



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE
ALIMENTOS

LIDIANA SOUZA CORREIA LIMA

EXTRATO DE PRÓPOLIS DE ABELHAS AFRICANIZADAS
MICROENCAPSULADO EM SORO DE LEITE COMO AGENTE ANTIOXIDANTE
EM MANTEIGA

FORTALEZA

2021

LIDIANA SOUZA CORREIA LIMA

EXTRATO DE PRÓPOLIS DE ABELHAS AFRICANIZADAS MICROENCAPSULADO
EM SORO DE LEITE COMO AGENTE ANTIOXIDANTE EM MANTEIGA

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciência e Tecnologia de Alimentos. Área de concentração: Tecnologia de Alimentos de Origem Animal.

Orientador: Profa. Dra. Juliane Doering Gasparin Carvalho
Co-orientador: Prof. Dr. Rinaldo dos Santos Araújo

FORTALEZA

2021

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- L698e Lima, Lidiana Souza Correia.
Extrato de própolis de abelhas africanizadas microencapsulado em soro de leite como agente antioxidante em manteiga / Lidiana Souza Correia Lima. – 2021.
101 f. : il. Color
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós- Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Fortaleza, 2021.
Orientação: Profa. Dra. Juliane Doering Gasparin
Carvalho Coorientação: Prof. Dr. Rinaldo dos Santos Araújo.
1. Própolis. 2. Antioxidante natural. 3. Spray dryer. 4. Compostos bioativos. 5. Manteiga. I.
Título.
-

LIDIANA SOUZA CORREIA LIMA

EXTRATO DE PRÓPOLIS DE ABELHAS AFRICANIZADAS MICROENCAPSULADO
EM SORO DE LEITE COMO AGENTE ANTIOXIDANTE EM MANTEIGA

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciência e Tecnologia de Alimentos. Área de concentração: Tecnologia de Alimentos de Origem Animal.

Aprovada em: 25 /10 / 2021.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dra. Juliane Doering Gasparin Carvalho (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Júlio Otávio Portela Pereira
Instituto Federal do Ceará (IFCE)

Profa. Dra. Luciana de Siqueira Oliveira
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Júlio Cesar Barbosa Rocha
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Marcos Rodrigues Amorim Afonso
Universidade Federal do Ceará (UFC)

A Deus.

Aos meus pais, Pedro e Mônica Correia.

Ao meu marido Cláudio Lima e aos meus
filhos, Cláudio Henrique (*In memoriam*),
José Bento e Davi Correia Lima.

AGRADECIMENTOS

À Nossa Senhora por proporcionar a mim saúde física, mental e financeira deixando-me apta para realizar e concluir este trabalho.

Ao meu marido que não mediu esforços para cuidar dos nossos filhos, de mim e do nosso lar empenhando-se exaustivamente em ajudar no que fosse necessário.

Aos meus pais Pedro e Mônica Correia, por todo apoio e carinho.

À profa. Dra. Juliane Carvalho, por ter acreditado no projeto que culminou no desenvolvimento desta pesquisa e por sua paciência no decorrer destes anos de orientação.

Ao prof. Dr. Rinaldo Araújo, por toda atenção dispensada, pela colaboração orientação nos desenvolvimentos experimentais desta tese.

À amiga profa. Dra. Georgia Maciel Dias de Moraes, IFCE *Campus* Sobral, pelas orientações na aplicação e interpretação da análise sensorial.

Ao prof. Jorge Alberto Fernandes, IFCE *Campus* Sobral, por ceder de seu apiário as própolis *in natura* utilizadas para o preparo dos extratos.

À Dra. Kaline Rodrigues Carvalho, pela contribuição em realizar as identificações químicas por CG-EM das amostras deste trabalho, com total dedicação e esmero.

Às amigas Delmira Rocha dos Santos Barbosa e Jaqueline Maria Marinho Lemos pelas reflexões, críticas e sugestões recebidas.

Ao apoio técnico do Laboratório de Tecnologia de Química (LTQ) do Instituto Federal do Ceará *Campus* Fortaleza, pois não tenho como mensurar todo carinho e atenção recebida por Tobias, Maisa, Manuela, Letícia, Lukas, Jackson, Monique e demais colegas.

Ao Laboratório de Combustíveis e Lubrificantes (LCL) da Universidade Federal do Ceará, nas pessoas de Giovania Vettorazzi e do prof. Dr. Célio Cavalcante pela realização das análises no equipamento Racimat.

Ao Laboratório Multiusuário de Química de Produtos Naturais da Embrapa Agroindústria Tropical na viabilização do experimento de CG-EM.

Aos funcionários, professores e demais colegas do IFCE que contribuíram durante minha licença para a conclusão deste trabalho.

À professora, amiga e companheira de jornada de doutorado, Luciana Cristina Bezerra, por ser sempre solícita e acolhedora.

