosano + própolis + tripolifosfato.....	39
Figura 15. Libertação controlada de compostos fenólicos das diversas micropartículas em meio neutro. G.A* - Goma-arábica + própolis; I* - Inulina + própolis; Q ₁ * - Quitosano + própolis; Q ₂ * - Quitosano + Ácido cítrico + própolis; Q ₃ * - Quitosano + própolis + tripolifosfato.....	41

Lista de Tabelas

Tabela 1. Vantagens e Desvantagens do Processo de Spray-Drying* ¹	11
Tabela 2. Condições utilizadas durante o processo de secagem por spray-drying.....	24
Tabela 3. Massa de micropartículas libertadas e volume de meio de libertação.....	26
Tabela 4. Valores de RSA e de TEAC obtidos através do método DPPH.....	27
Tabela 5. Valores de Actividade Antioxidante obtidos pelo método FRAP.....	29
Tabela 6. Grau de encapsulamento das diversas micropartículas.....	37
Tabela 7. Actividade Antioxidante das micropartículas através dos métodos DPPH e FRAP.....	38
Tabela 8. Determinação da libertação máxima de fenólicos e velocidade inicial das diferentes micropartículas contendo própolis em meio ácido	39
Tabela 9. Determinação da libertação máxima de fenólicos de e velocidade inicial das diferentes micropartículas contendo própolis em meio neutro.....	41

Lista de Abreviaturas

Abs	Absorvância
Ag	Ácido Gálico
DPPH	2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl
EAG	Equivalentes em Ácido Gálico
FRAP	<i>Ferric Reducing Antioxidant Power</i>
G.A	Micropartículas de goma-arábica
G.A*	Micropartículas de goma-arábica com própolis
I	Micropartículas de inulina
I*	Micropartículas de inulina com própolis
Q1	Micropartículas de quitosano
Q1*	Micropartículas de quitosano com própolis
Q2	Micropartículas de quitosano com ácido cítrico
Q2*	Micropartículas de quitosano com ácido cítrico e própolis
Q3	Micropartículas de quitosano com tripolifosfato
Q3*	Micropartículas de quitosano com tripolifosfato e própolis
RSA	<i>Radical Scavenging Activity</i>
SEM	<i>Scanning Electron Microscopy</i>
TEAC	<i>Trolox Equivalent Antioxidant Capacity</i>
TPTZ	2,4,6-triaryl-s-triazina

I. Introdução e Objectivos

De forma a melhorar a qualidade de vida e ajudar na longevidade de vida das pessoas, a comunidade científica tem vindo a estudar novas tecnologias e produtos capazes de responder a esses propósitos.

Dos vários compostos existentes nos frutos e vegetais, os antioxidantes são os que mais têm captado a atenção dos investigadores devido às suas propriedades físico-químicas além dos seus benefícios para a saúde. Estudos realizados comprovam que a ingestão de antioxidantes contribui para a diminuição do risco de doenças cardiovasculares e cancro, sendo também anti-inflamatório, e tendo ainda outras indicações terapêuticas.

Existem antioxidantes naturais tais como as vitaminas, os compostos fenólicos e os carotenóides, no entanto também existem antioxidantes sintéticos, tanto uns como outros são utilizados na indústria alimentar para retardar o processo de oxidação dos alimentos.

De entre os diversos alimentos e ou produtos que apresentam propriedades antioxidantes, o própolis é um dos produtos que tem vindo a ser foco de estudo. O própolis é uma resina natural, produzida pelas abelhas, apresenta uma complexa composição química o que lhe confere propriedades bioactivas, entre outras. Duas das características que tornam este produto sensorialmente desagradável são o seu aroma e odor intensos, havendo a necessidade de diminuir e/ou atenuar estes atributos.

A evolução da tecnologia, permitiu com o tempo desenvolver técnicas capazes de aprisionar substâncias e/ou compostos dentro de materiais de forma a obter-se microcápsulas. A técnica de microencapsulação permite a obtenção de microcápsulas que protegem o composto com propriedades bioactivas do meio ambiente envolvente.

Existem diversas técnicas de microencapsulação sendo a técnica de secagem por atomização uma das mais utilizadas devido ao seu custo e às várias vantagens do equipamento e da sua utilização.

O presente trabalho teve como objectivos encapsular extracto etanólico de própolis em matrizes de polissacáridos como o quitosano a goma-arábica e a inulina; compreender a viabilidade de realizar este procedimento tendo por base as propriedades físico-químicas do produto em causa; analisar as microcápsulas quanto à sua forma e tamanho; avaliar a actividade antioxidante e a quantidade de compostos fenólicos, após a microencapsulação do própolis nas diferentes matrizes e por fim o estudo do perfil de libertação dos compostos encapsulados, quando as diferentes matrizes contendo própolis eram colocadas em meio ácido e meio neutro de forma análoga ao que pode ocorrer no estômago e no intestino.

II. Enquadramento Teórico

1. Própolis

A palavra Própolis tem origem etimológica greco-latina, onde *pró* tem o sentido de em defesa de e *polis* significa cidade, sendo uma substância utilizada pelas abelhas para cobrir, consolidar e calafetar as fendas e paredes irregulares da colmeia (Matsuno, 1997).

O própolis é uma substância resinosa, recolhida pelas abelhas de brotos e exsudados resinosos de algumas plantas (pinheiros, asbestos, álamos, bétalas, carvalhos, laranjais, castanheiros, faias, ulmeiros, chorões, eucaliptos e outras espécies) (Matsuno, 1997; Barbarić *et al.*, 2011). A sua cor é predominantemente castanho-escuro, mas pode variar até amarelo claro (Burdock, 1998). As suas propriedades mecânicas dependem da temperatura, apresentando um comportamento viscoelástico a temperaturas elevadas (acima de 30 °C), sendo rígido e quebradiço a baixas temperaturas (abaixo de 15 °C) (Matsuno, 1997).

Existem duas teorias que tentam explicar a origem do própolis. Uma tem por base de que o produto é elaborado por abelhas com mais de 15 dias de vida e que resulta da recolha de substâncias balsâmicas e resinosas existentes nos ramos e troncos de árvores. A outra teoria defende que o própolis é um produto que resulta da digestão dos grãos de pólen que as abelhas recolhem das flores (Matsuno, 1997).

1.1. Composição Química

O própolis é constituído por diversos componentes, designadamente substâncias resinosas e balsâmicas, outros provenientes da seiva das flores, da saliva da abelha, do pólen e da cera (Matsuno, 1997).

A sua composição química é complexa e variável, dependendo da origem das espécies botânicas e da sua colheita, da quantidade de pólen e ceras presentes e da quantidade de secreções da abelha utilizada no seu processo de transformação (Matsuno, 1997; Barbarić *et al.*, 2011). No entanto é referido que o própolis é constituído por 50% de substâncias resinosas e balsâmicas, 25 a 35% de ceras, 10% de óleos essenciais, 5% de grãos de pólen e 5% de outras substâncias orgânicas e minerais (Matsuno, 1997).

Dos estudos realizados ao própolis, foram identificados mais de 180 compostos principalmente polifenóis, destes a maior parte são flavonóides (pinostrobin, quercetina, pinobanquesina), aos quais estão associados ácidos fenólicos (ácidos benzóico, gálico, ferúlico e cafeico), vitaminas (vitamina C e E, pró-vitamina A e vitaminas do grupo B), ácidos gordos não saturados, compostos terpénicos e

minerais (cálcio, potássio, sódio, manganês, ferro, alumínio, fósforo, silício, vanádio e estrôncio) (Matsuno, 1997; Barbarić *et al.*, 2011).

O própolis é ainda constituído por 29 tipos de substâncias voláteis o que confere odores característicos e um grande complexo de fragrâncias ao seu perfil de aroma (Branco, 2001).

1.2. Propriedades Farmacológicas

Historicamente o própolis era utilizado na medicina para tratar diversas doenças. Devido aos diversos compostos presentes no própolis, este era utilizado como fármaco para ajudar no tratamento de doenças como a tuberculose renal, profilaxia de lesões no colo do útero, colite subaguda e na colite crónica, hipertensão, inflamações vaginais e do colo do útero, otorrinolaringologia, bronquite não específica, pneumonia e tuberculose, laringite e rinofaringite crónica, rinite crónica, tiróide (bócio), a doença de Leiner-Moussous, doenças dermatológicas (tricofítia e sicosose, hiperqueratose e epidermofitose, queimaduras e queda do cabelo) (Matsuno, 1997; Branco, 2001).

Com os avanços tecnológicos e estudos realizados ao própolis foi possível constatar que este apresenta uma elevada concentração de flavonóides, o que lhe atribuí poder antioxidante, anti-inflamatório, antibacteriano e anticancerígeno (Mohammadzadeh *et al.*, 2007; Barbarić *et al.*, 2011).

1.3. Produtos com Própolis

O própolis pode apresentar-se em bruto em extracto ou em solução aquosa ou etanólica. No entanto existem muitos outros produtos que apresentam própolis na sua composição, por exemplo *sprays*, pomadas, cremes, rebuçados, pastilhas elásticas, shampoos, gel de banho e sabonetes. Na figura 1 estão representados alguns exemplos de produtos onde o própolis se encontra presente (Matsuno, 1997; Branco, 2001).



Figura 1. Exemplos de produtos formados por própolis. a) Própolis em bruto, b) Extracto de própolis, c) Gel para o rosto, d) Pasta dentífrica, e) Rebuçados

2. Actividade Antioxidante

Halliwell e Guttridge (1995) definiram um antioxidante como "qualquer substância que, quando presente em baixas concentrações, em comparação com as de um substrato oxidável, diminui significativamente ou evita a oxidação do referido substrato." (Benzie e Strain., 1999).

Durante o processo metabólico são produzidas espécies reactivas de oxigénio (ROS), tais como o radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), o radical hidroxilo (OH^{\cdot}) e o radical peróxilo (ROO^{\cdot}). Os mesmos são responsáveis pela oxidação de lípidos, proteínas e ácidos nucleicos, podendo levar ao aparecimento de doenças crónicas, doenças coronárias, arteriosclerose, cancro, entre outras (Wong *et al.*, 2006). A forma de evitar/atenuar o efeito destes radicais é consumindo alimentos ricos em antioxidantes. De um modo geral, os antioxidantes têm a capacidade de doar um átomo de hidrogénio ou um electrão e de desemparelhar electrões devido à sua estrutura aromática. Assim, os antioxidantes são capazes de proteger as moléculas biológicas das oxidações, sendo importante estudar e avaliar a sua actividade (Fernandez-Panchos *et al.*, 2008).

Existem diversas técnicas para avaliar o potencial antioxidante de uma substância. A partir da definição TEAC (*Trolox Equivalent Antioxidant Capacity*) é possível determinar a actividade antioxidante de uma substância utilizando o reagente Trolox como padrão.

Existem diversos métodos que utilizam o trolox como padrão. No presente trabalho abordou-se a quantificação dos compostos fenólicos através do método de Folin-Ciocalteu e do método directo e a avaliação da actividade antioxidante através do método baseado na captação de radicais (DPPH) e do método de oxidação do ferro (FRAP).

2.1. Quantificação dos Compostos Fenólicos Totais

2.1.1. Método de Folin-Ciocalteu

Os compostos fenólicos são um grupo de antioxidantes muito importantes e específico, são formados por um grupo hidroxilo ligado a um grupo hidrocarboneto aromático. Com base no número de unidades de fenol existente, os compostos fenólicos podem ser classificados como fenóis simples ou polifenóis.

Um dos métodos mais utilizados para quantificar os compostos fenólicos é o método de Folin-Ciocalteu. Este método resulta da adaptação do método de Folin-Denis, no qual se adicionou sulfato de lítio, para evitar precipitações, tornando este método mais sensível a compostos fenólicos (Hemingway *et al.*, 1992; Zhang *et al* 2006).

No método de Folin-Ciocalteu, o reagente de Folin formado por heteropoliácidos e por ácidos fosfomolibdúico (MoO_4^{2-}) e fosfotungstúico (WO_4^{2-}), quando em meio de reacção alcalino os ácidos

fosfomolibdico (MoO_4^{2-}) e fosfotungstico (WO_4^{2-}) reduzem, formando-se o azul molibdénio e o azul tungsténio, por outro lado ocorre a oxidação dos compostos fenólicos (Hemingway *et al.*, 1992; Ikawa *et al.*, 2003).

Após a reacção obtém-se uma solução de cor azul que pode ser monitorizada através de espectrofotometria. A concentração de compostos fenólicos é proporcional à intensidade de luz absorvida a um comprimento de onda de 760 nm, onde outras espécies biológicas não o são. Os valores de absorvância normalmente são comparados com uma curva padrão formada por ácido gálico. O teor de fenólicos totais é expresso geralmente em equivalentes de ácido gálico por grama ou por litro (Schwannecke, 2009). Contudo, os compostos presentes neste método não reagem apenas com compostos fenólicos, podendo a presença de agentes redutores interferir na análise dos compostos e no resultado obtido (Hemingway *et al.*, 1992).

2.1.2. Método Directo

O método directo baseia-se, na medição directa da absorvância através de espectrofotometria. Não havendo necessidade de fazer reagir a amostra com outros reagentes.

Este método também conhecido de espectrofotometria UV/Visível permite quantificar/medir o processo de biodegradação através do rácio da absorvância (Santos *et al.*, 2014).

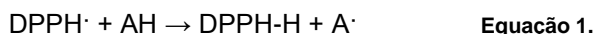
Por norma, é um método bastante utilizado para a detecção de nitritos e nitratos utilizando um comprimento de onda entre 200-230 nm, no entanto, é possível utilizar outros comprimentos de onda para a detecção de outros compostos (Nollet, 2000).

Este é um método rápido e de baixo custo, no entanto é um método sensível e que pode induzir erros. Estes erros podem dever-se à existência de interferentes presentes em solução e devido à presença de compostos que absorvam radiação num mesmo comprimento de onda que o composto a ser analisado (Bart, 2006).

2.2. Determinação da Actividade Antioxidante

2.2.1. Método baseado na reacção com o radical de DPPH

Este método consiste em fazer reagir o radical DPPH (2,2- Difenil-1-picrilhidrazilo) com uma solução que contenha um antioxidante ou um radical livre. No caso de o DPPH reagir com um antioxidante ocorre a cedência do átomo de hidrogénio por parte do antioxidante para o DPPH, por outro lado, se o DPPH reagir com um radical livre haverá a cedência do electrão do radical para o DPPH. Nas equações 1 e 2 é possível observar a redução do DPPH com um antioxidante e com um radical livre, respectivamente (Brand-Williams *et al.*, 1995; Milardović *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2007).



Durante a reacção o radical DPPH reduz-se, aumentando assim a quantidade de DPPH não disponível, este aumento é proporcional à diminuição da absorvância a um comprimento de onda entre os 515-517 nm. A diminuição da absorvância é facilmente visível devido à mudança de cor da substância. Inicialmente quando há muito DPPH livre a solução apresenta uma cor violeta escura e à medida que a reacção vai ocorrendo o violeta vai tornando-se cada vez menos intenso. Quando todo o DPPH reage a solução passa a ter uma cor amarelo pálido (Brand-Williams *et al.*, 1995; Milardović *et al.*, 2006).

2.2.2. Método baseado na oxidação do ferro - FRAP

Existem antioxidantes, não-enzimáticos, que são espécies redutoras e têm a capacidade de inactivar oxidantes através de reacções redox onde a espécie reactiva é reduzida devido à oxidação do antioxidante. Neste caso o poder redutor é o mesmo que o poder antioxidante. Uma forma de avaliar o poder redutor é através de um método colorimétrico utilizando um oxidante em excesso estequiométrico, que seja facilmente reduzível. No entanto o método mais utilizado é o poder oxidante/redutor do ferro (FRAP), onde os antioxidantes são utilizados como redutores no método colorimétrico (Benzie e Strain, 1996).

Quando o complexo tripyridyltriazine férrico (Fe^{III} -TPTZ) é colocado num meio reaccional de pH baixo, o complexo reduz-se para a sua forma ferrosa (Fe^{II}). Assim, um meio reaccional cujo potencial redox seja mais baixo do que o meio de reacção férrico/ferroso, ocorrerá a conversão do complexo férrico (Fe^{III}) em ferroso (Fe^{II}).

A solução formada apresenta uma tonalidade azul escura e a leitura da sua absorvância pode ser realizada através de espectrofotometria a um comprimento de onda de 593 nm. A variação da absorvância está directamente relacionada com o potencial de redução, no qual os electrões são doados aos antioxidantes presentes na reacção (Benzie e Strain, 1996, 1999).

3. Microencapsulação

A microencapsulação é um processo no qual um composto, com características específicas, designado por *core* é revestido por um material de revestimento, que forma uma barreira, *wall*, sob a forma de pequenas partículas (Gharsallaoui *et al.*, 2007).

Este processo promove uma barreira físico-química entre o *core* e o ambiente externo protegendo assim o material *core*. Por outro lado, torna-se possível, promover uma liberação controlada do composto encapsulado, mascarar o sabor e/ou *flavour* do material encapsulado e ainda diluir pequeníssimas quantidades de material encapsulado. Por estas razões a indústria alimentar e farmacêutica recorrem cada vez mais ao processo de microencapsulação (Shahidi *et al.*, 1993; Gharsallaoui *et al.*, 2007).

Existem diversas técnicas de microencapsulação tais como, *spray-drying*, *spray-cooling*, *spray-chilling*, extrusão, liofilização, coacervação, co-cristalização, aprisionamento em lipossomas, polimerização interfacial, inclusão molecular entre outros (Gharsallaoui *et al.*, 2007; Jyothi *et al.*, 2010).

