

Obtenção de encapsulado de própolis vermelha por coacervação complexa

Palavras-Chave: Própolis vermelha, gelatina, goma arábica, microencapsulação, spray-drying

Autores(as):

Rafael Magno Basilisco Torres, FCF - UNICAMP

Marluci Palazzoli da Silva Padilha (coautora), FEA - UNICAMP

Lívia Alves Barroso (coautora), FEA - UNICAMP

Vanessa Martins da Silva (coautora), FEA - UNICAMP

Prof^a. Dr^a. Miriam Dupas Hubinger (orientadora), FEA - UNICAMP

INTRODUÇÃO:

A própolis vermelha é uma dos treze tipos encontrados em território brasileiro, possuindo uma forte coloração vermelha característica e sendo encontrada nas regiões Norte e Nordeste do país. O seu teor de compostos fenólicos totais é o maior já determinado para própolis brasileiras de acordo com Alencar *et al* (2007), o que a torna interessante para aplicações em produtos alimentícios e farmacêuticos. A técnica de microencapsulação por coacervação complexa baseia-se na interação eletrostática entre biopolímeros e é muito aplicada para a proteção de compostos hidrofóbicos. Dessa maneira, a microencapsulação por coacervação complexa da própolis vermelha pode ser benéfica, pois mascara o sabor amargo e protege os compostos bioativos presentes nesta resina, melhorando a estabilidade e a vida útil dos produtos que a utilizam. Com isto em vista, o objetivo deste trabalho foi encapsular o extrato etanólico da própolis vermelha (EEPV) por coacervação complexa, secar os coacervados pela técnica de spray-drying e caracterizar os pós obtidos.

METODOLOGIA:

O EEPV utilizado foi adquirido comercialmente da marca Beeva (Marechal Deodoro, Brasil). Os materiais de parede, gelatina (bovina, pI 5.9) e goma arábica, foram obtidos das empresas Gelita (Cotia, Brasil) e Nexira (São Paulo, Brasil), respectivamente. O isolado da proteína do soro de leite (WPI), agente carreador usado para a secagem dos coacervados, foi gentilmente doado pela Vogler (São Bernardo do Campo, Brasil). O óleo de girassol foi adquirido no mercado local. Os outros reagentes foram adquiridos com grau analítico necessário para os experimentos.

Produção dos coacervados

Foram utilizadas duas estratégias para a microencapsulação do EEPV: (i) incorporação direta do EEPV nas soluções biopoliméricas, denominada “Método Direto - MD” (Nori *et al.*, 2011), e (ii) preparo de uma emulsão primária seguida de coacervação, denominada “Coacervado Emulsionado - CE” (Santos *et al.*, 2015).

No MD, prepararam-se soluções de gelatina e goma arábica a 2,5% (m/v), 100 mL cada, em proporção 1:1, utilizando 1,5 g de EEPV. O extrato foi homogeneizado com a gelatina em Ultraturrax® (7.000 rpm, 120 s) e, em seguida, adicionado à solução de goma arábica à 40°C sob agitação de

Tabela 1. Variáveis usadas nos testes de microencapsulação		
Teste	Método	pH
1	Método Direto	4,0
2	Método Direto	3,0
3	Método Direto	3,5
4	Coacervado Emulsionado	4,0
5	Coacervado Emulsionado	3,5
6	Coacervado Emulsionado	3,0

400 rpm. O pH foi ajustado para 4,0, 3,5 ou 3,0 com HCl 1 M. Por fim, adicionaram-se 400 mL de água Milli-Q e o sistema foi resfriado a 10°C em banho de gelo.

Na segunda estratégia, denominada CE, também foram realizados testes com três valores de pH (4,0; 3,5 e 3,0). Inicialmente, 5 g de EEPV foram misturados com água Milli-Q (1 g de própolis para 0,3 g de água) e, em seguida, adicionaram-se 10 g de óleo de girassol. A essa mistura, incorporou-se 0,008 g de Polirricinoleato de Poliglicerol (PGPR) por grama total e a emulsão primária foi homogeneizada em Ultraturrax® (12.000 rpm, 4 min). Posteriormente, essa emulsão foi adicionada à solução de gelatina 2,5% (m/v) na proporção de 3,3 g de emulsão para 100 mL de gelatina, sendo homogeneizada a 10.000 rpm por 3 min. Para a formação do coacervado, a solução de goma arábica 2,5% (m/v) foi adicionada em volume igual ao da gelatina utilizada, ajustando-se o pH para 4,0; 3,5 ou 3,0 com HCl 1 M. Após resfriamento a 10°C, amostras foram analisadas por microscopia óptica (10x) para determinar as condições ideais de microencapsulação, que foram pH 3,5 para o MD e pH 4,0 para o CE. Todas as variáveis usadas nos testes estão indicadas na Tabela 1.