Às laboratoristas queridas do Laboratório de Laticínios da UFC, Livia Machado e Gizele Almada por suas posturas de honra e brilho.

“Não sabendo que era impossível, foi lá e fez.”

Jean Cocteau.

RESUMO

Este estudo visa produzir e caracterizar pó de extrato de própolis encapsulado em soro de leite via processo de aspersão em *spray dryer* e avaliar o emprego do material obtido como um novo antioxidante natural em manteiga. A otimização do processo de secagem do extrato de própolis via planejamento fatorial mostrou uma temperatura ótima do ar de entrada de 172 °C e uma vazão de alimentação ótima de 5 mL.min⁻¹. As microcápsulas geradas apresentaram umidade, higroscopicidade e solubilidade que garantiram a boa estabilidade do pó produzido. A morfologia observada indica a formação de microcápsulas lisas e esféricas de diferentes tamanhos e sem fissuras. A alta eficiência da microencapsulação (83,7%) foi confirmada a partir dos valores de capacidade antioxidante para DPPH (1050,55 μmols Trolox·g⁻¹), ABTS (1220,57 μmols Trolox·g⁻¹) e FRAP (5712,5 μmols Trolox·g⁻¹) e pela presença de 36 compostos bioativos na composição final do pó. O estudo cinético de oxidação da manteiga adicionada de 100 ppm do pó de própolis microencapsulado em soro de leite comparado à amostra sem antioxidante mostrou redução de 68,9% na velocidade de formação de produtos primários de oxidação e de 34,3% de produtos secundários após 42 dias de armazenamento a 50 °C. Na presença de 100 ppm de BHT estas reduções foram de 61,1% e 29,1%, respectivamente. A estabilidade oxidativa pelo método Rancimat apresentou um período de indução de 1 h a mais para a amostra de pó de própolis encapsulado em soro de leite (100 ppm) em relação ao BHT (100 ppm) e mais de 5 h em relação à amostra controle (sem antioxidante). No teste sensorial triangular foram observadas diferenças significativas entre as manteigas controle e a adicionada de 100 ppm de pó de própolis numa proporção discriminadora de 30%. Em geral, os resultados obtidos confirmaram a viabilidade da obtenção do antioxidante natural a base de extrato de própolis encapsulado em soro de leite, o qual pode inibir a oxidação da manteiga durante seu tempo de consumo sem mudanças sensoriais perceptíveis.

Palavras-chave: própolis; antioxidante natural; *spray dryer*; compostos bioativos; manteiga.

ABSTRACT

This study aims to produce and characterize powder of propolis extract encapsulated in whey via spray dryer process and evaluate the use of the material obtained as a new natural antioxidant in butter. The drying optimization of the propolis extract by factorial design showed an optimal inlet air temperature of 172°C and an optimal feed flow of 5 mL.min⁻¹. The microcapsules obtained showed moisture, hygroscopicity and solubility that ensured the good stability of the powder produced. The morphology observed indicates the formation of smooth and spherical microcapsules of different sizes and without cracks. The high efficiency of microencapsulation (83.7%) was confirmed from the antioxidant capacity values at DPPH (1220.6 $\mu\text{mol Trolox}\cdot\text{g}^{-1}$), ABTS (1050.6 $\mu\text{mol Trolox}\cdot\text{g}^{-1}$) and FRAP (5712.5 $\mu\text{mol Trolox}\cdot\text{g}^{-1}$) and the presence of 36 bioactive compounds in the final composition of the powder. The kinetic study of the oxidation of butter added with 100 ppm of microencapsulated propolis powder in whey compared to the sample without antioxidant showed a reduction of 68.9% in the formation rate of primary oxidation products and 34.3% of secondary products after 42 days of storage at 50°C. In the presence of 100 ppm of BHT these reductions were 61.1% and 29.1%, respectively. Oxidative stability by the Rancimat method showed an induction period of 1 h longer for the whey encapsulated propolis powder sample (100 ppm) compared to BHT (100 ppm) and more than 5 h compared to the control sample (without antioxidant). In the sensory analysis, significant differences of 30% were observed between the control butter and the one added with 100 ppm of propolis powder. In general, the results obtained confirmed the feasibility of obtaining a natural antioxidant based on propolis extract encapsulated in whey, which can inhibit butter oxidation during its consumption time without noticeable sensory changes.

Keywords: propolis; natural antioxidant; spray dryer; bioactive compounds; butter.