Neste trabalho a técnica utilizada para encapsular o própolis foi o processo de secagem por atomização.

3.1. Processo de Secagem por Atomização

A técnica de secagem por atomização também conhecida por *spray-drying* surgiu em 1930, sendo utilizada para encapsular *flavours* utilizando a goma-arábica como material de revestimento. Esta é uma das técnicas mais comuns utilizadas para encapsular produtos para alimentos devido ao seu baixo custo e disponibilidade do equipamento (Shahidi *et al.*, 1993).

De um modo geral o processo de *spray-drying* consiste numa operação unitária na qual um produto líquido é atomizado numa corrente de gás quente, obtendo-se seguidamente as micropartículas por secagem das gotas. A alimentação líquida inicial é por norma uma solução, emulsão ou suspensão. Os gases mais utilizados são o ar ou um gás inerte (azoto).

Esta técnica permite obter um produto com propriedades físico-químicas específicas, diminuir o teor de água e a sua actividade assegurando assim a estabilidade microbiológica do produto diminuindo o risco de degradação química e biológica e por fim diminuir os custos de armazenamento e de transporte (Gharsallaoui *et al.*, 2007).

3.1.1. Etapas do Processo

O processo de *spray-drying* é constituído por quatro etapas, a atomização, o contacto das partículas com o ar quente, a evaporação da água das partículas e por fim, a separação do produto seco e do ar húmido.

A atomização do líquido é realizada através de pressão ou de energia centrífuga, para isso é necessário um atomizador, um dispositivo capaz de produzir uma fina pulverização de um líquido. Existem diversos tipos de atomizadores, sendo a escolha deste influenciada pela composição e a viscosidade do líquido de alimentação e as características desejadas no produto final (Masters, 1997).

A etapa seguinte consiste no contacto das partículas com o ar quente e inicia-se durante a atomização. Este contacto pode ser realizado em co-corrente ou contracorrente. No processo em co-corrente o líquido é atomizado na mesma direcção em que o ar quente passa, normalmente a uma temperatura que varia entre os 150 a 200 °C. A evaporação da água é instantânea e as partículas obtidas são de seguida expostas a temperaturas de 50 a 80 °C, não havendo assim degradações térmicas substanciais. No processo em contra corrente, o líquido de alimentação é atomizado na direcção oposta à direcção do ar quente, o que leva a que o produto seco esteja mais tempo exposto a altas temperaturas, obtendo-se um produto final mais termo sensível, a vantagem deste processo é o facto de ser mais económico em termos de consumo de energia. (Fleming, 1921).

Durante a evaporação da água, produz-se um gradiente de temperatura e de pressão parcial de água entre a fase líquida e a fase gasosa. A transferência de calor ocorre no sentido do ar quente para o produto, por outro lado a diferença de temperatura e de pressão de vapor leva a que a água seja transferida no sentido contrário (Gharsallaoui *et al.*, 2007).

O ar quente ao contactar com as partículas líquidas promove o aumento da temperatura até um valor constante no interior dessas mesmas partículas. De seguida ocorre a evaporação das gotículas de água a uma temperatura e a uma pressão parcial de vapor de água constantes. A taxa de difusão da água desde o núcleo até à superfície é normalmente constante e igual à taxa de evaporação superficial. Por fim forma-se um revestimento na superfície da partícula, pois o teor de água na partícula atinge o valor crítico, a velocidade de secagem diminui à medida que se vai formando o revestimento e a difusão da água também diminui. Termina o processo de secagem e a temperatura das partículas torna-se igual à temperatura do ar.

As várias etapas deste do processo de secagem podem apresentar diferentes tempos de duração, conforme as características iniciais do produto e a temperatura do ar de entrada. Assim se a temperatura do ar de entrada for elevada forma-se mais rapidamente a massa seca (revestimento) devido à elevada taxa de evaporação de água pois a superfície da partícula líquida é superior ao volume (Gharsallaoui *et al.*, 2007).

A última etapa do processo de *spray-drying* é designada de separação do ar húmido do produto seco e tem lugar no interior de um ciclone. O *spray-drying* pode ser equipado ainda com dois filtros com o objectivo de remover as micropartículas, não recolhidas no ciclone antes de libertar o ar de secagem para a atmosfera. A forma final das partículas depende da composição inicial do líquido de alimentação, do teor de água e do gás presente nas partículas (Gharsallaoui *et al.*, 2007, Fang *et al.*, 2012).

3.1.2. Processo de Microencapsulação

O processo de microencapsulação é formado pelas etapas de preparação da solução, dispersão ou emulsão, contendo os componentes a encapsular e o material de revestimentos, a atomização do líquido de alimentação dentro da câmara de secagem e a desidratação das gotas. (Shahidi *et al.*, 1993).

No que diz respeito à etapa de preparação da amostra a encapsular, se o material a encapsular, for de natureza hidrofóbica, este é disperso numa solução que contém o material de revestimento, formando-se uma emulsão. Pode ser necessário adicionar um emulsionante conforme as propriedades do material de revestimento pois este pode ter actividade interfacial. É de referir que as propriedades físicas e químicas da emulsão formada vão interferir no processo de microencapsulação. A emulsão formada deve ser estável durante um determinado período de tempo, as gotas de óleo devem ser pequenas e a viscosidade baixa de forma a não haver inclusão de ar nas partículas formadas, por outro lado a viscosidade não deve ser elevada para não ocorrer o alongamento e aumento do tamanho das partículas (Gharsallaoui *et al.*, 2007). Por outro lado, o material do revestimento ou do *core* pode apresentar-se em suspensão na solução aquosa. Quando ambos os materiais são solúveis no meio aquoso, temos uma solução.

As etapas de atomização e de desidratação das partículas ocorrem simultaneamente. A fonte de alimentação é atomizada através de um fluxo de ar quente fornecido à câmara de secagem, ocorrendo de seguida a evaporação da água, formando-se assim as micropartículas (Gharsallaoui *et al.*, 2007). O tempo de exposição das partículas ao ar quente é curto havendo uma evaporação rápida da água mantendo assim a temperatura do núcleo abaixo de 40°C (Fang e Bhandari 2012).

As condições de funcionamento são importantes para uma boa eficiência de microencapsulação, para isso é necessário otimizar e controlar, a temperatura de alimentação, temperatura do ar de entrada, a concentração de sólidos da alimentação e a razão entre a concentração do *core* e do material de revestimento (Liu *et al.*, 2004).

A temperatura de alimentação diminui a viscosidade da solução, dispersão ou emulsão, o que altera a capacidade de aspersão do atomizador podendo esta não ser de forma homogénea. A elevada temperatura de alimentação promove a diminuição da sua viscosidade e do tamanho das partículas,

no entanto, pode levar à volatilização e à degradação de compostos termo sensíveis (Gharsallaoui *et al.*, 2007).

Em relação à temperatura do ar à entrada, quanto esta é baixa, a taxa de evaporação é lenta havendo a formação de micropartículas com uma membrana superficial com elevada densidade, um elevado teor de água e com facilidade em aglomerar. Por outro lado se a temperatura de entrada for elevada a evaporação pode ser excessiva o que pode levar à formação de uma membrana quebradiça e a uma libertação ou exposição prematura do composto encapsulado.

A temperatura do ar de saída depende das características do material de secagem sendo difícil prever qual o valor com antecedência. Esta temperatura não pode ser controlada directamente pois depende da temperatura do ar de entrada, no entanto a temperatura ideal do ar de saída deve ser na ordem dos 50 a 80 °C (Liu *et al.*, 2004, Gharsallaoui *et al.*, 2007).

Assim para obter as melhores condições de secagem é necessário conciliar uma elevada temperatura do ar com uma elevada concentração de sólidos na alimentação a uma aspersão e secagem fáceis, para obter um produto final cujas micropartículas não estejam expandidas nem com rupturas (Fang e Bhandari 2012).



Figura 2. *Spray-dryer*, Lab Plant SD-05
Spray-Dryer

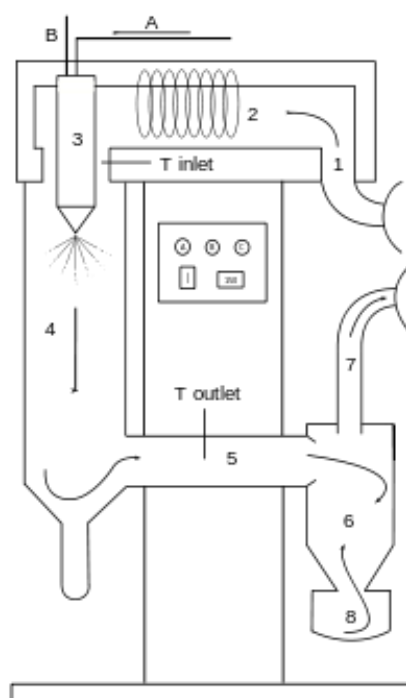


Figura 3. *Spray-dryer* (adaptado de Wikipedia)

A – Líquido de alimentação, B – Gás de atomização, 1 – Entrada do gás de secagem, 2 – Aquecimento do gás de secagem, 3 – Pulverização do líquido de alimentação, 4 – Câmara de secagem, 5 – Parte entre a câmara de secagem e ciclone, 6 - Ciclone, 7 – Saída do gás de secagem, 8 – Colector do produto seco

3.1.3. Vantagens e Desvantagens do Processo de Atomização

Como qualquer processo, o spray-drying tem também vantagens e desvantagens. Na tabela 1 encontram-se descritas algumas vantagens e desvantagens, descritas na literatura.

Tabela 1. Vantagens e Desvantagens do Processo de Atomização*¹

Vantagens	Desvantagens
<ul style="list-style-type: none"> • Processo contínuo e rápido, • Possibilidade de controlar as propriedades físicas do produto final • Controlo automático, • Qualidade do produto constante mesmo em larga escala • Processo versátil, • Partículas obtidas podem ter uma determinada distribuição de tamanho • Processo com um baixo custo, mas de elevada qualidade e estabilidade • Produção de microcápsulas solúveis e de pequeno tamanho. 	<ul style="list-style-type: none"> • As microcápsulas podem não ser uniformes • Limitação do material de revestimento (baixa viscosidade mas com elevada concentração de sólidos) • Produto final muito fino que possa necessitar de processamento posterior • Não é o melhor método para material sensível ao calor.*²

*¹ Autores: (Parikh, 1997; Heldman *et al.*, 1997; Madene, *et al.*, 2006; Chen *et al.*, 2008).

*² É de referir que para alguns autores este método pode ser utilizado em material sensível ao calor, pois o tempo que estão sujeito a altas temperaturas é relativamente curto.

3.2. Tipos de Matrizes Encapsulantes

O revestimento das partículas tem como objectivo proteger o material encapsulado do meio exterior. Dependendo das características finais que se pretende no produto final, é necessário escolher o material de revestimento. Esta escolha tem por base as propriedades físico-químicas desse material tais como a solubilidade, o peso molecular, a temperatura de transição vítrea, a capacidade de formação de película, as propriedades emulsionantes, entre outras. Deste modo a escolha do material de revestimento é importante para a eficiência da encapsulação e para as propriedades e estabilidade das micropartículas (Shahidi *et al.*, 1993; Gharsallaoui *et al.*, 2007).

Existem diversos materiais de revestimento já utilizados no processo de microencapsulação. Por norma, polissacáridos e proteínas são os compostos mais utilizados (Rosenberg e Sheu, 1996; Dalgleish, 2006). No presente trabalho apenas utilizou-se a goma-arábica, o quitosano e a inulina.

3.2.1. Goma-arábica

A goma-arábica é um polissacárido natural, produzido e extraído de duas espécies de Acácia a *Acacia senegal* e a *Acacia seyal*. A sua cor varia do branco-pálido ao laranja-acastanhado, é um produto comercializado sob a forma de pó (micropartículas), flocos, grânulos e em *spray*. É uma substância solúvel em água mas insolúvel em etanol. Em termos práticos é utilizada como emulsionante e espessante (Phillips *et al.*, 2008).

Quimicamente a goma-arábica é constituída por uma mistura complexa de polissacáridos e glicoproteínas. É formada por uma cadeia principal de ligações β -(1,3) galactose da qual derivam cadeias laterais nas ligações (1,6) constituídas por arabinose, ramnose e ácido glucurónico. Esta goma contém ainda uma pequena porção de material proteico (cerca de 2%) (Randall *et al.*, 1988; Osman *et al.*, 1993).

Devido à propriedade de produzir filmes e de ser um bom emulsionante, a goma-arábica é utilizada nos processos de encapsulação tanto de aromas e *flavours* como de compostos voláteis. A pequena fracção proteica presente na goma-arábica permite originar uma melhor emulsão num sistema óleo em água (O/W), se neste caso, estiver presente o composto a encapsular, quando esta mistura é aspergida através do *spray-dryer*, a água é removida rapidamente e o composto a encapsular não permanece exposto a elevadas temperaturas durante um período de tempo elevado (Stephen *et al.*, 2006).

Segundo a literatura, alguns aromas alimentares já foram encapsulados através de *spray-drying* como por exemplo, óleo de orégãos, óleo de menta, óleo de laranja e de outros compostos bioactivos capazes de enriquecer os produtos onde são aplicados (Ribeiro, 2007; Jun-xia *et al.*, 2011; Sarkar *et al.*, 2013)

3.2.2. Inulina

A inulina é um polissacárido, de reserva de muitas plantas. Este composto encontra-se em diversos vegetais, frutos e cereais, fazendo parte da alimentação diária. Na europa e em outros países a inulina é classificada como uma fibra dietética.

Existem diversas fontes de produção de inulina além das plantas, a inulina pode ser encontrada em bactérias de diferentes espécies. Industrialmente a chicória é a planta mais utilizada para a produção de inulina (Stephen *et al.*, 2006).

Em termos químicos a inulina é um polissacárido formado por polímeros de frutose ligados por ligações β -(1,2) frutossil-frutose, havendo alguns casos onde possa existir porções de glucose. Esta é caracterizada como um pó branco, inodoro, o seu sabor é ligeiramente adocicado (10 % de doçura em comparação com a sacarose). A inulina é solúvel em água quente e a solução obtida é de baixa viscosidade.

A inulina é uma fibra dietética solúvel, não digerível e com baixo valor calórico (5 KJ/g) sendo adequada para diabéticos. Promove o crescimento de bactérias benéficas da flora intestinal tendo assim um efeito prebiótico, é capaz também de aumentar a bio-disponibilidade de minerais como o cálcio e o magnésio. Além destas vantagens o consumo de inulina permite a redução de triglicéridos, a redução do risco de cancro no cólon e a protecção contra alterações intestinais e infecções (Stephen *et al.*, 2006).

Na indústria alimentar, a inulina é utilizada para substituir a gordura, para dar corpo e paladar aos alimentos e melhorar a textura, é utilizada também para a estabilização de espumas e de emulsões, e trabalha em sinergia com agentes de gelificação (Stephen *et al.*, 2006). Beirão-da-Costa *et al.* (2013) também utilizou a inulina para microencapsular óleo essencial de orégãos. Existem ainda outros estudos num dos quais é microencapsulado óleo essencial de alecrim e noutro estudo realizou-se a microencapsulação de bifidobactérias (Fritzen-Freire *et al.*, 2012; Fernandes *et al.*, 2014)

3.2.3. Quitosano

O quitosano é um polissacárido catiónico, obtido através de desacetilação alcalina do polímero quitina. A quitina é também um polissacárido estrutural que está presente em animais (crustáceos, insectos) e em paredes celulares de determinados fungos e algas (Stephen *et al.*, 2006; Estevinho, *et al.*, 2013).

A molécula de quitosano é um co-polímero de N-acetil-D-glucosamina e D-glucosamina, no entanto esta molécula pode deferir quanto ao seu grau de N-acetilação (40-98%) e na sua massa molecular (50-2000 kDa) (Ravi Kumar, 2000; Estevinho, *et al.*, 2013).

O processo de transformação da quitina em quitosano é simples. Para isso é aplicado um tratamento alcalino (NaOH) à quitina, que remove simultaneamente a proteína e o grupo acetil, ficando o quitosano apenas com um grupo amina. No entanto a remoção dos grupos acetil não é completa, logo as moléculas podem diferir em termos de grau de N-acetilação (Ravi Kumar, 2000; Estevinho, *et al.*, 2013). Assim o grau de acetilação da quitina é cerca 90% isto porque prevalecem todos os grupos acetil, por outro lado como o quitosano sofre desacetilação tem um grau de acetilação menor que pode ser cerca de 35% ou menos (Ravi Kumar, 2000).

O quitosano é utilizado na indústria alimentar e farmacêutica, principalmente para a produção de micropartículas devido a varias propriedades tais como a sua biocompatibilidade, biodegradabilidade, o facto de ser não tóxico e às suas propriedades de adsorção entre outras (Ravi Kumar, 2000; Estevinho, *et al.*, 2013). O quitosano é também considerado uma fibra dietética, sendo benéfico na diminuição de peso, na redução dos níveis de colesterol e reduz a absorção de lípidos. É um agente antimicrobiano e o facto de formar filmes permite controlar a transferência de agentes do meio externo para os alimentos, controlar a libertação de antioxidantes, nutrientes, flavours e drogas, controlar a taxa de respiração e a temperatura (Stephen *et al.*, 2006).

Este polissacárido é muitas vezes utilizado para a produção de filmes, micropartículas e nanopartículas devido à possibilidade de estabelecer ligações covalentes e/ou iônicas com agentes reticulantes.