Os coacervados foram secos por spray-drying (Buchi B-290, Suíça) em três condições: sem carreador, com WPI 0,63% e com WPI 1,25%, resultando em seis pós diferentes. O processo foi realizado com bico atomizador de 0,7 mm, vazão de ar de 35 m³/h, alimentação de 6 mL/min e temperatura de entrada de 180°C.

Caracterização dos pós

A atividade de água das amostras de pó de EEPV foi medida usando o Aqualab 4TE (Decagon Devices, Pullman, WA, EUA), com valores sendo expressos entre 0 e 1. Para o tamanho médio e distribuição de tamanho, foi feito uso do Mastersizer 2000 (Malvern Instruments, Malvern, UK), com etanol para a dispersão dos coacervados. Os parâmetros de cor das formulações de pó contendo EEPV foram avaliados utilizando a escala CIELab (L*, a*, b*) por meio de um colorímetro (MSEZ 1049, HunterLab, Reston-VA, EUA). No caso da higroscopicidade, pesou-se 1 g de cada pó em duplicata e depois eles foram armazenados em dessecador com solução saturada de NaCl 75% a 45°C. Pesagens semanais foram realizadas até que houvesse a estabilização. O cálculo da higroscopicidade se deu pela Equação 1 com o resultado expresso em porcentagem.

$$\text{Higroscopicidade (\%)} = \frac{\text{massa de água}}{\text{massa seca}} \times 100 \text{ (Equação 1)}$$

A morfologia das amostras foi analisada por MEV (Leo 440i, Inglaterra) com detector EDS, após fixação em fita de carbono e revestimento com ouro. As micrografias foram obtidas a 15 kV e ampliação de 5000×

Já para a parte de análises químicas, os teores de fenólicos totais presente nas microcápsulas e na superfície das mesmas foram quantificados para o cálculo eficiência de encapsulação (E.E.), por meio do método de Folin-Ciocalteu. Para a extração destes compostos bioativos pesou-se 0,1 g de amostra, misturando com 2,5 mL de solução de NaOH 0,1M e 5 mL de acetona acidificada. Os tubos foram agitados em vortex por 30 min a 2000 rpm em agitador Multi-reax (Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach, Alemanha) e depois centrifugados a 6600g por 5 min (Allegra X30-R, Beckman Coulter, EUA, CA). Para a superfície dos coacervados, foi feita uma lavagem com etanol 99,5% também homogeneizada em vórtex e centrifugada. Os sobrenadantes foram coletados para as análises. O cálculo da E.E. foi determinado pela Equação 2.

$$E.E. (\%) = \frac{\text{Fenólicos totais} - \text{Fenólicos de superfície}}{\text{Fenólicos totais}} \times 100 \text{ (Equação 2)}$$

A atividade antioxidante do EEPV e dos pós de própolis foi avaliada pelos métodos DPPH (Brand-Williams *et al.*, 1995; Melo *et al.*, 2015), ABTS (Re *et al.*, 1999; Al-Duais *et al.*, 2009) e FRAP (Benzie e Strain, 1996). As análises foram realizadas por espectrofotometria nos comprimentos de onda específicos após incubação com os reagentes de cada método.

RESULTADOS E DISCUSSÃO:

Nos testes 1 e 2, as micropartículas ficaram muito agregadas; nos testes 3 e 4, ficaram relativamente bem separadas; e, nos testes 5 e 6, formaram-se partículas muito pequenas com muitas bolhas de ar, indicando condições não ideais. Após a análise microscópica, verificou-se que os testes 3 e 4 apresentaram as melhores partículas em termos de morfologia.

A Figura 1 apresenta o aspecto dos pós e morfologia dos coacervados secos obtidos por spray-drying. As micrografias A, B e C referem-se aos coacervados preparados pelo MD (escala de 2 µm). A micrografia A mostra o coacervado controle, sem a adição de carreador, enquanto as micrografias B e C correspondem às amostras

adicionadas de proteína isolada do soro do leite (WPI) nas concentrações de 0,63% e 1,25%, respectivamente. Já as micrografias D, E e F apresentam os CE, sendo que a micrografia D representa a amostra controle, sem adição de carreador, e as micrografias E e F correspondem às amostras contendo WPI a 0,63% e 1,25%, respectivamente.