LISTA DE FIGURAS

| | | |
|-----------|---|----|
| Figura 1 | – Representação gráfica de um spray dryer de escala laboratorial para obtenção das micropartículas por aspersão..... | 23 |
| Figura 2 | – (A) microcápsula: o agente ativo está envolvido pelo agente encapsulante e (B) microesfera: o agente ativo está distribuído em uma matriz polimérica..... | 24 |
| Figura 3 | – Esquema mostrando a oxidação de um ácido graxo poli-insaturado (AGP) e o papel dos compostos fenólicos (PP) na prevenção da oxidação de lipídios | 28 |
| Figura 4 | – Reação de hidrólise catalisada pela lipase | 34 |
| Figura 5 | – Esquema geral do mecanismo da oxidação lipídica..... | 35 |
| Figura 6 | – Descrição esquemática do Rancimat | 38 |
| Figura 7 | – Aplicação do teste triangular da manteiga adicionada de PPSL..... | 52 |
| Figura 8 | – Distribuição das amostras de manteigas (duas iguais e uma diferente) codificadas com números de três dígitos aleatórios..... | 53 |
| Figura 9 | – Superfícies de resposta para o rendimento em função da temperatura de entrada e da vazão de alimentação na obtenção do PPSL por <i>spray drying</i> | 57 |
| Figura 10 | – Distribuição de tamanho de partículas do PPSL obtido por secagem por aspersão em <i>spray dryer</i> | 63 |
| Figura 11 | – Potencial ζ do PPSL obtido por aspersão <i>spray drying</i> | 64 |
| Figura 12 | – Microfotografias de microscopia de luz de varredura das micropartículas carregadas com extrato de própolis..... | 65 |
| Figura 13 | – Espectros no infravermelho da própolis in natura (P), do soro de leite em pó (SL) e das microcápsulas de própolis encapsuladas em soro de leite (PPSL)..... | 66 |
| Figura 14 | – Cromatogramas LC-MS/MS das amostras de PPSL (A) e da própolis <i>in natura</i> (B)..... | 68 |

| | |
|--|----|
| Figura 15 – Cinética de ordem zero para índice de peróxido a temperatura de $50 \pm 3^\circ\text{C}$ para a oxidação da manteiga na presença dos diferentes antioxidantes testados..... | 74 |
| Figura 16 – Cinética de primeira ordem para TBARS a temperatura de $50 \pm 3^\circ\text{C}$ para a oxidação da manteiga na presença dos diferentes antioxidantes testados ... | 75 |
| Figura 17 – Perfil oxidativo a 110°C obtida nos ensaios de estabilidade pelo método de Rancimat para as amostras de manteigas contendo PPSL e BTH como antioxidantes | 77 |

LISTA DE TABELAS

| | | |
|-----------|---|----|
| Tabela 1 | – Domínio experimental das variáveis estudadas na encapsulação do extrato de própolis em soro de leite via aspersão <i>spray drying</i> | 41 |
| Tabela 2 | – Planejamento experimental com valores codificados e reais para processo de secagem por aspersão em secador <i>spray dryer</i> do extrato de própolis em soro de leite..... | 42 |
| Tabela 3 | – Resultados do planejamento fatorial para secagem por aspersão em secador <i>spray dryer</i> do extrato etanólico de própolis..... | 54 |
| Tabela 4 | – Efeito estimado, erro padrão, coeficiente e significância estatística, para cada fator no modelo codificado para o rendimento para obtenção do PPSL por secagem <i>spray drying</i> | 55 |
| Tabela 5 | – Análise de variância do modelo de regressão para o rendimento do PPSL obtido por secagem via <i>spray drying</i> | 56 |
| Tabela 6 | – Efeito estimado, erro padrão, coeficiente e significância estatística, para cada fator no modelo para a capacidade antioxidante do PPSL obtido por aspersão <i>spray drying</i> | 58 |
| Tabela 7 | – Análise de variância para a capacidade antioxidante do pó de própolis obtido por aspersão <i>spray drying</i> | 59 |
| Tabela 8 | – Ensaio de avaliação da capacidade antioxidante para a secagem por aspersão via <i>spray dryer</i> do extrato etanólico de própolis. $T_{ent} = 172\text{ }^{\circ}\text{C}$, $Q_{alim} = 5\text{ mL}\cdot\text{min}$ | 60 |
| Tabela 9 | – Propriedades físico-químicas do PPSL obtido em <i>spray dryer</i> | 61 |
| Tabela 10 | – Atividade antioxidante do PPSL após ruptura das microcápsulas | 70 |
| Tabela 11 | – Parâmetros cinéticos a $50 \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$ para a oxidação da manteiga na presença dos diferentes sistemas antioxidantes testados: antioxidante sintético (BHT) e antioxidante natural PPSL (pó de própolis microencapsulado em soro de leite) | 73 |