As micropartículas, formadas a partir de ligações covalentes estabelecidas entre o agente reticulante e o polímero utilizado, possuem uma matriz permanente pois as ligações formadas são irreversíveis. No entanto se as ligações formadas forem do tipo iônicas, a rede de ligações formadas, é não permanente, pois pode haver reversibilidade das ligações formadas.

Existem diversos agentes reticulantes tais como, ácido cítrico e tripolifosfato, sendo o tripolifosfato o agente que estabelece ligações mais fortes com o quitosano.

O quitosano é um dos materiais de revestimento, que tem sido utilizado para encapsular diversos compostos tais como β -galactosidase, ácido gálico, óleo essencial de pimento, entre outros (Rosa *et al.*, 2013; Dima *et al.*, 2014; Estevinho *et al.*, 2014).

3.3. Estrutura das Micropartículas

De um modo geral as micropartículas produzidas por *spray-drying* são pequenas esferas uniformes, onde o material interno é designado por core e o material que envolve o material interno é designado por revestimento ou membrana.

O tamanho e a forma das micropartículas variam conforme o material de revestimento, o material encapsulado e a técnica de encapsulação, utilizados. Assim existem diferentes tipos de micropartículas como se pode observar na figura 4, esferas rodeadas por um revestimento fino e uniforme, micropartículas irregulares devido à forma irregular do core, várias partículas de core agregadas e envolvidas numa matriz continua de material de revestimento, um core definido mas com várias camadas de revestimento, concêntricas (Gharsallaoui *et al.*, 2007).

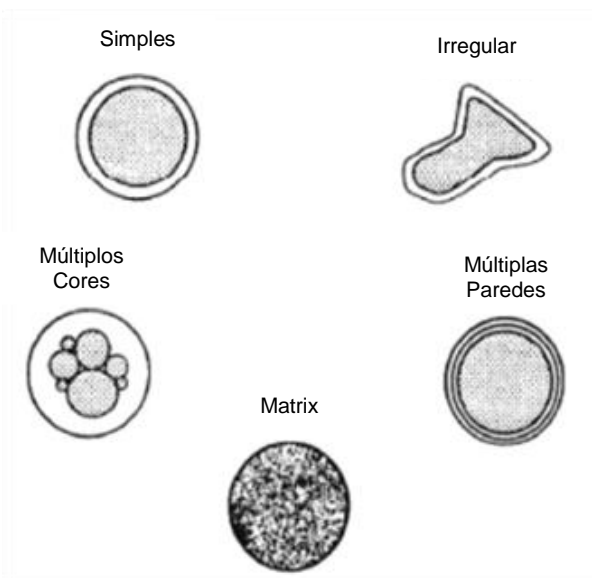


Figura 4. Exemplo de diferentes estruturas de micropartículas. Adaptado de Gharsallaoui *et al.*, 2007

4. Mecanismos de Libertação de Encapsulados

Como foi referido anteriormente o processo de microencapsulação tem como objectivo principal encapsular compostos bioactivos em matrizes de forma a proteger o composto do ambiente externo, No entanto também é necessário avaliar a forma de como o composto bioactivo se irá libertar após a sua encapsulação (Rahman, 2007)

Inicialmente os mecanismos de libertação de encapsulados surgiram com o objectivo de melhorar o controlo da administração de produtos farmacêuticos de forma a potencializar a sua acção terapêutica (Moura, 2012). Posteriormente foi possível aplicar diversos mecanismos à indústria alimentar tendo em conta vários factores como por exemplo os materiais de revestimento e os próprios mecanismos de libertação.

Estes mecanismos de libertação têm como vantagens, a libertação do composto activo em determinadas zonas específicas do organismo, o controlo da concentração de composto activo libertado, o controlo da libertação do bioactivo em determinados períodos de tempo e também é possível diminuir as perdas de vitaminas e minerais durante o processamento e a cozedura. (Duarte, 2011 e Raimundo, 2011)

Existem diversos mecanismos de libertação sendo eles por difusão, dissolução, biodegradação, modificação do pH, mecanismos térmicos, mecânicos, osmóticos e bioquímicos (Gaonkar *et al.*, 2014).

A avaliação dos mecanismos de libertação é realizada através de taxas/cinéticas de libertação. Existem diversas cinéticas de libertação, a de difusão de ordem zero, a difusão de primeira ordem, modelo de Fickian e o modelo de Higuchi's (Gaonkar *et al.*, 2014).

Cinética de ordem zero

De um modo geral a taxa de libertação não depende da concentração do composto activo. Assim o aumento ou a diminuição da concentração não aumenta ou diminui a velocidade de libertação.

Assim para uma taxa de libertação de ordem zero, a quantidade de composto bioactivo libertado é proporcional ao tempo, como se pode observar matematicamente pela equação 3.

$$\frac{dC_t}{dt} = k_0 \quad \text{Equação 3.}$$

Onde C_t é a quantidade de composto libertado num determinado tempo, t é o tempo e k_0 é a constante de ordem zero.

Cinética de primeira ordem

Neste caso a difusão do composto activo depende da concentração do composto activo. A cinética de primeira ordem pode ser traduzida matematicamente através da equação 4.

$$\frac{dC}{dt} = k_1 C \quad \text{Equação 4.}$$

Onde C é a quantidade de composto libertado, t é o tempo e k_1 é a constante de primeira ordem.

Modelo de Fick

Este modelo tem por base fluxos de difusão, onde ocorre a difusão do composto bioactivo de uma região com elevada concentração para uma de menor concentração. Na equação 5 encontra-se representada a lei deste modelo.

$$\frac{dC}{dt} = \frac{-D \times A \times (\Delta C)}{R} \quad \text{Equação 5.}$$

Onde C é a quantidade de composto libertado, t é o tempo, D é o coeficiente de difusão, A é a área superficial da micropartícula e R é o raio da micropartícula. $\Delta C = C_{OM} - C_{1M}$, onde C_{OM} é a concentração de composto activo no espaço externo à micropartícula e C_{1M} é a concentração de composto activo no interior da micropartícula.

Modelo de Higuchi

De um modo geral este modelo baseia-se num estado pseudo-estacionário onde a quantidade cumulativa libertada é proporcional à raiz quadrada do tempo. Este modelo baseia-se em várias permissas tais como:

- A concentração inicial do composto bioactivo na matriz é superior à solubilidade na matriz.
- A difusão ocorre a uma dimensão.
- Nenhuma superfície encontra-se contaminada com o composto bioactivo.
- As partículas de composto bioactivo são inferiores ao sistema microcápsula
- Não há dissolução nem *swelling* da matriz
- A difusividade do composto activo é constante
- O ambiente de libertação tem de conceber condições perfeitas para a libertação das micropartículas

Assim pode utilizar-se a equação 6, para representar o modelo de Higuchi's

$$C_t = -[DA(2C_0 - C_S)C_S t]^{1/2} \quad \text{Equação 6.}$$

É importante referir que os mecanismos de libertação e as suas respectivas taxas, são influenciados por diversos factores tais como o material de revestimento, a forma e geometria das micropartículas, a concentração de composto encapsulado, solubilidade, peso molecular, difusividade, tempo, temperatura entre outros (Rahman, 2007).

No que diz respeito a este trabalho, estudou-se os mecanismos de libertação controlada do composto activo em dois meios diferentes, um meio ácido e um meio neutro de forma a reproduzir as condições no estômago e no intestino, respectivamente.

III. Desenvolvimento Experimental

1. Quantificação dos Compostos Fenólicos e Determinação da Actividade Antioxidante

1.1. Preparação da Amostra de Própolis

A preparação da amostra foi semelhante para todos os tipos de análise, para isso dilui-se 1 µL de extracto de própolis (propex gotas – ortis) em 10 mL de metanol (Sigma Aldrich).

1.2. Quantificação dos Compostos Fenólicos

Método de Folin-Ciocalteu

De início, preparou-se dois reagentes, Folin-Ciocalteu (Panreac) a 0,25 M e o Carbonato de sódio Na_2CO_3 (Panreac) a 1 M. Em frascos âmbar colocou-se 2400 µL de água destilada, 150 µL de amostra de própolis e 150 µL de Folin (0,25 M), agitou-se no vortex para homogeneizar e aguardou-se durante 3 minutos, de seguida adicionou-se 300 µL de Na_2CO_3 (1 M), agitou-se novamente no vortex (Velp Scientifica, Itália) e deixou-se repousar no escuro durante 2 horas à temperatura ambiente. Ao fim desse tempo fez-se a leitura da absorvância a um comprimento de onda de 725 nm no espectrofotómetro. (Swain e Hillis, 1959)

Para a curva de calibração (anexo1) utilizou-se o ácido gálico (Sigma Aldrich) como padrão. A partir de uma solução mãe de 1000 mg/L de ácido gálico preparou-se diferentes soluções com uma gama de concentrações que variou entre 50 e 700 mg/L. Após a preparação destas soluções procedeu-se de forma semelhante à acima descrita, para obter uma relação entre a concentração de ácido gálico e a absorvância a 725 nm após reacção.

Método Directo

Este método foi apenas utilizado para analisar as amostras do extracto metanólico onde foram dissolvidas as micropartículas e para a análise das amostras nos ensaios de libertação (procedimentos que serão descritos mais adiante).

Após a obtenção das amostras, colocou-se 3,5 mL de amostra numa cuvette de quartzo. De seguida, fez-se a leitura através de espectrofotometria utilizando um comprimento de onda de 280 nm.

Para a curva de calibração (anexo 2) foi utilizado o ácido gálico (Sigma Aldrich) como padrão. A partir de uma solução mãe de 1000 mg/L de ácido gálico preparou-se diferentes soluções com as concentrações a variar entre 2.5 e 25 mg/L (anexo 5). Após a preparação destas soluções procedeu-se de forma semelhante à acima descrita, para obter uma relação entre a concentração de ácido gálico e a absorvância a 280 nm após reacção.

1.3. Determinação da Actividade Antioxidante

Método DPPH

Inicialmente preparou-se uma solução *stock*, obtida através da dissolução de 24 mg de DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil), (Sigma Aldrich) em 100 mL de metanol, e armazenou-se a (-19/-20°C).

Após duas horas preparou-se a solução de trabalho por diluição de 10 mL de solução *stock* em 45 mL de metanol. Seguidamente procedeu-se à leitura da absorvância a um comprimento de onda de 517 nm no espectrofotómetro (Unicam, UV/Vis Spectrometer – UV4, Alemanha). A diluição foi ajustada de modo a que o valor da absorvância fosse inferior a 1.1.

Após o procedimento descrito, transferiu-se 4 mL de solução de trabalho para frascos âmbar aos quais se adicionou 150 µL de amostra de própolis previamente preparada, agitou-se ligeiramente e deixou-se reagir no escuro durante 40 minutos. Após esse tempo, mediu-se a absorvância das amostras a um comprimento de onda de 517 nm. As análises foram feitas em triplicado.

O cálculo do RSA (*Radical Scavenging Activity*) foi realizado utilizando a equação 3

$$RSA (\%) = \frac{A_{DPPH} - A_{Amostra}}{A_{DPPH}} \times 100 \quad \text{Equação 7.}$$

onde o A_{DPPH} é a absorvância de uma solução formada por 4 mL de solução de trabalho e 150 µL de metanol e $A_{Amostra}$ é a absorvância da amostra que se quer analisar.

Para a preparação da curva de calibração (anexo3) utilizou-se o reagente Trolox (Sigma Aldrich) como padrão e procedeu-se da mesma forma descrita acima, mas neste caso a amostra foram as diferentes concentrações de Trolox. A gama de concentrações utilizadas variou entre 50 e 800 µM (Thaipong *et al.*, 2006).

Método FRAP

Primeiramente preparou-se uma solução de reagente FRAP resultante da mistura de 25 mL de tampão acetato 0,3 M, 2,5 mL de uma solução de TPTZ (Sigma Aldrich) 10 mM e 2,5 mL de uma solução aquosa de cloreto férrico (Panreac) 20 mM. Em frascos âmbar adicionou-se 90 µL de

amostra, 270 μ L de água e 2.7 mL de solução reagente FRAP, homogeneizou-se no vortex, e de seguida colocou-se os frascos num banho de água durante 30 minutos a 37 °C. Após esse tempo realizou-se a leitura da absorvância a 595 nm no espectrofotómetro. As leituras fizeram-se em triplicado (Rufino *et al.*, 2006)

Elaborou-se duas curvas padrão (anexo 4 e 5). Numa utilizou-se o reagente sulfato ferroso (Panreac) como padrão, em concentração de 500, 1000, 1500 e 2000 μ M. Na outra forma foi utilizado o reagente Trolox como padrão em concentrações que variaram entre 50 a 800 μ M. Após a preparação das diferentes soluções padrão com as diferentes concentrações procedeu-se da mesma forma que anteriormente, onde a amostra passou a ser cada uma das soluções com uma determinada concentração.

2. Microencapsulação do Extracto de Própolis

2.1. Preparação das Soluções

2.1.1. Solução de Goma-Arábica

Solução sem própolis

Adicionou-se 15 g de goma-arábica (Panreac) a 50 g de água, de forma a não se formar grânulos. Colocou-se a agitar durante 24 horas a uma velocidade de 360 rpm.

Posteriormente adicionou-se 30 g de etanol a 60% (Fisher Chemical), de forma a não ocorrer precipitação e deixou-se sob agitação durante 30 minutos.

No final obteve-se uma solução homogénea cuja concentração de goma-arábica era de 15%. As partículas obtidas após secagem foram designadas por G.A.

Solução com própolis

A solução de Goma-Arábica com extracto de própolis foi realizada de forma semelhante à descrita acima, no entanto em vez de 30 g de etanol a 60%, adicionou-se 30 g de extracto etanólico de própolis, com 10% de própolis.

As partículas obtidas após secagem foram designadas por G.A*.

2.1.2. Solução de Inulina

Solução sem própolis

Dissolveu-se 12 g de inulina (Roftiline ST – Orafti® GR) em 60 g de água pré-aquecida (70-80 °C) e sob agitação.

Simultaneamente preparou-se uma solução com 20 g de água e 24 g de etanol a 60%, que foi aquecida (70-80 °C) e homogeneizada sob agitação.

Posteriormente adicionou-se a solução água/etanol à solução de inulina, e deixou-se sob agitação durante 10 minutos.

Por fim deixou-se a solução arrefecer até à temperatura ambiente e procedeu-se à secagem por *spray-dryer*. As partículas obtidas após secagem foram designadas de I.

Solução com própolis

Para a produção de micropartículas de inulina com própolis, elaborou-se uma solução semelhante à descrita anteriormente, no entanto em vez de se adicionar 24 g de etanol a 60%, adicionou-se 24 g de extracto de própolis a (10% massa de própolis/ massa de extracto).

As partículas obtidas após secagem foram designadas por I*.

2.1.3. Solução de Quitosano

Soluções sem própolis

Inicialmente preparou-se 1 L de ácido acético (Fisher Chemical) a 1% ao qual foi adicionado 20 g de quitosano.

Deixou-se a agitar durante 24 horas, à temperatura ambiente e a uma velocidade de agitação de 350 rpm.

Pesou-se 500 g da solução obtida e procedeu-se à secagem. As partículas obtidas após secagem foram designadas por Q₁.

Aos restantes 500 g de quitosano, adicionou-se 10 g de ácido cítrico (Panreac) e deixou-se sob agitação durante 30 minutos a 350 rpm. As partículas obtidas após secagem foram designadas por Q₂.

Soluções com própolis

Primeiramente preparou-se 1 L de ácido acético a 1%.

De seguida, pesou-se 700 g de ácido acético a 1% e adicionou-se 20 g de quitosano. Deixou-se sob agitação durante 24 horas, à temperatura ambiente e à velocidade de 350 rpm.

Aos restantes 300 g de ácido acético a 1% adicionou-se 40 g de extracto de própolis a 10%. Colocou-se a solução a agitar durante 30 minutos de forma a homogeneizar.

Posteriormente adicionou-se os 700 g de solução de quitosano e deixou-se a agitar durante 30 minutos.

Da solução final, pesou-se 500 g que foram secas através da técnica de *spray-drying*, obtendo-se partículas designadas de Q₁^{*}.

Aos restantes 500 g de solução, foi adicionado 5 g de ácido cítrico e colocou-se sob agitação durante 30 min. As partículas obtidas após secagem foram designadas de Q₂^{*}.

É de referir que foi elaborada uma matriz Q₃^{*}, obtida a partir das partículas de quitosano com própolis (Q₁^{*}) reticuladas com tripolifosfato, o qual foi adicionado ao meio de libertação (1% m/m). No decorrer do trabalho só há referência desta matriz nos ensaios de libertação controlada dos encapsulados.

2.1.4. Condições do Processo de Secagem

Na tabela 2 encontram-se representadas as condições utilizadas durante o processo de secagem com o *spray-dryer* (Lab Plant, modelo SD-05, Alemanha), para a produção de micropartículas sem própolis e com própolis encapsulado.

Existem diversos autores que descreveram e testaram diversas condições de funcionamento do *spray-dryer*. Foi através da literatura que se optou por estas condições de funcionamento. Para a goma-arábica utilizou-se as condições descritas por Ribeiro (2007), no caso do quitosano com e sem ácido cítrico, as condições utilizadas foram as mesmas que Beijoca (2014) e por fim as condições utilizadas para a secagem das micropartículas de inulina foram obtidas por ensaios realizados por Beirão-da-Costa (2013).