Após a secagem, observa-se que as partículas apresentaram formato predominantemente esférico. O MD resultou em partículas com superfícies mais lisas, embora a incorporação do agente carreador tenha promovido o surgimento de rugosidades. Por outro lado, as partículas obtidas por CE apresentaram maior rugosidade e colapso estrutural aparente, possivelmente devido às tensões superficiais geradas durante o processo.

A Tabela 2 apresenta os resultados dos parâmetros físicos dos pós. A atividade de água variou entre 0,22 e 0,28, sem diferença significativa entre os tratamentos. Todos os pós apresentaram a_w menor que 0,6, sendo microbiologicamente estáveis. Estes valores são menores que os obtidos por Lima (2020), que também produziu e caracterizou pós de EEPV comparando liofilização e spray-drying como técnicas de secagem e usando goma xantana, proteína isolada de soja (SPI) e WPI como agentes encapsulantes. Em relação aos parâmetros de cor das partículas, ela variou de vermelho claro a branco, o que pode ser observado pelos valores de L^* e a^* , que variaram de 68,58 a 85,10 e de 4,14 a 7,84. É possível perceber que a presença do WPI aumentou L^* e diminui o a^* , fazendo com que as amostras se afastassem do vermelho e ficassem mais brancas. Quanto à higroscopicidade, todas as amostras apresentaram grande potencial para adsorver água do ambiente, com valores variando entre 281,6% e 483%. Esses resultados indicam um comportamento altamente higroscópico, que pode impactar diretamente a estabilidade físico-química e funcional dos pós durante o armazenamento. Os materiais encapsulantes utilizados, como gelatina, goma arábica e WPI, são hidrofílicos, o que corrobora os elevados valores de higroscopicidade observados. Dessa forma, torna-se evidente a necessidade do uso de embalagens com barreira eficiente à umidade para garantir a estabilidade e a conservação dos pós.

A Tabela 3 apresenta a variação nos tamanhos médios das partículas. Percebe-se que nos MD, os tamanhos diminuíram com a presença do carreador, que pode ter deixado as partículas menos agregadas umas às outras. Este comportamento não é observado

quanto aos CEs, principalmente quando a maior quantidade de WPI foi usada e proporcionando o maior tamanho de partícula. Quanto à distribuição de tamanho, a Figura 2 apresenta os histogramas de todos os pós produzidos. É possível notar que, no caso do MD, a distribuição apresentou comportamentos unimodais, com variação entre 0,2 a 50 μm e sem carreador a variação nos tamanhos foi mais ampla, de 0,3 a 100 μm aproximadamente. Com relação aos CEs, eles apresentaram uma distribuição similar a bimodal, indo de 0,3 a 150 μm , com um segundo

Figura 1. Aspecto dos pós e morfologia dos coacervados secos por spray-drying.