| | |
|--|-----|
| Tabela 12 – Parâmetros composicionais da manteiga natural e com a adição de antioxidante PPSL..... | 80 |
| Tabela 13 – Parâmetros analíticos e compostos bioativos determinados por LC..... | 95 |
| Tabela 14 – Número de julgadores necessários para teste triangular..... | 102 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|--------|---|
| ABTS | 2,2'-azino-bis (ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico) |
| ANOVA | Análise de variância |
| AOAC | <i>Association of Official Agricultural Chemists</i> |
| AOCS | <i>American Oil Chemist's Society</i> |
| BHT | Butil-hidróxi tolueno |
| CLUE | Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência |
| DPPH | 1,1-difenil-2 picrilhidrazil |
| EEP | Extrato etanólico de própolis |
| EMAR | Espectrometria de Massa de Alta Resolução |
| ERO's | Espécies reativas de oxigênio |
| FRAP | Poder antioxidante pela redução do ferro |
| IP | Índice de peróxido |
| MDA | Malondialdeído |
| OSI | Oil stability instrument |
| PPSL | Pó de extrato de própolis em soro de leite |
| TBA | Ácido tiobarbitúrico |
| TBARS | Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico |
| TBHQ | Terc-butil hidroquinona |
| TEP | 1,1,3,3-tetraetóxiopropano |
| TROLOX | Ácido 6-hidróxi-2,5,7,8-tetrametilchroman-2-carboxílico |
| UV | Ultravioleta |
| UV-VIS | Ultravioleta-visível |
| G | Força gravitacional |
| RPM | Rotação por minutos |

LISTA DE SÍMBOLOS

| | |
|-----------|---------------------|
| λ | Comprimento de onda |
| ζ | Potencial zeta |

SUMÁRIO

| | | |
|----------------|---|----|
| 1 | INTRODUÇÃO | 19 |
| 2 | OBJETIVO | 21 |
| 2.1 | Objetivo geral | 21 |
| 2.2 | Objetivos específicos | 21 |
| 3 | REVISÃO DE LITERATURA | 22 |
| 3.1 | Microencapsulação de alimentos | 22 |
| 3.1.1 | <i>Material de parede na microencapsulação</i> | 24 |
| 3.2 | Emprego de antioxidantes naturais em alimentos | 26 |
| 3.2.1 | <i>Mecanismo de ação dos antioxidantes</i> | 26 |
| 3.2.2 | <i>Própolis</i> | 28 |
| 3.2.2.1 | <i>Propriedade antioxidante das própolis</i> | 29 |
| 3.3 | Produto lácteo lipídico – manteiga | 31 |
| 3.4 | Processo de rancidez em alimentos gordurosos | 33 |
| 3.4.1 | <i>Rancificação hidrolítica</i> | 34 |
| 3.4.2 | <i>Rancificação oxidativa</i> | 35 |
| 3.4.3 | <i>Métodos de avaliação da inibição da oxidação lipídica</i> | 36 |
| 4 | MATERIAL E MÉTODOS | 39 |
| 4.1 | Matérias-primas | 39 |
| 4.2 | Purificação da própolis de abelhas africanizadas e preparo do extrato hidroalcolico | 39 |
| 4.3 | Estudo para seleção de agente encapsulante | 40 |
| 4.3.1 | <i>Delimitação experimental</i> | 40 |
| 4.3.2 | <i>Teste de validação para obtenção do pó de extrato de própolis de abelhas africanizadas em soro de leite (PPSL)</i> | 43 |
| 4.4 | Caracterização das propriedades físico-químicas e estruturais das microcápsulas | 43 |
| 4.4.1 | <i>Umidade</i> | 43 |
| 4.4.2 | <i>Higroscopicidade</i> | 43 |
| 4.4.3 | <i>Solubilidade</i> | 43 |
| 4.4.4 | <i>Aglomerção (grau de caking)</i> | 44 |
| 4.4.5 | <i>Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR-ATR)</i> | 44 |