Tabela 2. Condições utilizadas durante o processo de secagem por spray-drying

Amostra	Massa (g)	Velocidade da Bomba (mL/min)	Temperatura de Entrada (°C)
G.A e G.A*	95	8,0	170
Q ₁ e Q ₁ *	500		
Q ₂ e Q ₂ *	500		
I e I*	115	5,8	190

3. Caracterização das Micropartículas

3.1. Morfologia das Micropartículas

A caracterização da morfologia das micropartículas (Hitachi, modelo 52400, Alemanha) foi obtida através de microscopia electrónica de varrimento (*SEM*). Para isso as micropartículas foram colocadas num suporte de amostra de alumínio, revestidas com ouro e paládio e analisadas.

3.2. Extracção dos Composto Fenólicos das Micropartículas com Própolis

Para a extracção dos compostos fenólicos pesou-se 50 mg de micropartículas e dilui-se em 10 mL de metanol.

Levou-se a solução ao Ultraturrax (IKA Labortechnik T25 Basic, Alemanha), para imprimir uma força capaz de destruir as partículas, e armazenou-se durante 24 horas a uma temperatura de 4 °C, para que se desse a extracção.

Posteriormente centrifugou-se a solução e retirou-se o sobrenadante o qual foi submetido a análises através do método directo, DPPH e FRAP.

Ao pellet que sobrou adicionou-se novamente 10 mL de metanol e fez-se novamente uma extracção, voltando a repetir-se o mesmo processo anteriormente descrito.

4. Liberação Controlada dos Encapsulados

Na realização dos ensaios de liberação controlada, foram utilizados dois meios, um ácido (pH=1,2) e um neutro (pH=7,0) que foram previamente preparados.

Preparação dos Meios

Meio Ácido

- Dissolveu-se 20 g de cloreto de sódio (Panreac) em 70 mL de ácido clorídrico (HCl) (Fisher Chemical) e fez-se o volume de 1000 mL com água.

Meio Neutro

- Dissolveu-se 6,8 g de fosfato de potássio nanobásico (KH₂PO₄) (Panreac) em 250 mL de água.
- Seguidamente adicionou-se 77 mL de hidróxido de sódio (NaOH) (Fisher Chemical) a 0,2 M e fez-se o restante volume até 1000 mL com água destilada.

Ambas as soluções tampão após serem elaboradas tiveram de ser acertadas em relação ao pH e para isso utilizou-se HCl e NaOH a 0,2 M.

Método de Liberação

Para cada tipo de amostra pesou-se uma determinada quantidade de massa de micropartículas a qual foi adicionada a um determinado volume de meio. Essas quantidades encontram-se descritas na tabela 3.

- Primeiramente pesou-se a amostra e simultaneamente o meio a utilizar.
- De seguida, colocou-se o meio, num vaso de liberação, até que este atingisse os 37 °C, (temperatura que se utilizou durante todos os ensaios de liberação).
- Sob agitação adicionou-se as micropartículas de forma a não se formarem grânulos.
- Em intervalos regulares de tempo retirou-se 1 mL de amostra para um *eppendorf* e colocou-se a centrifugar numa microcentrifuga (Thermo Scientific Espresso, Alemanha).
- Retirou-se o sobrenadante o qual foi utilizado para ler a absorvância a 280 nm.
- Ao pelet adicionou-se meio fresco e agitou-se ligeiramente, seguidamente colocou-se no vaso de liberação.

Tabela 3. Massa de micropartículas libertadas e volume de meio de libertação

	Meio Ácido		Meio Neutro	
	Massa de Amostra (g)	Volume de meio (mL)	Massa de Amostra (g)	Volume de meio (mL)
G.A*	0,02	20	0,035	35
Q₁*	0,1	100	0,05	50
Q₂*	0,1	100	0,05	50
Q₃*	0,05	50	0,05	50
I*	0,1	100	0,05	50

Para o estudo de libertação controlada, foi necessário produzir quatro diferentes rectas de calibração. Duas rectas de Calibração com ácido gálico, para o meio ácido e neutro (anexo 6 e 7), e outras duas rectas de calibração com ácido gálico, para o meio ácido e neutro contendo tripolifosfato (anexo 8 e 9). Para a produção das rectas de calibração utilizou-se ácido gálico (Sigma Aldrich) como padrão, com diferentes gamas de concentrações. O método utilizado para a elaboração das quatro rectas de calibração foi o directo.

IV. Resultados e Discussão

1. Determinação dos Compostos Fenólicos a partir do método Folin-Ciocalteu

Para a determinação da quantidade de compostos fenólicos presentes no extracto de própolis foi necessário elaborar previamente uma recta de calibração (anexo 4), determinando-se assim a quantidade em estudo.

Através do método de Folin-Ciocalteu foi possível concluir que a quantidade de compostos fenólicos totais, presentes no extracto de própolis analisado, era de 44,31 mg Eq. Ác. Gálico/ g de própolis.

Estudos realizados por Aliyazıcıoglu (2013) mostram que a quantidade de compostos fenólicos varia entre $115,49 \pm 2,04$ e $210,33 \pm 2,04$ mg GAE/ g própolis. Comparando o valor obtido é possível verificar que este não se enquadra dentro dos valores da literatura, sendo um valor menor do que os apresentados.

Segundo a literatura o própolis e os seus extractos contêm diferentes quantidades de compostos fenólicos, formando assim um perfil distinto para cada tipo de amostra. A variação dos perfis deve-se à origem da flora do própolis e da época do ano em que é colhido.

2. Actividade Antioxidante do Extracto de Própolis

2.1. Método DPPH

O método do DPPH é muitas vezes utilizado para a determinação de radicais livres em amostras e a partir do qual é possível obter valores de RSA (Radical Scavenging Activity) e de TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity).

Para a determinação do valor de TEAC foi necessário elaborar uma curva de calibração com o reagente padrão Trolox. No anexo 1 está representada a recta de calibração cuja gama de concentrações utilizada foi entre 50 e 800 μ M. Na tabela 4 é possível observar os valores de RSA e de TEAC.

Tabela 4. Valores de RSA e de TEAC obtidos através do método DPPH

Método DPPH	
RSA (%)	TEAC M Trolox/ g de própolis
62	0,19

Através da tabela 4 é possível observar que o valor de RSA é de 62 % para uma concentração de extracto de própolis de 8,68 g/L.

Segundo estudos executados por Moreira (2008), a actividade antioxidante dos extractos de própolis variam conforme a região de onde provem esses extractos. Um estudo realizado por este autor mostrou que extractos de própolis provenientes da região de Bornes tinham um RSA de 33% para uma concentração de extracto de própolis de 0,001 g/L e 94% para uma concentração de 0,02 g/L. Por outro lado, os extractos de própolis provenientes do Fundão tinham um RSA de 1% para uma concentração de extracto de própolis de 0,007 g/L e 18% para uma concentração de 0,02 g/L.

É possível observar que com menores concentrações de extracto de própolis Moreira et al (2008) obteve valores de RSA maiores e menores do que o obtido através da nossa análise. Assim se para uma concentração de 8,68 g/L obteve-se um RSA de 62 % significa que o extracto de própolis utilizado apresenta uma actividade de captação de radicais livres menor.

Por outro lado, estudos realizados por Mihai (2011) mostraram que diferentes extractos de própolis de diferentes regiões da Transilvânia tinham valores de TEAC que variavam entre $0,29 \pm 0,10$ e $1,24 \pm 0,01$ mmol Trolox/ g própolis.

Ao converter-se os M de trolox/ g de própolis do extracto deste trabalho, obtém-se um valor de 0,045 mmol Trolox/ g de própolis. É possível verificar que é um valor menor do que o da literatura anteriormente referida, dando a ideia que este extracto têm uma actividade antioxidante menor.

Segundo a literatura a composição química da flora de cada região, de onde é recolhido o pólen e as resinas, influencia a actividade antioxidante dos extractos de própolis e a sua composição química. (Moreno 2000, Mihai 2011)

2.2. Método FRAP

Para a determinação da actividade antioxidante do própolis através do método FRAP, foi necessário elaborar duas rectas de calibração, uma cujo reagente padrão utilizado foi o sulfato ferroso e na outra o reagente foi o trolox. As rectas de calibração estão representadas no anexo 2 e 3, bem como as equações de cada recta e os seus coeficientes de determinação.

A partir das equações das rectas, foi possível determinar a actividade antioxidante dos extractos de própolis analisados através do método FRAP. Na tabela 5, encontram-se os valores de actividade antioxidante tendo por base o padrão sulfato ferroso e o padrão trolox.

Tabela 5. Valores de Actividade Antioxidante obtidos pelo método FRAP

Método FRAP	
ATT M Sulfato Ferroso/ g de própolis	TEAC M Trolox/ g de própolis
0,65	0,25

Os valores apresentados na tabela 5 indicam que o extracto de própolis analisado por este método também demonstra actividade antioxidante.

Mihai (2011) ao analisar diferentes extractos de própolis recorrendo ao método FRAP, obteve valores de actividade antioxidante que variavam entre $0,74 \pm 0,05$ e $2,54 \pm 0,10$ mmol $\text{Fe}^{\text{II}}\text{SO}_4$ / g própolis.

O extracto analisado neste trabalho apresenta um valor de ATT de $0,21$ mmol $\text{Fe}^{\text{II}}\text{SO}_4$ / g própolis. Comparando com os valores apresentados na literatura é possível observar que é um valor menor. Mas ainda assim o extracto analisado apresenta capacidade de oxidar o ferro, presente na solução de reacção.

Por outro lado, Aliyazıcıoglu (2013) estudou extractos de própolis provenientes de diferentes zonas da Turquia, e a actividade antioxidante desses extractos em TEAC, utilizando o método FRAP, variavam entre $182,12 \pm 2,25$ e $325,47 \pm 3,12$ μM Trolox/ g própolis.

Analisando o valor obtido do extracto de própolis em estudo, é possível verificar que é muito superior aos valores da literatura.

3. Caracterização das Micropartículas

3.1. Morfologia das Micropartículas

3.1.1. Micropartículas à base de Goma-Arábica

Na figura 5 encontra-se representada imagens, obtidas por microscopia electrónica de varrimento, das micropartículas de goma-arábica (G.A) e de goma-arábica com própolis (G.A*).

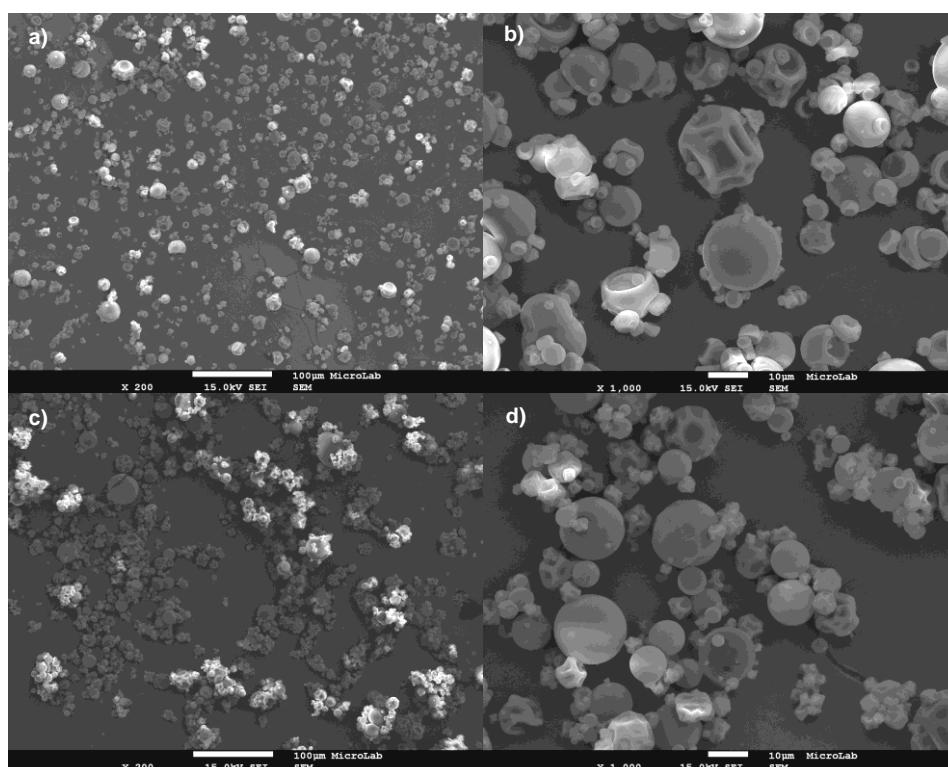


Figura 5. Micropartícula G.A, ampliação: a) 200 x, b) 1000 x. Micropartículas G.A*, ampliação: c) 200 x, d) 1000 x.

De um modo geral é possível observar que em ambos os casos há formação de aglomerados de micropartículas. É também possível visualizar que são poucas as micropartículas que possuem uma superfície lisa, na maior parte dos casos a superfície tem zonas côncavas. Estas zonas côncavas podem ter resultado da contracção rápida das partículas líquidas durante a fase inicial do processo de secagem (Kim,1996).

3.1.2. Micropartículas à base de Quitosano

Na figura 6 está representada imagens de micropartículas de quitosano (Q_1) e de quitosano com própolis (Q_1^*).

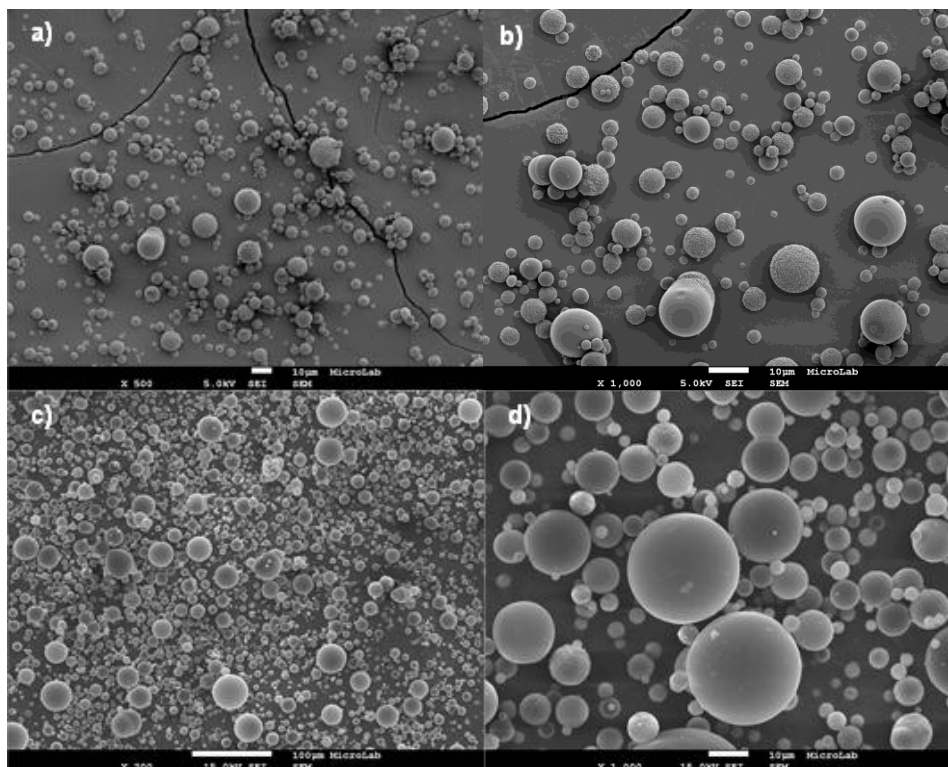


Figura 6. Micropartículas Q_1 , ampliação: c) 500 x, d) 1000 x. Micropartículas Q_1^* , ampliação: c) 200 x, d) 1000 x

Através da figura 6 a) e b) é possível observar que as esferas de quitosano apresentam uma forma esférica e uma superfície enrugada/ondulada, estudos realizados por Weerakody (2008), as micropartículas de quitosano mostraram resultados semelhantes aos aqui apresentados, corroborando assim os nossos resultados.

Relativamente às micropartículas de quitosano com própolis é possível observar que estas apresentam também uma forma esférica no entanto a sua superfície é mais lisa do que as microcápsulas de quitosano. Esta superfície lisa poderá dever-se não só há presença do própolis e das ceras que o constituem, mas também ao facto da viscosidade da solução preparada ser mais elevada, pois estudos realizados por P. He (1999) mostraram que micropartículas de quitosano preparadas a partir de uma solução com elevada viscosidade, apresentavam uma superfície lisa.

3.1.3. Micropartículas à base de Quitosano e Ácido Cítrico

É possível observar na figura 7, imagens de micropartículas de quitosano com ácido cítrico (Q_2) e de quitosano com ácido cítrico e própolis (Q_2^*).