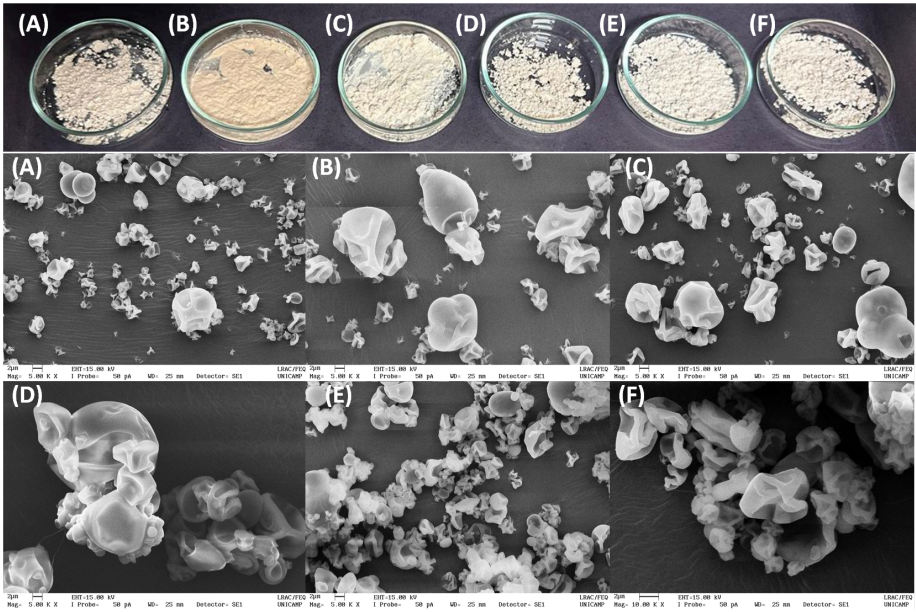


Tabela 2. Caracterização física dos pós de EEPV					
Amostra	a_w	Higroscopicidade (%)	L^*	a^*	b^*
MD-Controle	0,28±0,00	352,67±13,33	68,58±1,31	7,84±0,19	12,64±0,31
MD WPI 0,63%	0,23±0,00	309,46±18,47	78,17±0,79	5,25±0,02	9,30±0,01
MD WPI 1,25%	0,22±0,00	281,60±19,81	79,73±0,00	5,19±0,00	9,62±0,00
CE-Controle	0,22±0,01	483,10±63,71	74,45±1,33	7,03±0,13	13,70±1,13
CE WPI 0,63%	0,23±0,00	473,56±	85,10±1,62	4,14±0,10	8,86±0,32
CE WPI 1,25%	0,23±0,00	443,24±82,56	84,08±0,59	4,54±0,01	10,11±0,20

pico pequeno na faixa de 100 a 150 μm . O CE WPI 0,63% apresentou a maior das variações, indo de 0,2 a 500 μm .

Quanto às características químicas dos pós, mostradas na Tabela 4, é possível notar que a E.E. foi maior para aqueles produzidos pelo MD, variando de 62,86 a 90,52%. Quanto maior a quantidade de WPI, menor a eficiência e também o teor de fenólicos totais, o que indica uma interação deste carreador com os compostos bioativos da própolis vermelha. Estes resultados foram superiores aos apresentados por Lima (2020) e Nori *et al* (2011). No estudo de Santos *et al.* (2015), que microencapsularam xilitol usando a estratégia da produção de uma emulsão primária, os valores de eficiência de encapsulação (E.E.) variaram entre 31,42% e 71,93%. Os valores de E.E. obtidos nos coacervados emulsionados neste trabalho ficaram abaixo desses valores. É importante ressaltar que o extrato de própolis vermelha apresenta uma composição complexa, contendo compostos com diferentes coeficientes de partição. Dessa forma, alguns desses compostos podem não apresentar afinidade com a emulsão primária e, conseqüentemente, não terem sido encapsulados. Além disso, outro fator que pode ter influenciado é a proporção entre os materiais de núcleo e parede, afetando a eficiência do encapsulamento. Além disso, como o material de núcleo foi mantido constante e o WPI adicionado como material carreador, observou-se uma diluição no teor de fenólicos totais da formulação, refletida também na E.E., indicando que o uso do WPI pode impactar ambos os parâmetros.

A Figura 4 mostra que o EEPV apresentou maior atividade antioxidante do que os pós de própolis em todos os ensaios, devido à ausência de biopolímeros que possam interagir com os compostos fenólicos. Nos pós, a microencapsulação resultou em menor atividade antioxidante *in vitro*, possivelmente pela retenção dos compostos na matriz, o que pode favorecer sua proteção e liberação controlada. Sá *et al.* (2023) observaram atividades superiores ao encapsular EEPV por spray-drying e spray-chilling, o que pode ser explicado por diferenças na composição dos extratos, formulação das partículas e concentração de extrato. Além disso, os biopolímeros utilizados (gelatina, goma arábica e WPI) apresentaram leve atividade antioxidante própria. Os resultados de FRAP confirmaram a maior capacidade redutora do EEPV e a atividade nos pós, indicando que a encapsulação influencia a interação dos compostos bioativos com os radicais, podendo impactar na sua disponibilidade.

CONCLUSÕES:

Foram desenvolvidos pós de extrato etanólico de própolis vermelha (EEPV) por coacervação complexa seguida de spray-drying. Os pós apresentaram alta higroscopicidade, indicando necessidade de embalagens com barreira à umidade. A eficiência de encapsulamento foi maior no MD, sugerindo maior afinidade dos compostos fenólicos pelos materiais de parede do que pela emulsão. O estudo mostrou potencial para produção de pó de própolis para produtos de baixa umidade, como suplementos, cosméticos e alimentos secos.