| | | |
|---------|---|----|
| 4.4.6 | <i>Tamanho de partículas e potencial zeta</i> | 44 |
| 4.4.7 | <i>Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)</i> | 44 |
| 4.5 | Eficiência da microencapsulação | 45 |
| 4.5.1 | <i>Extração de compostos fenólicos não microencapsulados</i> | 45 |
| 4.5.2 | <i>Ruptura para liberação de compostos fenólicos retidos nas micropartículas</i> . | 45 |
| 4.6 | Determinação da atividade antioxidante das microcápsulas | 46 |
| 4.6.1 | <i>Atividade antioxidante total pelo método de captura do radical livre ABTS•+</i> | 46 |
| 4.6.2 | <i>Atividade antioxidante total pelo método de redução do ferro (FRAP)</i> | 46 |
| 4.6.3 | <i>Atividade antioxidante total pelo método de captura do radical livre DPPH...</i> | 47 |
| 4.6.4 | <i>Determinação de compostos fenólicos totais</i> | 47 |
| 4.7 | Identificação de compostos bioativos por cromatografia líquida (LC-ESI-QTOF-MS) | 47 |
| 4.7.1 | <i>Clean up das amostras</i> | 48 |
| 4.7.2 | <i>Análise cromatográfica</i> | 48 |
| 4.8 | Estudo da estabilidade oxidativa da manteiga adicionada de PPSL | 48 |
| 4.8.1 | <i>Índice de peróxido</i> | 49 |
| 4.8.2 | <i>Determinação do conteúdo de malonaldeído pelo método de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)</i> | 49 |
| 4.9 | Estudo cinético de degradação oxidativa da manteiga | 49 |
| 4.9.1 | <i>Modelo de ordem zero</i> | 50 |
| 4.9.2 | <i>Modelo de primeira ordem</i> | 50 |
| 4.10 | Rancimat | 50 |
| 4.11 | Avaliação da composição centesimal das manteigas | 51 |
| 4.12 | Avaliação da qualidade microbiológica das manteigas | 51 |
| 4.13 | Análise sensorial dos produtos elaborados | 51 |
| 4.14 | Análises estatísticas | 53 |
| 5 | RESULTADOS E DISCUSSÃO | 54 |
| 5.1 | Estudo para seleção de agente encapsulante | 54 |
| 5.1.1 | <i>Otimização da obtenção do pó de própolis microencapsulado em soro de leite</i> | 54 |
| 5.1.1.1 | <i>Influência da temperatura e vazão sobre o rendimento na produção do pó de própolis de abelhas africanizadas</i> | 55 |

| | | |
|---------|---|----|
| 5.1.1.2 | <i>Influência da temperatura e vazão sobre a atividade antioxidante do pó de extrato própolis de abelhas africanizadas</i> | 57 |
| 5.1.2 | <i>Teste de validação para obtenção do pó de extrato de própolis em soro de leite (PPSL)</i> | 59 |
| 5.2 | Avaliação das propriedades físico-químicas e estruturais do PPSL | 61 |
| 5.2.1 | <i>Caracterização físico-químicas do PPSL</i> | 61 |
| 5.2.2 | <i>Tamanho de partícula e potencial zeta</i> | 63 |
| 5.2.3 | <i>Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)</i> | 65 |
| 5.2.4 | <i>Espectroscopia no infravermelho (FTIR)</i> | 66 |
| 5.3 | Identificação dos compostos bioativos | 68 |
| 5.4 | Avaliação da eficiência da encapsulação e da atividade antioxidante | 70 |
| 5.5 | Estudos de estabilidade oxidativa em manteiga | 72 |
| 5.5.1 | <i>Estudo cinético da degradação lipídica</i> | 72 |
| 5.6 | Oxidação rancimat | 77 |
| 5.7 | Caracterização físico-químicas e microbiológicas das manteigas | 79 |
| 5.8 | Análise sensorial | 80 |
| 6 | CONCLUSÕES | 82 |
| | REFERÊNCIAS | 83 |
| | APÊNDICE A – MODELO DO TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE) UTILIZADA PARA APLICAÇÃO DO TESTE SENSORIAL | 93 |
| | APÊNDICE B – MODELO DE FICHA UTILIZADA PARA APLICAÇÃO DO TESTE TRIANGULAR | 94 |
| | APÊNDICE C - TABELA 13 - PARÂMETROS ANALÍTICOS E COMPOSTOS BIOATIVOS DETERMINADOS POR LC-MS/MS PARA AS AMOSTRAS DE PRÓPOLIS IN NATURA E ENCAPSULADA EM SORO DE LEITE (PPSL) | 95 |
| | APÊNDICE D - PROPOSTA DE FRAGMENTAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS KAEMPFEROL DERIVADO COM PICOS DE NÚMEROS 1, 3 E 4 NA CARACTERIZAÇÃO LC-ESI-QTOF/MS DE COMPOSTOS POLIFENÓLICOS DE PPSL E PRÓPOLIS IN NATURA | 99 |

| | |
|---|------------|
| ANEXO A - NÚMERO DE JULGADORES NECESSÁRIOS PARA TESTE TRIANGULAR | 102 |
|---|------------|

1 INTRODUÇÃO

A estabilidade dos alimentos frente às reações oxidativas é essencial para controle do desenvolvimento de sabores indesejáveis, garante maior tempo de consumo, redução das perdas sensoriais e nutricionais e da formação de compostos nos alimentos que podem ser prejudiciais à saúde. Sendo a incorporação de antioxidantes uma alternativa em retardar a oxidação dos lipídios em alimentos.

A utilização de tecnologias emergentes como *spray dryer*, ultrassom, liofilização dentre outras na indústria de laticínios aumentou para atender à demanda e expectativas dos consumidores e do mercado global por novos produtos. Os derivados lácteos são suscetíveis a deteriorações lipídicas durante o processamento e armazenamento. A manteiga é particularmente um dos produtos mais atingidos devido seu alto teor de ácidos graxos, incluindo os insaturados. É o segundo maior produto derivado do leite comercialmente valioso.