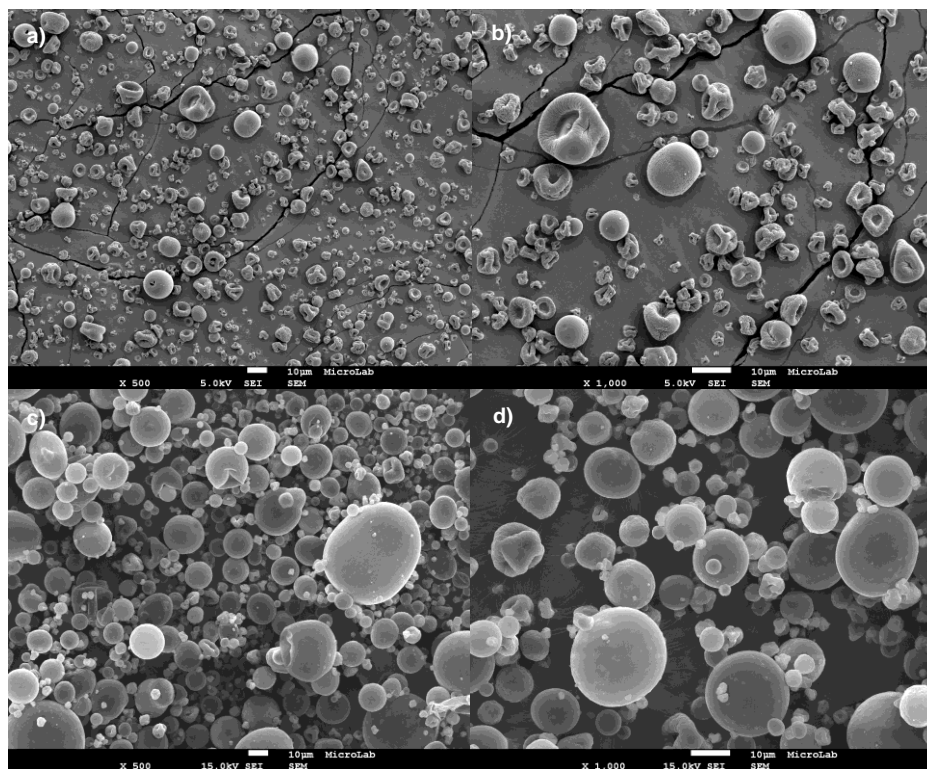


Figura 7. Micropartículas Q_2 , ampliação: c) 500 x, d) 1000 x. Micropartículas Q_2^* , ampliação: c) 500 x, d) 1000 x.

Através das figuras 7 a) e b) é possível visualizar que a maior parte as micropartículas de quitosano com ácido cítrico não apresentam uma forma esférica, mas sim irregular e cuja superfície além de enrugada tem também zonas côncavas. Por outro lado as micropartículas à base de quitosano com ácido cítrico e própolis exibem uma forma esférica e uma superfície lisa, no entanto existem exceções as quais apresentam a superfície um pouco enrugada.

3.1.4. Micropartículas à base de Inulina

Na figura 8 está representada imagens de micropartículas de inulina (I) e de inulina com própolis (I*).

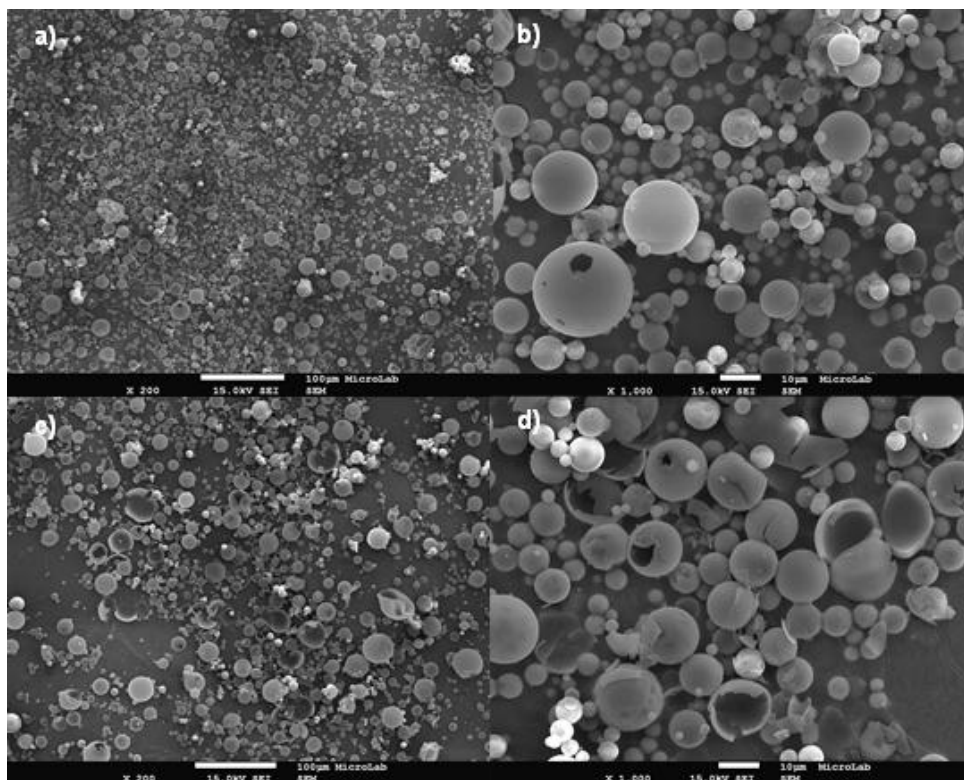


Figura 8. Micropartículas I, ampliação: a) 200 x, b) 1000x. Micropartículas I*, ampliação: c) 200 x, d) 1000 x.

Em relação às micropartículas de inulina com e sem própolis é possível observar que em ambos os casos as micropartículas apresentam uma forma esférica e uma superfície lisa. É também possível observar que em ambos os casos as micropartículas apresentam rupturas, sendo de maior incidência no caso das micropartículas de inulina com própolis.

Estudos realizados por Beirão-da-Costa (2013), mostram o contrário do que ocorreu no trabalho aqui apresentado, obtiveram micropartículas com uma estrutura resistente sem rupturas e/ou cavidades nem microcápsulas colapsadas.

Na figura 9 está representada parte de uma micropartícula de inulina com própolis onde é possível observar que a parede da mesma tem uma espessura de 3,9 µm.

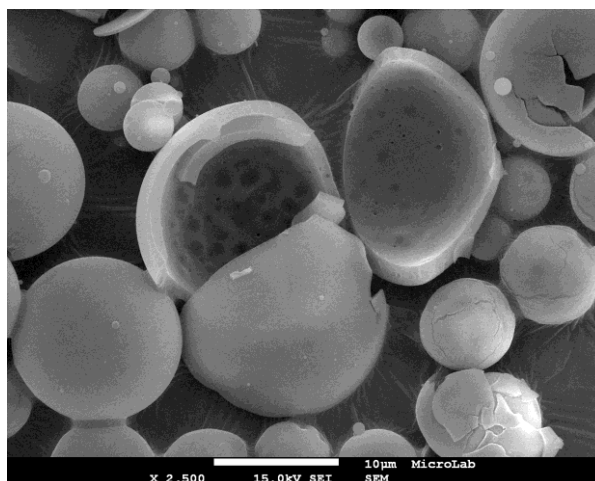


Figura 9. Micropartícula de inulina com própolis, ampliação: 2,500 x.

3.2. Tamanho das Micropartículas

3.2.1. Micropartículas à base de Goma-Arábica

Na figura 10 encontram-se representadas as distribuições de tamanho das micropartículas de goma-arábica e de goma-arábica com própolis, respectivamente.

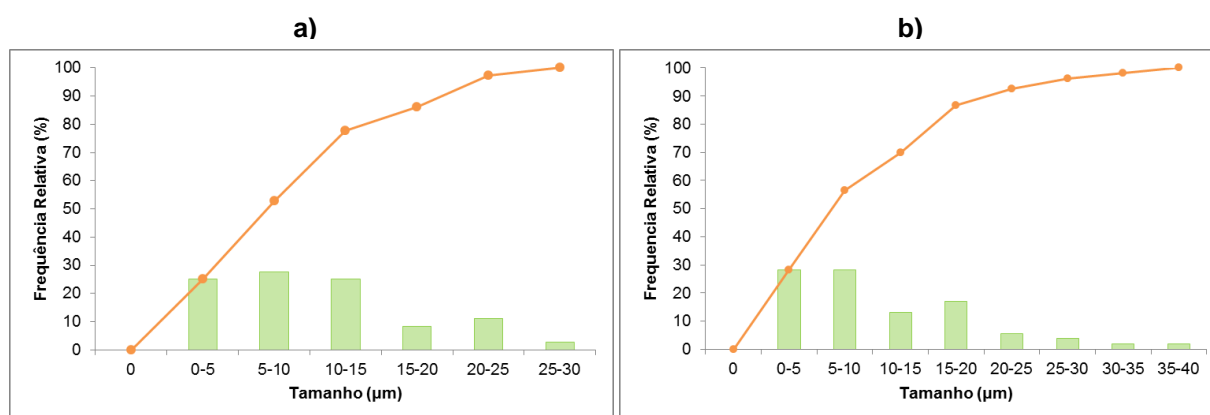


Figura 10. Distribuição de tamanhos, a) Micropartículas G.A, b) Micropartículas G.A*

É possível observar que no geral o diâmetro das micropartículas de G.A varia entre 1 e 30 μm , sendo o diâmetro médio cerca de 10 μm . Por outro lado, o diâmetro das micropartículas de G.A* varia entre 1 e 40 μm , sendo o diâmetro médio cerca de 12 μm . No entanto é possível observar que em ambos os casos maior parte das partículas têm um tamanho que varia entre 5 e 15 μm .

3.2.2. Micropartículas à base de Quitosano

A distribuição de tamanho das micropartículas de quitosano e de quitosano com própolis encontra-se representada na figura 11, respectivamente.

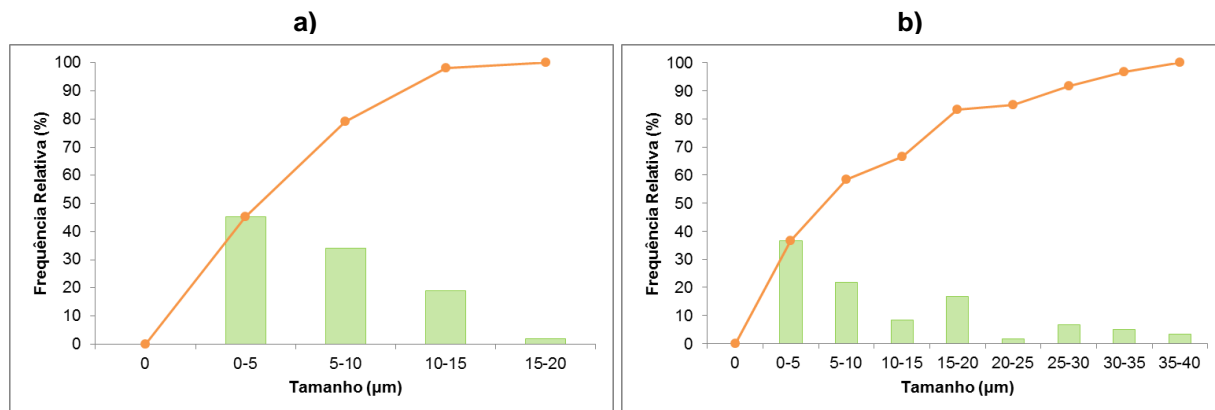


Figura 11. Distribuição de tamanhos, a) Micropartículas Q₁, b) Micropartículas Q₁*

No caso das micropartículas de Q₁, o seu tamanho varia entre 1 e 20 μm e o diâmetro médio é cerca de 6,3 μm. Também neste caso o tamanho das micropartículas Q₁* varia entre 1 μm e 40 μm e o tamanho médio das micropartículas cerca de 12 μm. Em ambos os casos maior parte das micropartículas apresenta um tamanho médio entre 5 e 15 μm.

3.2.3. Micropartículas à base de Quitosano com Ácido Cítrico

Na figura 12, estão representadas as distribuições de tamanho das micropartículas de quitosano com ácido cítrico e de quitosano com ácido cítrico e própolis, respectivamente.

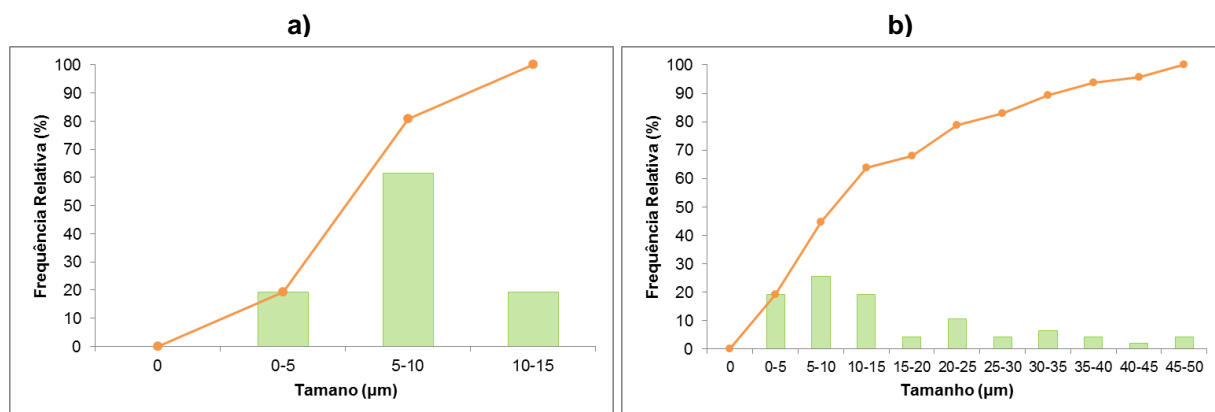


Figura 12. Distribuição de tamanhos, a) Micropartículas Q₂, b) Micropartículas Q₂*

Analisando a figura 12 é possível observar que as micropartículas de Q₂, apresentam um diâmetro que varia entre 1 e 15 μm, e o diâmetro médio das micropartículas é de 7,8 μm. Por outro lado, o

diâmetro das esferas de Q_2^* varia entre 1 e 50 μm sendo esta variação um pouco maior que as anteriores (figura 10 e 11), também o diâmetro médio das micropartículas é um pouco superior sendo de 17 μm .

No caso das micropartículas Q_2 , maior parte apresenta um tamanho médio que varia entre 5 e 10 μm , já as micropartículas Q_2^* , maior parte tem um tamanho médio entre 5 e 25 μm .

3.2.4. Micropartículas à base de Inulina

Na figura 13 estão representadas as distribuições de tamanho das micropartículas de inulina e de inulina com própolis.

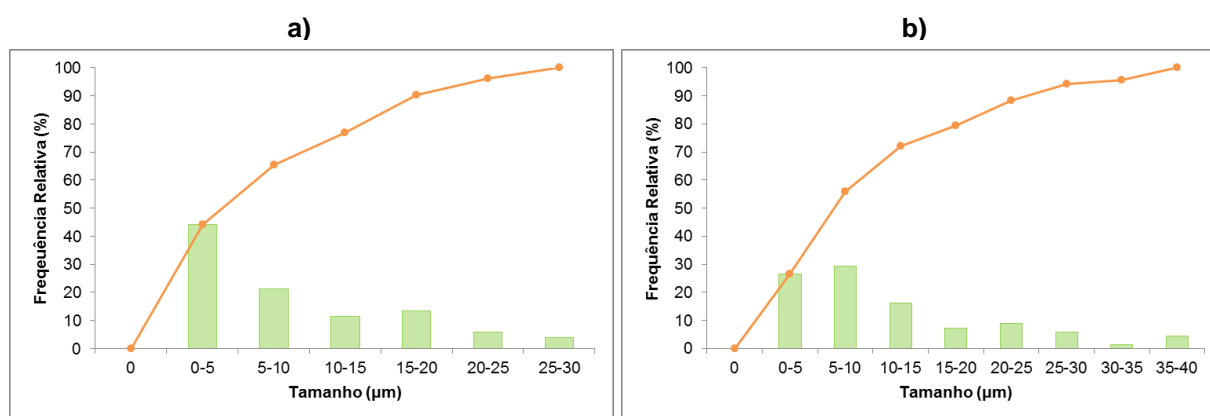


Figura 13. Distribuição de tamanhos, a) Micropartículas I, b) Micropartículas I*

Analisando ambos os histogramas é possível observar que as o tamanho das partículas de I varia entre 1 e 30 μm e o diâmetro médio é de 9,1 μm . Já as partículas de I* apresentam uma distribuição de tamanhos que varia entre 1 e 40 μm , e o diâmetro médio destas partículas é de 11 μm .

É também possível observar, que no caso das micropartículas I, maior parte possui um tamanho que varia 5 e 15 μm , por outro lado maior parte das micropartículas I* apresentam um tamanho que varia entre 5 e 20 μm .

De um modo em geral, é possível observar que as micropartículas apenas formadas pelos polissacáridos apresentam uma distribuição de tamanho e um diâmetro médio inferior às micropartículas que contêm o própolis encapsulado. Por outro lado, verifica-se que as micropartículas contendo própolis promovem um aumento da distribuição do tamanho, havendo uma maior variação de tamanhos das micropartículas. Ainda, é possível observar que das micropartículas contendo extracto de própolis, as de goma-arabica e quitosano são as de menor tamanho, seguidas das de inulina, sendo as de quitosano e ácido cítrico as de maior tamanho.

Também Beirão-da-Costa (2013) observou o mesmo facto quando analisou partículas de inulina contendo óleo essencial. O aumento do tamanho pode dever-se ao encapsulamento do composto bioactivo que leva à expansão das micropartículas.

3.3. Grau de Encapsulamento

O grau de encapsulamento foi obtido através da quantificação dos compostos fenólicos, dando uma ideia da quantidade de própolis que foi encapsulado.

Na tabela 6 encontram-se representados os valores de fenólicos encapsulados obtidos pelo método de Folin-Ciocalteu e pelo método directo, sendo esta quantificação expressa em mg EAG/ g de partícula.