Figura 2. Histograma da distribuição de tamanho dos pós

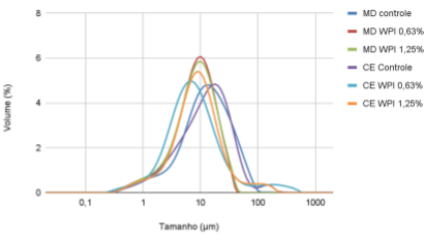
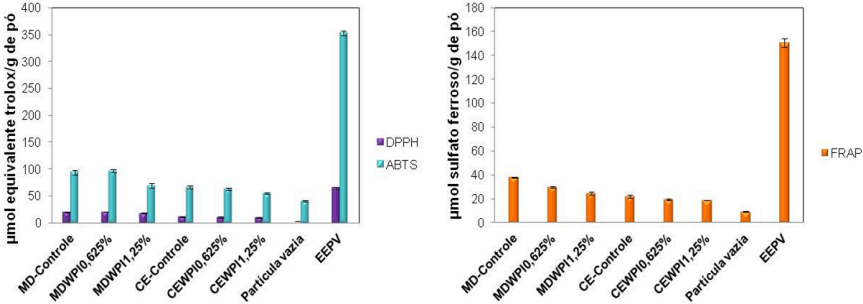


Tabela 3. Tamanho médio de partícula dos pós		
Amostra	D [4,3] (μm)	D [3,2] (μm)
MD controle	16,97 $\pm$ 1,74	5,73 $\pm$ 0,45
MD WPI 0,63%	9,89 $\pm$ 0,51	4,50 $\pm$ 0,19
MD WPI 1,25%	9,89 $\pm$ 0,25	4,43 $\pm$ 0,06
CE controle	17,98 $\pm$ 1,06	5,49 $\pm$ 0,26
CE WPI 0,63%	18,65 $\pm$ 1,46	4,00 $\pm$ 0,41
CE WPI 1,25%	59,93 $\pm$ 57,73	4,91 $\pm$ 0,35

Tabela 4. Caracterização química dos pós de EEPV

Amostra	Eficiência de Encapsulação (E.E.) (%)	Teor de fenólicos totais (mg AGE/g de pó)
MD-Controle	90,52 $\pm$ 0,07 ^a	28,14 $\pm$ 0,98 ^a
MD WPI 0,63%	80,83 $\pm$ 0,29 ^a	23,52 $\pm$ 0,88 ^a
MD WPI 1,25%	62,86 $\pm$ 2,25 ^a	20,09 $\pm$ 0,53 ^a
CE-Controle	19,28 $\pm$ 0,78 ^a	23,81 $\pm$ 0,33 ^a
CE WPI 0,63%	15,53 $\pm$ 1,20 ^a	19,05 $\pm$ 0,11 ^a
CE WPI 1,25%	12,63 $\pm$ 0,18 ^a	11,86 $\pm$ 0,11 ^a

Figura 4. Atividade antioxidante do EEPV e dos pós



BIBLIOGRAFIA

- ALDANA-MEJÍA, J.A. *et al.* A validated HPLC-UV method for the analysis of phenolic compounds in Brazilian red propolis and *Dalbergia ecastaphyllum*. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, [S.L.], v. 198, p. 114029, maio 2021.
- AL-DUAIS, M. *et al.* Antioxidant capacity and total phenolics of *Cyphostemma digitatum* before and after processing: use of different assays. **European food research and technology**, v. 228, n. 5, p. 813-821, 2009.
- ALENCAR, S.M. *et al.* Chemical composition and biological activity of a new type of Brazilian propolis: red propolis. **Journal Of Ethnopharmacology**, [S.L.], v. 113, n. 2, p. 278-283, set. 2007. Elsevier BV.
- BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M.E.; BERSET, C. L. W. T. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT-Food science and Technology**, v. 28, n. 1, p. 25-30, 1995.
- LIMA, T. M. C. **Obtenção de microcápsulas de extrato de própolis vermelha por coacervação complexa e atomização por pulverização (spray dryer)**. 2020. 59f. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação Stricto sensu Gestão e Tecnologia Industrial. Centro Universitário SENAI-CIMATEC, Salvador, 2020.
- MELO, P. S. *et al.* Winery by-products: Extraction optimization, phenolic composition and cytotoxic evaluation to act as a new source of scavenging of reactive oxygen species. **Food Chemistry**, v. 181, p. 160-169, 2015.
- NORI, M. P. *et al.* Microencapsulation of propolis extract by complex coacervation. **LWT - Food Science and Technology**, v. 44, n. 2, p. 429-435, 2011.
- RE, R. *et al.* Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free radical biology and medicine**, v. 26, n. 9-10, p. 1231-1237, 1999.
- SÁ, S. H. G. *et al.* Evaluation of the release, stability and antioxidant activity of Brazilian red propolis extract encapsulated by spray-drying, spray-chilling and using the combination of both techniques. **Food Research International**, v. 164, p. 112423, 2023.
- SANTOS, M. G. *et al.* Microencapsulation of xylitol by double emulsion followed by complex coacervation. **Food Chemistry**, v. 171, p. 32-39, mar. 2015.