Rica em ácidos graxos essenciais, a manteiga é uma emulsão do tipo água em óleo com propriedade reológica complexa e o teor mínimo de gordura de 80%. A manteiga possui longo período de armazenamento, contudo, o seu odor e sabor podem mudar devido às reações de deterioração química e bioquímicas causadas pela lipólise e oxidação dos ácidos graxos, as quais prejudicam também a qualidade nutricional e criam problemas e perdas econômicas nas indústrias de laticínios.

O processo de rancificação em manteigas é ocasionada por reações hidrolíticas, catalisado por lipases. As lipases hidrolisam os triacilgliceróis a diglicerídeos e monoglicerídeos resultando em glicerol e ácidos graxos livres (AGL). O armazenamento sob refrigeração inibe as alterações microbianas, mas não impedem totalmente as reações químicas que ocorrem devido a auto-oxidação.

Os antioxidantes sintéticos são amplamente utilizados em alimentos gordurosos para evitar a rancidez. No entanto, existem discussões constantes sobre a possível toxicidade desses produtos químicos utilizados. Neste sentido, os antioxidantes naturais estão sendo estudados como alternativas em substituição aos sintéticos, visto a demanda crescente de consumidores por produtos alimentícios contendo aditivos naturais.

A própolis é um produto apícola produzido a partir de material coletado de flores e exsudados de plantas. Em geral, seu conteúdo elevado em compostos fenólicos propicia potencial uso como conservante de alimentos, devido à atividade antimicrobiana e sequestrante de radicais livres, apresentando vantagens por ser composto natural e reconhecido como seguro.

A adição direta dos extratos de própolis aos alimentos ainda é restrita devido apresentarem o aspecto resinoso, sabor amargo e aroma forte, os quais podem alterar as características sensoriais dos alimentos. A encapsulação pode ser utilizada para minimizar o impacto sensorial e proteger os compostos bioativos presentes no extrato de própolis, tornando viável à utilização desse produto como aditivo alimentar natural.

Na microencapsulação são utilizados polissacarídeos (amidos, dextrose e gomas) e proteínas (soro de leite e gelatina) como matrizes encapsulantes na proteção dos bioativos durante o processamento. É de fundamental importância a seleção do material adequado, pois isso influenciará na minimização de perdas e no aumento de eficiência do processo.

O soro de leite é uma das opções de material a ser utilizado como matriz encapsulante, por sua rica composição nutricional, capacidades emulsificante e de retenção de compostos voláteis. O uso tecnológico deste subproduto reduz o impacto ambiental, considerado o elevado volume de produção e descartes irregulares de laticínios.

A literatura é ainda muito limitada no tangente ao uso de antioxidantes naturais, considerando-se o extrato de própolis como oportunidade promissora para a estabilização oxidativa de alimentos microencapsulados em soro de leite.

Neste contexto, esta pesquisa se propõe a avaliar o efeito do extrato etanólico de própolis de abelhas africanizadas microencapsulado em matriz de soro de leite sobre a estabilidade oxidativa de manteiga, visando uso como antioxidante natural e contribuindo para o aumento do tempo de vida útil deste produto lácteo.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Desenvolver e caracterizar microcápsulas de extrato etanólico de própolis de abelhas africanizadas utilizando soro de leite como encapsulante e avaliar seu efeito como potencial antioxidante natural em manteiga.

2.2 Objetivos específicos

- Investigar se o soro de leite utilizado como matriz de microcápsulas do extrato de própolis de abelhas africanizadas altera as propriedades morfológicas, físico-químicas e bioativas das microcápsulas produzidas por processo de secagem por aspersão em sistema *spray dryer*.
- Avaliar se as microcápsulas de extrato de própolis de abelhas africanizadas retardarão a degradação lipídica em manteiga quando comparadas ao antioxidante sintético BHT, sob condições de oxidação acelerada.
- Avaliar o efeito das microcápsulas de própolis nas características físico-químicas e sensoriais da manteiga.