Tabela 6. Grau de encapsulamento das diversas micropartículas

Micropartículas	Compostos Fenólicos	
	Método Folin-Ciocalteu (mg EAG/ g de partículas)	Método Directo (mg EAG/ g de partículas)
G.A*	6,56	8,95
Q₁*	12,28	17,52
Q₂*	4,09	6,82
I*	18,66	35,55

Analisando os valores apresentados na tabela 6 é possível verificar que através do método de folin-ciocalteu a quantidade de compostos fenólicos é menor do que os obtidos pelo método directo. Isto pode deve-se ao facto de o primeiro método ser mais específico porque envolve uma reacção com os fenólicos.

3.4. Actividade Antioxidante do Extracto Metanólico das Micropartículas

A determinação da actividade antioxidantes do extracto metanólico das micropartículas contendo própolis encontra-se representada tabela 7.

Tabela 7. Actividade Antioxidante do extracto metanólico das micropartículas através dos métodos DPPH e FRAP

Micropartículas	Actividade Antioxidante	
	DPPH (M Trolox/ g de partículas)	FRAP (M Trolox/ g de partículas)
G.A*	0,169	0,336
Q₁*	0,232	0,700
Q₂*	0,092	0,187
I*	0,572	0,896

De um modo geral, é possível observar que o extracto metanólico onde as micropartículas foram dissolvidas, apresenta actividade antioxidante.

No entanto, não é possível comparar directamente estes valores com os valores obtidos da análise do extracto de própolis. Pois no extracto etanólico de própolis há uma quantificação da actividade de todos os compostos antioxidantes, já no extracto metanólico das micropartículas a quantificação da actividade antioxidante é relativa só aos compostos antioxidantes encapsulados.

4. Libertação Controlada de Encapsulados

4.1. Libertação em Meio Ácido

Na figura 14 estão representados os perfis de libertação das micropartículas de G.A*, I*, Q₁*, Q₂* e, Q₃*. Na tabela 8 estão representados os valores de libertação máxima de fenólicos e de velocidade inicial de libertação.

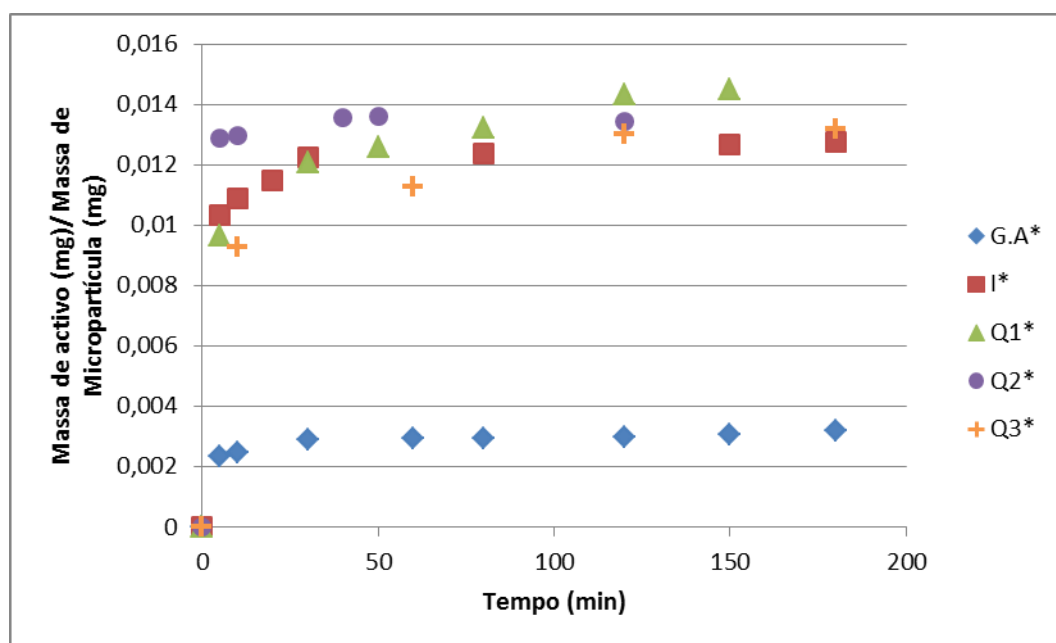


Figura 14. Libertação de compostos fenólicos das diversas micropartículas em meio ácido. G.A* - Goma-arábica + própolis; I* - Inulina + própolis; Q₁* - Quitosano + própolis; Q₂* - Quitosano + Ácido cítrico + própolis; Q₃* - Quitosano + própolis + tripolifosfato.

Tabela 8. Determinação da libertação máxima de fenólicos e velocidade inicial das diferentes micropartículas contendo própolis em meio ácido.

	Micropartículas				
	G.A*	I*	Q ₁ *	Q ₂ *	Q ₃ *
Libertação máxima de fenólicos (%)	34	35	83	205	76
Velocidade Inicial (g EAG/ min)	0,0005	0,0021	0,0019	0,0026	0,0009

É possível observar através da figura 14 que existe uma pequena distinção entre a fase inicial designada de “burst efect” e a fase em que a libertação se torna constante “time lag”, atingindo-se logo de seguida um patamar.

A velocidade de libertação elevada no início pode estar relacionada com a libertação de fenólicos que estão à superfície das partículas. A seguir, a libertação mais lenta pode ser resultado da expansão do volume das partículas devido à absorção de água quando estas são imersas no meio, ou então, devido ao relaxamento das cadeias poliméricas quando os polímeros hidrofílicos hidratam.

Também é possível verificar, tanto através da figura 14 como da tabela 8 que as micropartículas de goma-arábica com própolis são as que apresentam uma menor libertação de compostos fenólicos, quer por massa de micropartículas em solução, quer em relação à quantidade máxima que poderia ser libertada tendo em conta o grau de encapsulamento. Esta situação pode ocorrer devido à estrutura química desta matriz. A goma-arábica é composta por uma fracção de polissacáridos e uma fracção glico-proteica, sendo bastante diferente de todas as outras matrizes estudadas, que não apresentam fracções proteicas. Este facto pode estar na origem de interacções mais fortes com os compostos fenólicos em meio ácido, inibindo a sua libertação.

De entre as outras, as micropartículas de quitosano com própolis apresentam maior libertação. Relativamente às micropartículas de quitosano, verifica-se que a velocidade de libertação é ligeiramente superior para Q_2^* , seguindo-se Q_1^* e Q_3^* . No entanto, a quantidade máxima libertada por massa de micropartículas é muito semelhante (Figura 14). Neste caso, esperar-se-ia uma libertação maior com as partículas Q_1^* , dado que não foram preparadas com agentes de reticulação. O facto de a libertação a partir das partículas Q_2^* ser mais rápida pode ser devido ao efeito plastificante do ácido cítrico em excesso (que não reagiu com o quitosano), originando uma matriz mais facilmente hidratável promovendo a difusão dos bioactivos. No caso das partículas Q_3^* , o tripolifosfato terá actuado formando ligações fortes com o quitosano originando uma matriz mais rígida capaz de reter o composto bioactivo de forma a não ser libertado tão facilmente e tão rapidamente (Estevinho *et al.*, 2013). No entanto, o grau de reticulação não terá sido suficiente para promover uma maior retenção dos bioactivos comparando com as outras partículas. As partículas com ácido cítrico e própolis apresentam uma libertação máxima de fenólicos, superior a 100%, isto poderá dever-se ao facto de não existir uma quantificação exacta dos compostos fenólicos aquando da extracção dos mesmos em meio metanólico.

O ácido cítrico também é um reticulante no entanto e segundo Estevinho *et al.* (2013) as ligações formadas pelo quitosano com tripolifosfato são dez vezes mais fortes do que as ligações formadas entre o quitosano e outros agentes reticulantes, o que permite supor que a libertação do composto bioactivo seria superior na matriz quitosano-ácido cítrico em relação à matriz quitosano tripolifosfato.

4.2. Liberação em Meio Neutro

Na figura 15. estão representados os diversos perfis de liberação das diversas microcápsulas em meio neutro. Os valores de liberação máxima de fenólicos bem como a velocidade inicial de liberação, encontram-se representados na tabela 9.

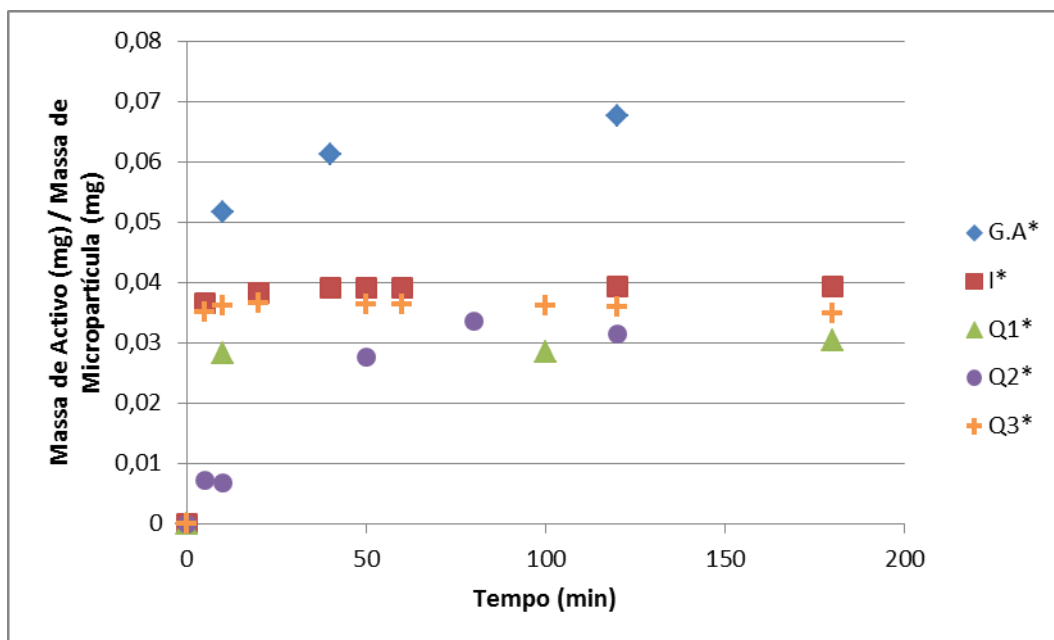


Figura 15. Liberação controlada de compostos fenólicos das diversas micropartículas em meio neutro. G.A* - Goma-arábica + própolis; I* - Inulina + própolis; Q₁* - Quitosano + própolis; Q₂* - Quitosano + Ácido cítrico + própolis; Q₃* - Quitosano + própolis + tripolifosfato.

Tabela 9. Determinação da liberação máxima de fenólicos e velocidade inicial das diferentes micropartículas contendo própolis em meio neutro.

	Micropartículas				
	G.A*	I*	Q ₁ *	Q ₂ *	Q ₃ *
Libertação máxima de fenólicos (%)	72	112	167	464	208
Velocidade Inicial (g EAG/ min)	0,0052	0,0073	0,0028	0,0014	0,0069

Através da tabela 9, verifica-se que a massa máxima de compostos fenólicos libertada em relação à que poderia ter sido libertada, tendo em conta o grau de encapsulamento, é superior a 100% em todas as matrizes à excepção da goma-arábica com própolis

Como foi referido anteriormente, a extracção de compostos fenólicos em meio metanólico pode não ocorrer de forma semelhante à que ocorre durante a liberação dos compostos fenólicos em meio neutro, levando a uma quantificação de compostos fenólicos inferior à que realmente está presente

nas micropartículas. Estima-se que o método para a quantificação do grau de encapsulamento não tenha sido eficiente, muito provavelmente devido à complexidade do própolis.

No entanto, comparando os perfis das Figuras 14 e 15, é possível observar que há uma maior libertação de compostos fenólicos em meio neutro do que em meio ácido. Por outro lado, em meio neutro verifica-se o oposto ao observado em meio ácido: a libertação a partir das partículas de G.A* é superior à das outras partículas. A composição química bastante diferente da goma-arábica em relação às outras matrizes deverá ser o factor principal para este comportamento.

Relativamente às diferentes matrizes de quitosano, neste meio verifica-se o oposto do que acontece em meio ácido, neste meio a matriz de quitosano contendo tripolifosfato (Q_3^*) é a que liberta mais composto bioactivo e a matriz apenas de quitosano é a que liberta menos. O que dá a entender que em meio neutro a presença de agentes reticulantes não vai influenciar no aprisionamento dos compostos bioactivos.

Ainda em relação às diferentes matrizes de quitosano, é possível observar que há uma maior libertação de compostos fenólicos em meio neutro do que em meio ácido. Como foi referido anteriormente, o quitosano é um polissacárido catiónico em meio ácido. Este facto pode ter originado o estabelecimento de interacções electrostáticas entre os grupos amina protonados do quitosano com os grupos hidroxilo dos compostos fenólicos, promovendo uma menor libertação destes para o meio ácido. Por outro lado em meio neutro os grupos amina do quitosano não se encontram protonados, pelo que as referidas interacções electrostáticas não devem ocorrer, estando os compostos fenólicos mais livres para se difundirem.

Relativamente às micropartículas de inulina, estas comportam-se como as de quitosano, tanto em meio ácido como em meio neutro. Isto pode dever-se à sua composição ser semelhante à do quitosano embora não tenha os grupos amina. No entanto a inulina é considerada uma fibra alimentar, não é digerível e a sua solubilidade depende da temperatura do meio onde a mesma é libertada, neste caso, ambos os meios estavam a 37°C, é uma temperatura intermédia que pode não ser suficiente para que haja uma total solubilização da inulina.

As libertações controladas realizadas neste trabalho tiveram como objectivo mimetizar o que sucede no estômago e no intestino, mas tendo em conta apenas o pH desses dois locais, excluindo outros factores como enzimas e processos que possam ocorrer durante a digestão e absorção dos alimentos. O que se verificou foi que em meio ácido a libertação do composto bioactivo era menor do que no meio neutro, assim e fazendo uma analogia ao que ocorre no organismo, pode-se inferir que no estômago a libertação dos compostos bioactivos do própolis poderá ser menor do que no intestino.

Este facto vai de encontro a um dos objectivos do processo de microencapsulação, o de haver uma libertação controlada de fármacos e/ou de compostos bioactivos, em locais propícios à sua maior absorção que neste caso é no intestino.

V. Conclusões

Após a realização deste trabalho conclui-se que é possível encapsular extracto etanólico de própolis em diversas matrizes como a goma-arábica, o quitosano e a inulina, através do processo de spray-drying.

As micropartículas produzidas apresentam actividade antioxidante inferior ao extracto etanólico de própolis utilizado para a microencapsulação, o que pode ser devido ao baixo carregamento das mesmas e ao encapsulamento de só parte das classes de compostos presentes o extracto inicial.

Ainda em relação às micropartículas a análise realizada por microscopia de varrimento (SEM) mostrou que as micropartículas são cápsulas e que no geral apresentavam uma forma esférica, no entanto as micropartículas que continham própolis apresentavam uma superfície lisa ao contrário das micropartículas sem própolis.

No que diz respeito ao tamanho, as micropartículas contendo própolis apresentavam um tamanho médio maior do que as micropartículas sem própolis encapsulado.

Relativamente à libertação controlada das micropartículas, destaca-se a matriz de goma-arábica, pois em meio ácido libertou uma menor quantidade de compostos bioactivos e em meio neutro libertou uma maior quantidade, relativamente às outras matrizes. Este comportamento deverá estar relacionado com a composição química da goma-arabica e por esta ser tão diferente dos outros polissacáridos.

Ainda em relação à libertação controlada, esta mostrou que em meio ácido a libertação dos compostos bioactivo era menor do que em meio neutro, permitindo fazer uma analogia do que poderia acontecer *in vivo*, havendo uma maior libertação do composto bioactivo no intestino, que é a zona de maior absorção

VI. Trabalho Futuro

Com a realização do presente trabalho, surgiram outras ideias e propostas de trabalho futuro.

- Continuar com o estudo de microencapsulação de própolis noutras matrizes de polissacáridos;
- Optimizar os parâmetros de secagem no spray-drying de forma a obter um maior rendimento em termos de produto final, e de forma a obter micropartículas esféricas e sem enrugamento;
- Relativamente aos polissacáridos estudados, aumentar a concentração destes nas soluções de base e compara-los com estudos de menor concentração para verificar se esta vai alterar o rendimento da microencapsulação e a quantidade de compostos bioactivos;
- Aumentar a concentração de própolis na solução a encapsular e estudar e caracterizar as micropartículas tanto a nível de actividade antioxidante como a nível de estrutura;
- Analisar e avaliar outros métodos de extracção dos compostos fenólicos de modo a quantificar os mesmos com mais exactidão e precisão;
- Realizar provas sensoriais de forma a compreender se o encapsulamento de própolis é capaz de atenuar o aroma e odor característicos.