3 REVISÃO DE LITERATURA

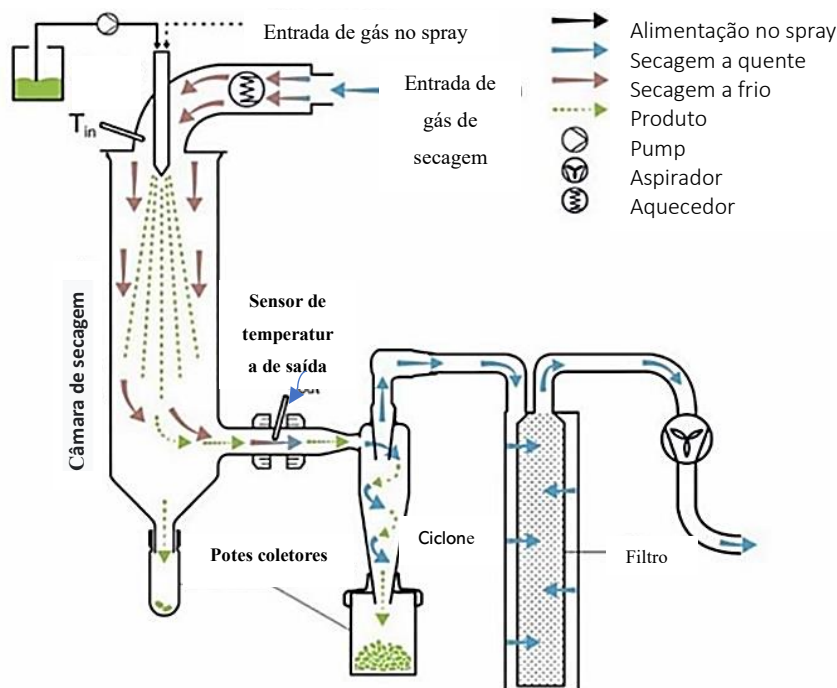
3.1 Microencapsulação de alimentos

A microencapsulação é um processo de empacotamento de materiais sólidos, líquidos ou gasosos em microcápsulas e está associada à modificação da liberação de princípios ativos, como fármacos, corantes, aromatizantes dentre outros, de modo a liberar o conteúdo de forma controlada e sob condições específicas. Na indústria de alimentos é utilizada para incluir compostos bioativos em sistemas alimentares, proteger produtos de condições ambientais como umidade, oxigênio, luz, radicais livres e vida útil prolongada (BAYSAN et al., 2021; NORI et al. 2011; RAY; RAYCHAUDHURI; CHAKRABORTY, 2016).

Existem diferentes métodos de encapsulação na indústria de alimentos. Os métodos de encapsulação mais comuns são *spray* e liofilização. O processo de secagem por aspersão é o preferido por ser um método de encapsulação de baixo custo e alta eficiência, enquanto a liofilização é geralmente preferida à adequação para secagem de compostos sensíveis ao calor (BAYSAN et al. 2021).

A secagem por aspersão em secador *spray dryer* (FIGURA 1) é um método consolidado na preparação de microcápsulas em pó por apresentar única etapa, garantir produção contínua, fácil adaptação para escala industrial, alta eficiência de encapsulação e apresentar microcápsulas em forma esférica, uniformes na taxa de liberação do fármaco com total evaporação do solvente orgânico. Considerado como método importante para estabilização de fitoquímicos por proporcionar pós fluidos de fácil armazenamento, manuseio e dosagem para o produto final (REZAUL et al., 2017; DIAS; FERREIRA; BARREIRO, 2015; ÖZKAN; BILEK, 2014). SAMBORSKA et al., 2021).

Figura 1 - Representação gráfica de um *spray dryer* de escala laboratorial para obtenção das micropartículas por aspersão.



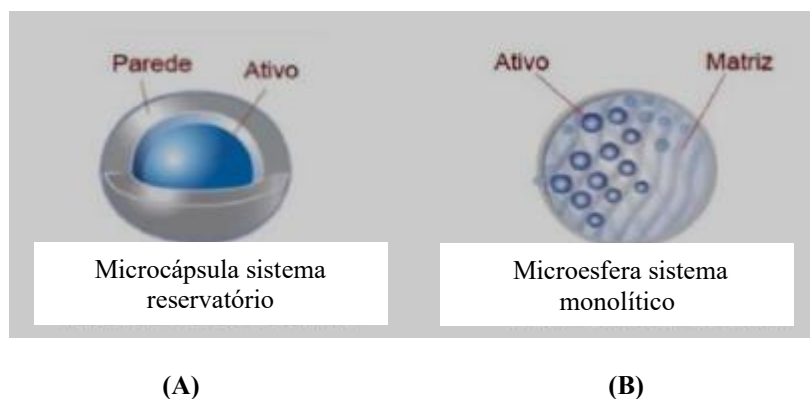
Fonte: Arpagaus et al. (2018) com adaptações.