VII. Referências Bibliográficas

- Aliyazıcıoğlu, R., Sahin, H., Ertürk, O., Ulusoy, E., Kolaylı, S. (2013). Properties of Phenolic Composition and Biological Activity of Propolis from Turkey. *International Journal of Food Properties*, 16: 277 – 287.
- Barbarić, M., Mišković, K., Bojić, M., Lončar, M. B., Smolčić-Bubalo, A., Debeljak, Ž., Medić-Sarić, M. (2011). Chemical composition of the ethanolic propolis extracts and its effect on HeLa cells. *Journal of Ethnopharmacology*, 135: 772 – 778.
- Bart, J. (2006). *Plastics Additives. Advanced Industrial Analysis*. IOS Press, Netherlands. Chap. 1. In-Polymer Spectroscopic Analysis of Additives, 4 – 6 p.
- Beijoca, M. (2014). *Encapsulamento de extractos de própolis por secagem por atomização e estudos de liberação controlada*. Tese de Mestrado. Universidade Técnica de Lisboa – Instituto Superior de Agronomia. Lisboa. 66 p.
- Beirão-da-Costa, S., Duarte, C., Bourbon, A. I., Pinheiro, A. C., Januário, M. I.N., Vicente, A. A., Beirão-da-Costa, M. L., Delgadillo, I. (2013). Inulin potential for encapsulation and controlled delivery of Oregano essential oil. *Food Hydrocolloids*, 33: 199 – 206.
- Benzie, I. e Strain, J. (1996). The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of “Antioxidant Power”: The FRAP Assay. *Analytical Biochemistry*, 239: 70 – 76.
- Benzie, I. e Strain, J. (1999). Ferric Reducing/ Antioxidant Power Assay: Direct Measure of Total Antioxidant Activity of Biological Fluids and Modified Version for Simultaneous Measurement of Total Antioxidant Power and Ascorbic Acid Concentration. *Methods in Enzymology*, 299 (2): 15 – 27.
- Branco, P. (2001). *Os Segredos de Cura das Abelhas*. Publicações Prevenção de Saúde. 115 – 154 p.
- Brand-Williams, W.; Cuvelier, M.; Berset, C. (1995). Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. *LWT - Food Science and Technology*, 28 (1): 25 – 30.
- Brasileiro, J. S. (2011). *Microencapsulação de compostos bioativos: inovação em diferentes áreas*. Tese de Mestrado em Ciências Farmacêuticas. Universidade Fernando Pessoa – Faculdade de Ciências da Saúde. Porto. 71 p.
- Burdock, G. A. (1998). Review of the Biological Properties and Toxicity of Bee Propolis (Propolis). *Food and Chemical Toxicology*, 36: 347 – 363.

Chen, X. D. e Mujumdar, A. S. (2008). *Drying Technologies in Food Processing*. Blackwell Publishing. 1st ed. Chap. 4, Spray drying of food materials – process and product characteristics. 113 – 159 p.

Dalgleish, D. (2006). Food emulsions – their structures and structure-forming properties. *Food Hydrocolloids*, 20: 415 – 422.

Dima, C., Cotâret, M., Alexe, P., Dima, S. (2014). Reprint of "Microencapsulation of essential oil of pimento [Pimenta dioica (L) Merr.] by chitosan/k-carrageenan complex coacervation method". *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 25: 97 – 105.

Estevinho, B. A., Rocha, F., Santos, L., Alves, A. (2013). Microencapsulation with chitosan by spray drying for industry applications - A review. *Food Science & Technology*, 31: 138 – 155.

Estevinho, B. N., Damas, A. M., Martins, P., Rocha, F. (2014). Microencapsulation of β -galactosidase with different biopolymers by a spray-drying process. *Food Research International*, 64: 134 – 140.

Fang, Z. e Bhandari, B. (2012). Spray drying, freeze drying and related process for food ingredients and nutraceutical encapsulation. In: Garti, N. e McClements, D. *Encapsulation technologies and delivery systems for food ingredients and nutraceuticals*. Woodhead Publishing. Cambridge. 73 – 109 p.

Fernandes, R., Borges, S., Botrel, D. (2014). Gum arabic/starch/maltodextrin/inulin as wall materials on the microencapsulation of rosemary essential oil. *Carbohydrate Polymers*, 101: 524 – 532.

Fernandez-Panchos, M.; Villano, D.; Troncoso, A.; Garcia-Parrilla, M. (2008). Antioxidant Activity of Phenolic Compounds: From In Vitro Results to In Vivo Evidence. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 48: 649 – 671.

Fleming, R. S. (1921). The Spray Process of Drying. *The Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 13 (5): 447 – 449.

Fritzen-Freire, C., Prudêncio, S. E., Amboni, R., Pinto, S. S., Negrão-Murakami, A. N., Murakami, F. S. (2012). Microencapsulation of bifidobacteria by spray drying in the presence of prebiotics. *Food Research International*, 45: 306 – 312.

Gaonkar, A., Vasisht, N., Khare, A. e Sobel, R. (2014). Microencapsulation in the Food Industry. 1st ed. Academic Press, Elsevier. London. Part II, Concept of Microencapsulation. Chap 2., Factors and Mechanisms in Microencapsulation, 13 – 24 p.

Gharsallaoui, A.; Roudaut, G.; Chambin, O.; Voilley, A.; Saurel, R. (2007). Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: An overview. *Food Research International*, 40: 1107 – 1121.

Halliwell, B. e Gutteridge, J. M. C. (1995). Free Radicals in Biology and Medicine. 18, 125. Citado por Benzie, I. e Strain, J. (1999). Ferric Reducing/ Antioxidant Power Assay: Direct Measure of Total Antioxidant Activity of Biological Fluids and Modified Version for Simultaneous Measurement of Total Antioxidant Power and Ascorbic Acid Concentration. *Methods in Enzymology*, 299 (2): 15 – 27.

He, P., Davis, S. S., Illum, L. (1999). Chitosan microspheres prepared by spray drying. *International Journal of Pharmaceutics*, 187: 53 – 65.

Heldman, D. R. e Hartel R. W. (1997). *Principles of Food Processing*. Aspen Publishers. New York. 303 p.

Hemingway, R. e Laks, P. (1992). *Plant Polyphenols – Synthesis, Properties, Significance*. vol 59. Plenum. New York. 259 – 280 p.

Ikawa, M.; Shaper, T.; Dollard, C.; Sanser, J. (2003). Utilization of Folin-Ciocalteu Phenol Reagent for the Detection of Certain Nitrogen Compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51: 1811 – 1815.

Jun-xia, X., Hai-yan. Y., Jian, Y. (2011). Microencapsulation of sweet orange oil by complex coacervation with soybean protein isolate/gum Arabic. *Food Chemistry*, 125: 1267 – 1272.

Jyothi, N. V.; Prasanna, P. M.; Sakarkar, S.; Prabha, K. S.; Ramaiah, P. S.; Srawan, G. Y. (2010). Microencapsulation techniques, factors influencing encapsulation efficiency. *Journal of Microencapsulation*, 27 (3): 187 – 197.

Kim, Y. D., Morr, C.V. (1996). Microencapsulation Properties of Gum Arabic and Several Food Proteins: Spray-Dried Orange Oil Emulsion Particles. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44: 1314 – 1320.

Lee, J.; Chung, H.; Chang, P.; Lee, J. (2007). Development of a method predicting the oxidative stability of edible oils using 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH). *Food Chemistry*, 103: 662 – 669.

Liu, Z.; Zhou, J.; Zeng, Y.; Ouyang, X. (2004). The enhancement and encapsulation of *Agaricus bisporus* flavor. *Journal of Food Engineering*, 65: 391 – 396.

Madene, A., Jacquot, M., Scher, J., Desobry, S. (2006). Flavour encapsulation and controlled release – a review. *International Journal of Food Science and Technology*, 41: 1 – 21.

Marczenko, Z., Balcerzak, M. (2000). *Separation, Preconcentration and Spectrophotometry in Inorganic Analysis*. Amsterdam: Elsevier Science B.V. Part I, Chap. 2, Principles of spectrophotometry, 26 – 38 p.

Masters, K. (1997). Spray dryers. In: Baker, C. *Industrial Drying of Foods*. Blackie Academic & Professional. London. 317 p.

Matsuno, T. (1997). *O Efeito Terapêutico da Própolis*. 1st ed. vol 1. New York. 133 p.

Mihai, C. M., Mărghitas, L., Dezmirean, D. S. Bărnuțiu, L. (2011). Correlation between Polyphenolic Profile and Antioxidant Activity of Propolis from Transylvania. *Animal Science and Biotechnologies*, 44 (2): 100 – 103.

Milardović, S.; Ivekovic, D.; Grabarić, B. (2006). A novel amperometric method for antioxidant activity determination using DPPH free radical. *Bioelectrochemistry*, 68: 175 – 180.

Mohammadzadeh, S., Sharriatpanahi, M., Hamed, M., Amanzadeh, Y., Ebrahimi, S., Ostad, S. (2007). Antioxidant power of Iranian propolis extract. *Food Chemistry*, 103: 729 – 733.

Mora, S. (2007). *Manual de Experimentos de Laboratório para Bioquímica*. San José: UNED – Editorial Universidad Estatal a Distancia. Chap. 1, Espectrofotometria, 9 – 15 p.

Moura, M. J. (2012). Aplicações do quitosano em liberação controlada de fármacos: algumas considerações. *Enciclopédia Biosfera*, 14 (8): 1489 – 1509.

Nollet, L. (2000). *Handbook of water analysis*. Marcel Dekker, Inc. New York. 211 – 215 p.

Osman, M. O., Menzies, A. R., Williams, P. A., Phillips, G. O., Baldwin, T. (1993). The molecular characterisation of the polysaccharide gum from *Acacia senegal*. *Carbohydrate Research*, 246: 303 – 318.

Parikh, D. M. (1997). *Handbook of Pharmaceutical Granulation Technology*. New York. Vol 8. Chap. 5, Spray Drying as an Alternative Granulation Technique. 75 – 98 p.

Phillips, G. O., Ogasawara, T., Ushida, K. (2008). The regulatory and scientific approach to defining gum arabic (*Acacia senegal* and *Acacia seyal*) as a dietary fibre. *Food Hydrocolloids*, 22: 24 – 35.

Rahman, M. S. (2007). *Handbook of Food Preservation*. 2nd ed. CRC Press. Taylor & Francis Group. Florida. Part 3. Preservation by Controlling Water, Structure, and Atmosphere. Chap 22. Encapsulation, Stabilization, and Controlled Release of Food Ingredients and Bioactives, 509 – 568 p.

Raimundo, A. C. (2011). *Produção de co-extrudidos à base de hidroxipropilmetilcelulose para libertação controlada de fármacos*. Tese de Mestrado em Engenharia Farmacêutica. Universidade de Lisboa – Faculdade de Farmácia, Universidade Técnica de Lisboa – Instituto Superior Técnico. Lisboa. 108 p.

Randall, R. C., Phillips, G. O., Williams, P. A. (1988). The role of the proteinaceous component on the emulsifying properties of gum arabic. *Food Hydrocolloids*, 2: 131 – 140.

Ravi Kumar, M. N. V. (2000). A review of chitin and chitosan applications. *Reactive & Functional Polymers*, 46: 1 – 27.

Ribeiro, C. (2007). *Encapsulamento de Aromas Alimentares*. Tese de Doutoramento. Universidade Técnica de Lisboa – Instituto Superior de Agronomia. Lisboa.

Robinson, J. W. (1995). *Undergraduate Instrumental Analysis*. 5th ed. New York. Chap. 8, Spectrophotometry, Colorimetry, and Polarimetry, 386 – 410 p.

Rosa, C. G., Borges, C. D., Zambiarri, R. C., Nunes, M. R., Benvenuto, E. V., Luz, S. R., D'Avila, R. F., Rutz, J. K. (2013). Microencapsulation of gallic acid in chitosan, β -cyclodextrin and xanthan. *Industrial Crops and Products*, 46: 138 – 146.

Rufino, M., Alves, R., Brito, E., Morais, S., Sampaio, C., Pérez-Jiménez, J., Saura-Calixto, F. (2006). Metodologia Científica: Determinação da Actividade Antioxidante Total em Frutas pelo Método de Redução do Ferro (FRAP). *Comunicado Técnico Online*, 125: 1 – 4.

Rosenberg, M. e Sheu T-Y. (1996). Microencapsulation of Volatiles by Spray-Drying in Whey Protein-Based Wall Systems. *International Dairy Journal*, 6: 273 – 284.

Santos, G., Almeida, E., Corso, C. (2014). Evaluation of biodegradation process of textile azo dye in solution by *Aspergillus oryzae* by UV-VIS and FTIR analysis. In: Méndez-Vilas, A. *Industrial, medical and environmental applications of microorganisms*. Wageningen Academic. Netherlands. 109 – 114 p.

Sarkar, S., Gupta, S., Variyar, P. S., Sharma, A., Singhal, R. S. (2013). Hydrophobic derivatives of guar gum hydrolyzate and gum Arabic as matrices for microencapsulation of mint oil. *Carbohydrate Polymers*, 95: 177 – 182.

Schwannecke, M. (2009). *Physico-Chemical Characteristics and Antioxidant Activity of Tart Cherry Powder Dried by Various Drying Methods*. Master Thesis in Food Science. Michigan State University. USA. 124 p.

Shahidi, F.; Han, X. Q. (1993). Encapsulation of food ingredients. *Food Science and Nutrition*, 33: 501 – 547.

Stephen, A. M., Phillips, G. O., Williams, P. A. (2006). *Food Polysaccharides and Their Applications*. 2nd ed. Taylor & Francis Group. 456 – 476 p.

Swain, T., e Hillis, W. E. (1959). The phenolic constituents of *Prunus Domestica*. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 10: 63 – 68.

Thaipong, K., Boonprakob, U., Crosby, K., Cisneros-Zevallos, L., Byrne, H. (2006). Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19: 669 – 675.

Weerakody, R., Fagan, P., Kasaraju, S. L. (2008). Chitosan microspheres for encapsulation of α -lipoic acid. *International Journal of Pharmaceutics*, 357: 213 – 218.

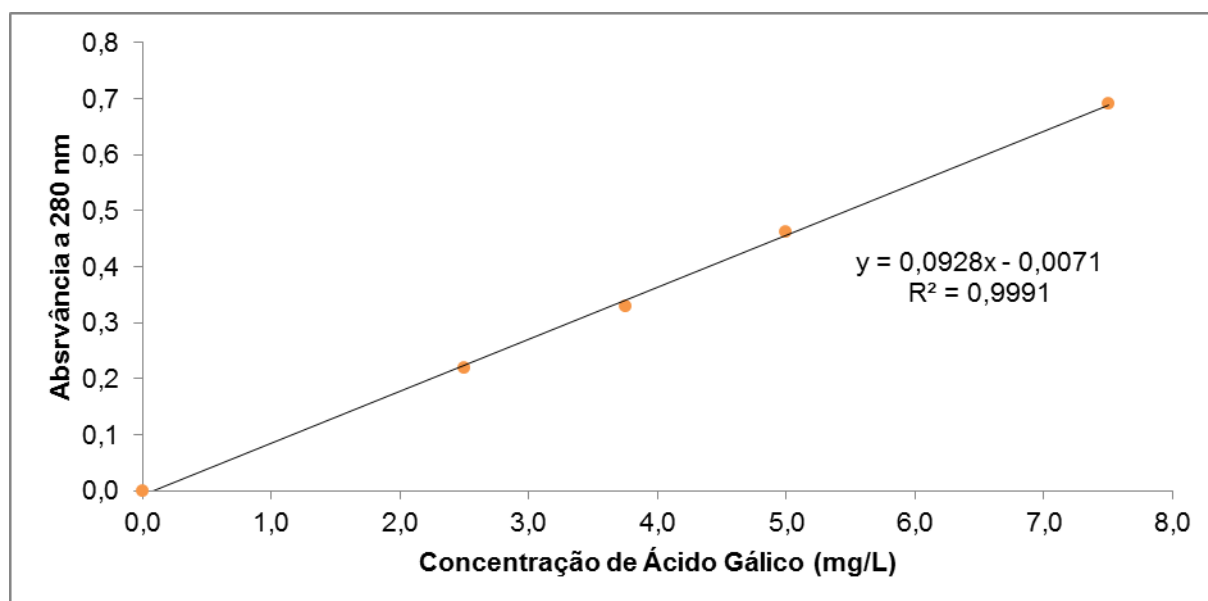
Winston, M. L. (1987). *The biology of the honey bee*. Harvard University Press. Cambridge and London 1 – 12 p.

Wong, C.; Li, H.; Cheng, K.; Chen, F. (2006). A systematic survey of antioxidant activity of 30 Chinese medicinal plants using the ferric reducing antioxidant power assay. *Food Chemistry*, 97: 705 – 711.

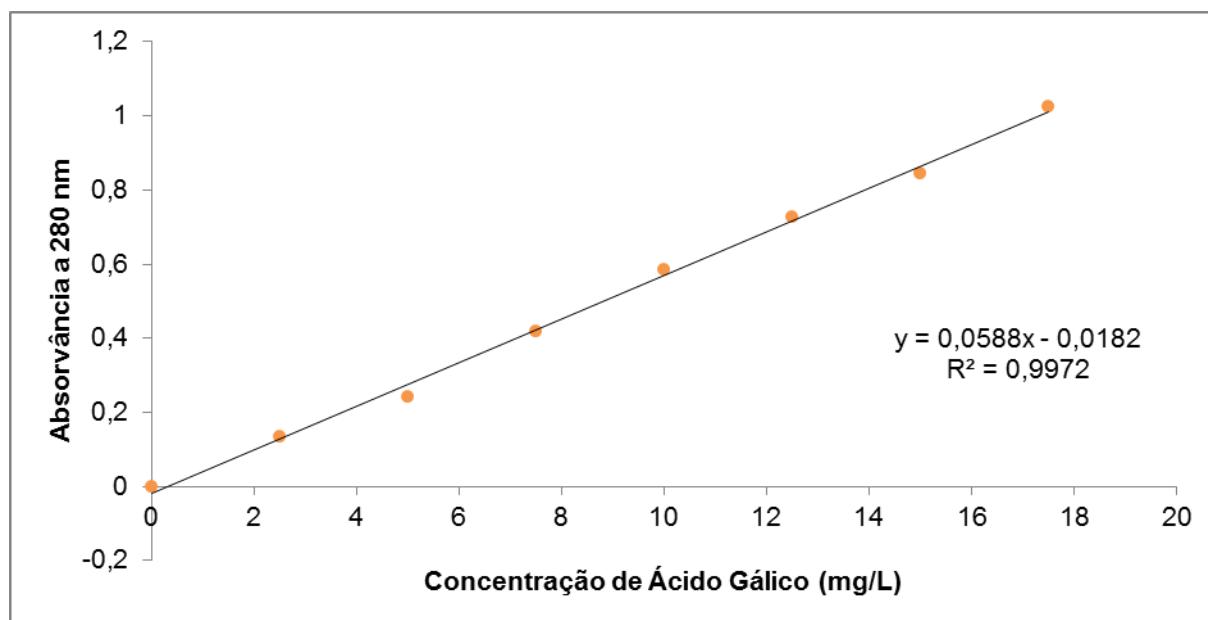
Zhang, Q.; Shen, J.; Silva, A.; Dennis, D.; Barrow, C. (2006). A simple 96-well microplate method for estimation of total polyphenol content in seaweeds. *Journal of Applied Phycology*, 18: 445 – 450.

VIII. Anexos

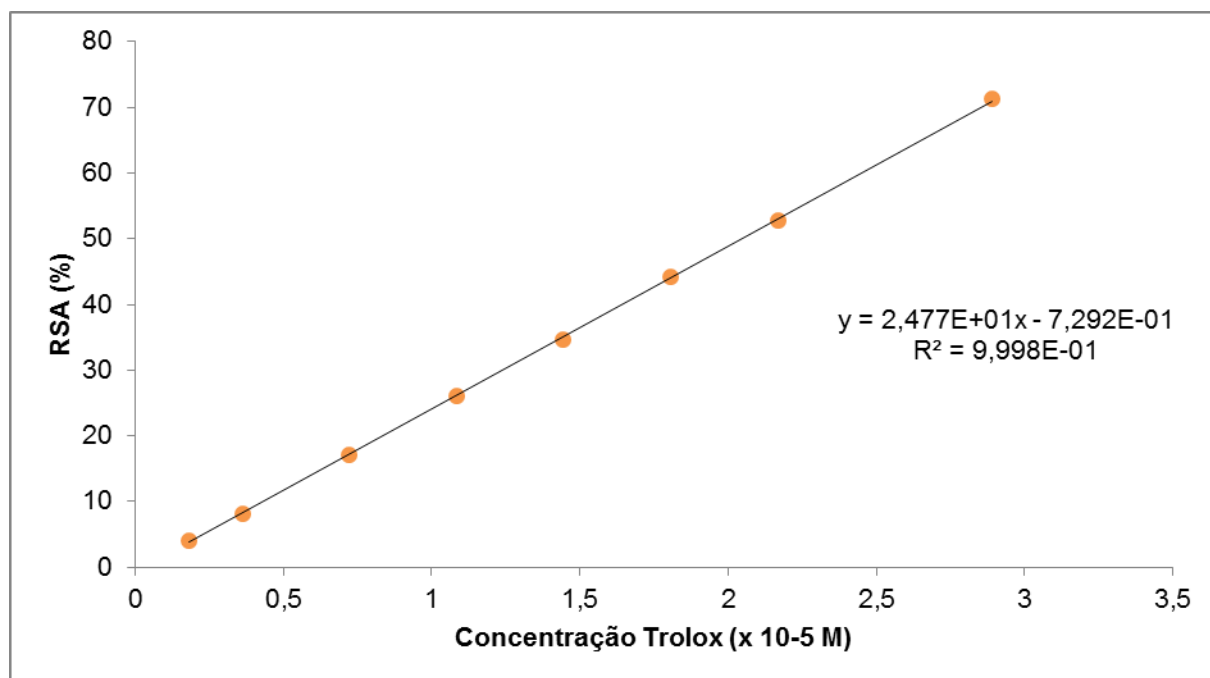
Anexo 1. Curva de Calibração com Ácido Gálico para o método Folin-Ciocalteu



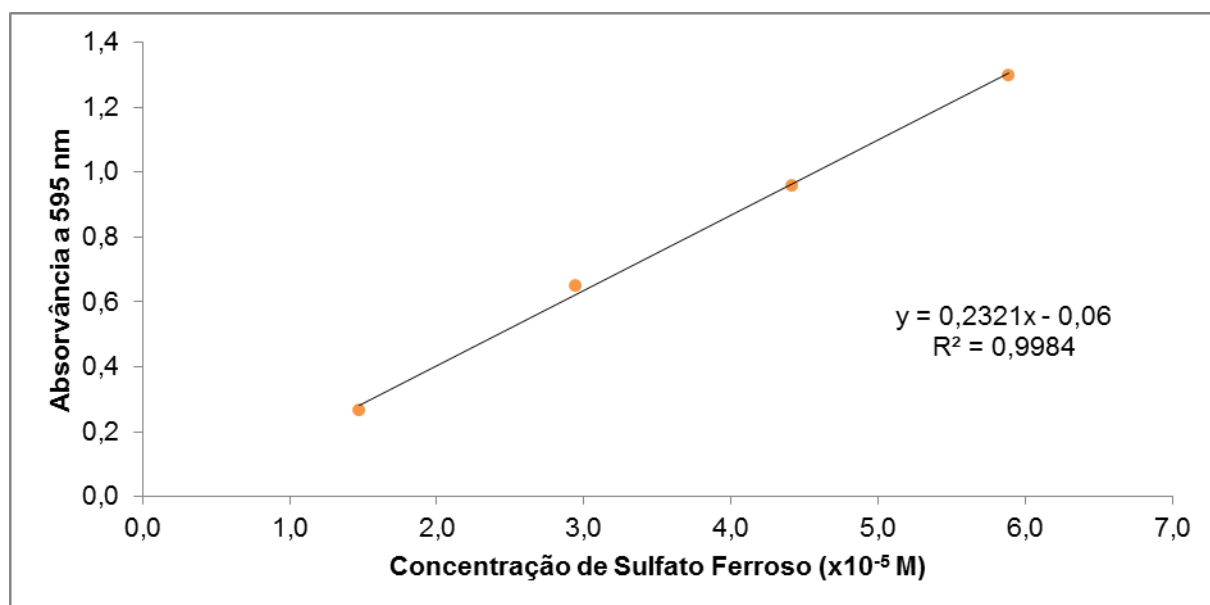
Anexo 2. Curva de Calibração com Ácido Gálico para o método directo

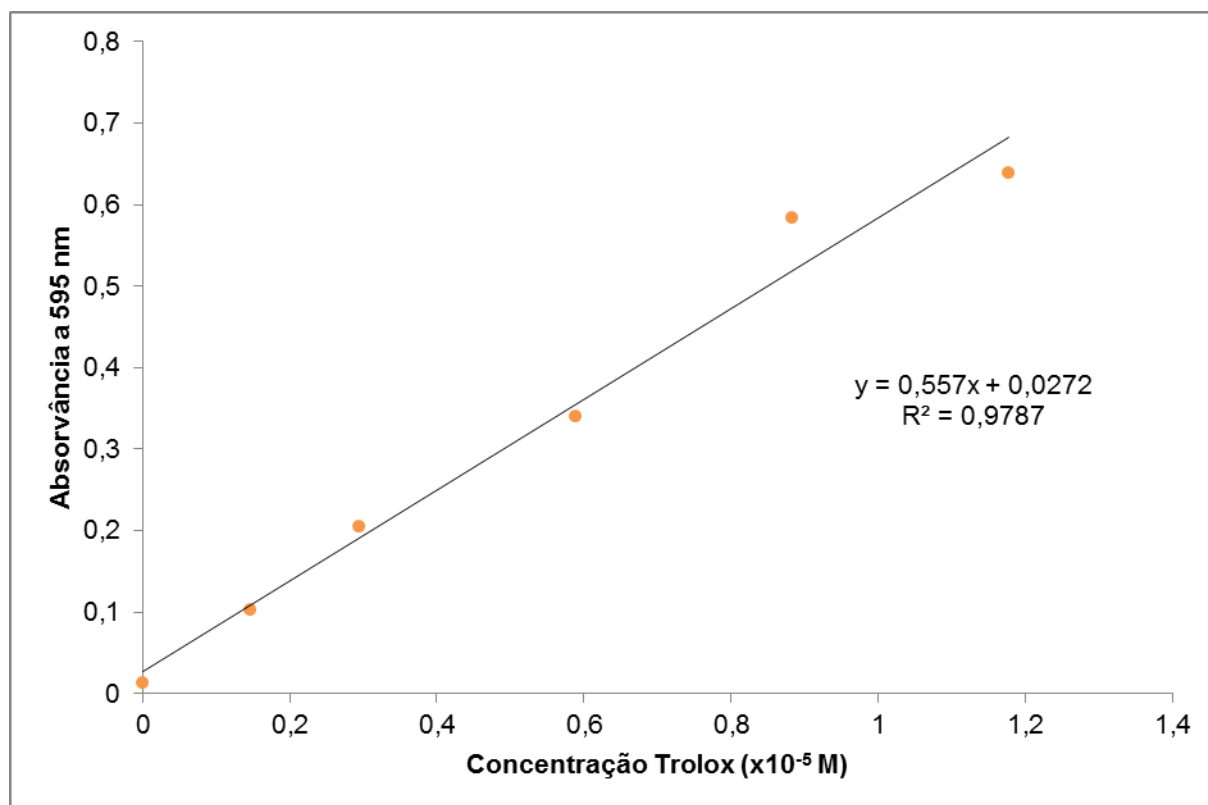
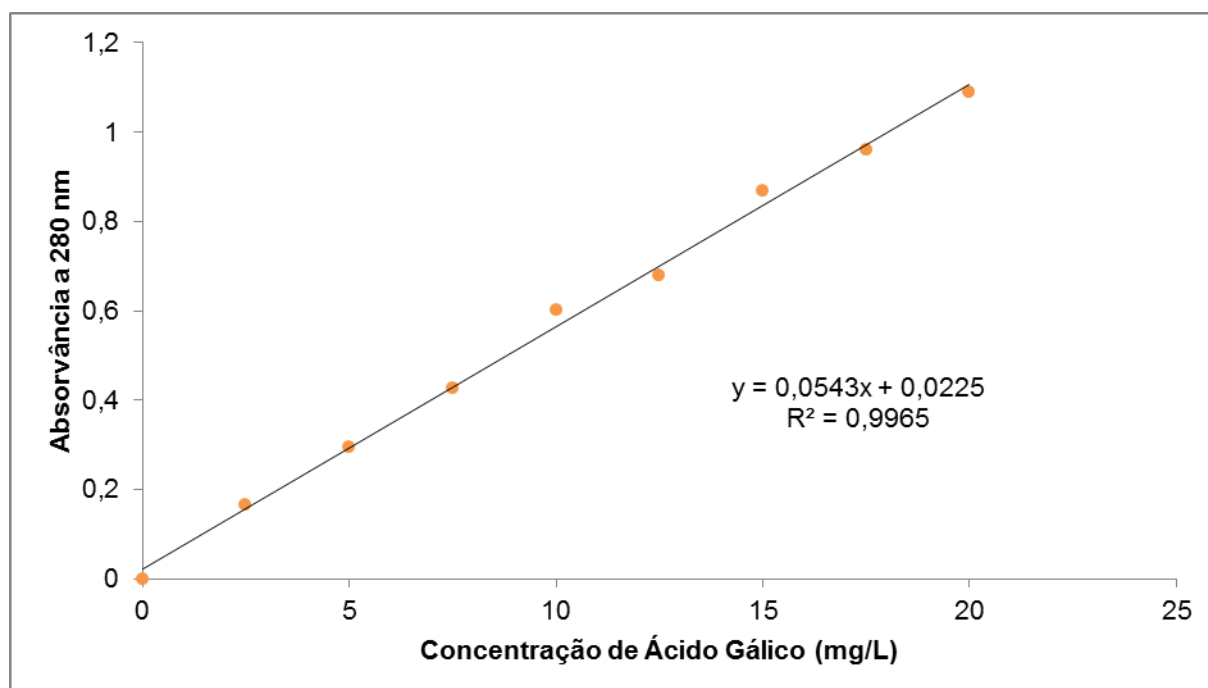


Anexo 3. Curva de Calibração com Trolox para o método DPPH

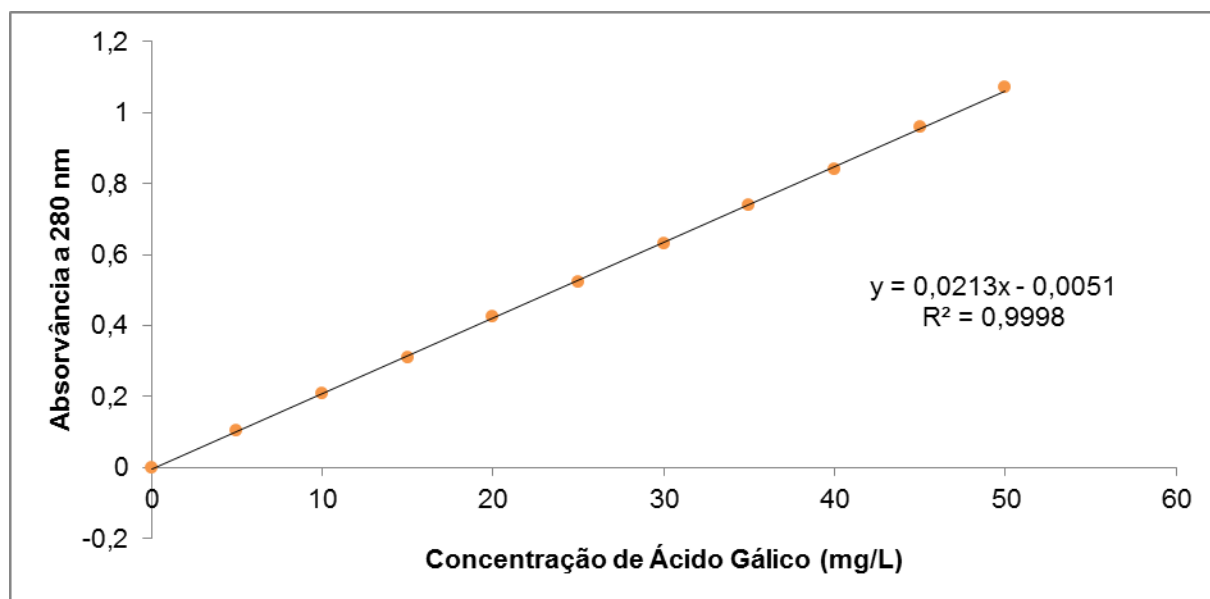


Anexo 4. Curva de Calibração com Sulfato Ferroso para o método FRAP

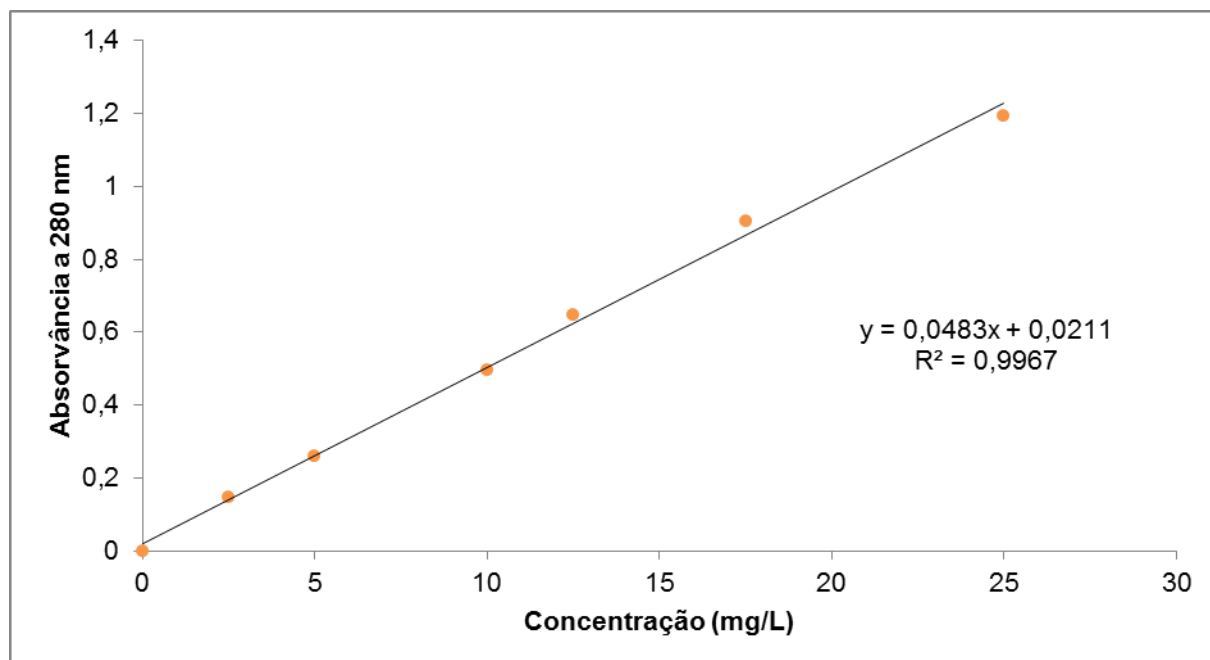


Anexo 5. Curva de Calibração com Trolox para o método FRAP**Anexo 6.** Curva de Calibração com Ácido Gálico para o Meio Ácido

Anexo 7. Curva de Calibração com Ácido Gálico para o Meio Neutro



Anexo 8. Curva de Calibração com Ácido Gálico para o Meio Ácido com Tripolifosfato



Anexo 9. Curva de Calibração com Ácido Gálico para o Meio Neutro com Tripolifosfato