As etapas do processo de secagem por aspersão são basicamente (1) aquecimento do gás de secagem, (2) geração de gotículas, (3) secagem das gotículas e (4) captação das partículas. Na representação gráfica do aparelho de mini *spray dryer* (FIGURA 2), pode-se observar o fluxograma, primeiro, há o bombeamento da solução de alimentação até a câmara de secagem onde há um bico atomizador (ARPAGAUS et al., 2018). O bico apresenta um orifício de diâmetro muito pequeno, produzindo uma grande área superficial e alta pressão, gerando gotículas líquidas que ao entrarem em contato com o ar quente, ocorre a evaporação da água e transformam-se em gotículas sólidas (pó seco). As gotículas sólidas mais densas são coletadas na câmara de secagem e as menos densas são encaminhadas juntamente com o ar quente até o sistema de separação pó – ar (ciclone), onde são coletadas e o ar é direcionado para um filtro (ARPAGAUS et al., 2018; DAVIS et al., 2018)

Os produtos formados no *spray dryer* são subdivididos segundo a sua estrutura em microesferas e microcápsulas (Figura 2). As microesferas são partículas compactas constituídas por uma rede polimérica, na qual a substância ativa se encontra distribuída no seu estado sólido ou molecular. Já as microcápsulas, são constituídas por um núcleo interno contendo o agente ativo recoberto por uma camada de polímero de espessura variável. A substância que contém o agente ativo é chamada de revestimento, membrana, casca, cápsula e material de parede. Sua classificação é dada pelo tamanho: nanopartículas ou micropartículas, variando de 0,01 a 0,2

μm e de 1 a 100 μm . Acima de 100 μm são denominadas de macropartículas (SAIFULLAH, et al., 2019; JIA; DUMONT; ORSAT, 2016).

Figura 2 - (A) microcápsula: o agente ativo está envolvido pelo agente encapsulante e (B) microesfera: o agente ativo está distribuído em uma matriz polimérica.



Fonte: FIB (2013) com adaptações.

Os materiais de parede mais usados na microencapsulação incluem goma arábica, maltodextrinas, amidos e misturas modificados, isolados e concentrados de proteínas, como proteína de soro de leite e proteína de soja (MAQSOU DLOU et al., 2020). Com o produto final em pó, irá facilitar sua manipulação, transporte e adição em formulações, solucionando limitações no emprego de ingredientes alimentícios, pois a barreira formada entre o composto ativo e o ambiente externo (por meio das propriedades hidrófilas ou hidrófobas) protege o composto contra umidade, oxigênio, luz e protege o contato com outros componentes presentes na formulação de produtos ou, por exemplo, em uma difusão controlada do composto encapsulado (DI BATTISTA et al., 2015), contribuindo também na eficiência de liberação controlada (COSTA, 2013).

3.1.1 Material de parede na microencapsulação

O processo de secagem por aspersão em *spray dryer* é preferido como um método de encapsulação devido ao baixo custo e alta eficiência (BAYSAN et al., 2021), sendo um dos principais passos no processo de microencapsulação a seleção do material de parede que podem ser utilizados sozinhos ou em combinação e a composição ideal é definida para cada processo em particular (FERNANDES; CANDIDO; OLIVEIRA, 2012).

A escolha dependerá da solubilidade do composto bioativo de interesse. Um material de parede comumente usados para compostos bioativos lipossolúveis é a goma arábica

e, para compostos hidrossolúveis, é a maltodextrina (RAMAKRISHNAN et al., 2018). Os polissacarídeos (amidos, dextrose e gomas) e proteínas (soro de leite, gelatina e quitosana) também são utilizados na formação de matriz encapsulante, onde cada material possui suas vantagens e desvantagens (GARCIA, 2013; LÓPEZ-RUBIO; LAGARON, 2012).

O material ideal deve ser escolhido de modo a manter a eficiência da encapsulação e a estabilidade da microcápsula, devendo apresentar características como: 1) boas propriedades reológicas e facilidade de trabalho; 2) capacidade de dispersar ou emulsionar o material ativo; 3) não ter reatividade química com os materiais do núcleo ativo a serem encapsulados; 4) capacidade de selar e manter o material ativo dentro de sua estrutura durante o processamento ou armazenamento; 5) capacidade de liberar completamente o solvente ou outros materiais utilizados durante o processo de encapsulação em condições de secagem; 6) capacidade de fornecer proteção ao material ativo contra condições ambientais (oxigênio, calor, luz e umidade) além de que a solubilidade do solvente deve ser aceitável para a indústria de alimentos como por exemplo, água ou etanol (RAY; RAYCHAUDHURI; CHAKRABORTY, 2016).

Conforme Gharsallaoui et al. (2007), as proteínas mais utilizadas para encapsular ingredientes alimentares através de secagem por aspersão em *spray dryer* são as do soro de leite e as da gelatina por possuírem as propriedades funcionais necessárias como material de parede. Esse fato se dá devido à conformação molecular, a alta difusividade e as características anfífilas fortes das caseínas individuais que permitem melhor distribuição em torno do encapsulado, superfície de glóbulos de gordura e das micelas proteicas no leite.

O soro de leite é o líquido obtido a partir da coagulação do leite destinado à fabricação de queijos ou de caseína (BRASIL, 2020). É um co-produto relevante à indústria de laticínios, tendo em vista o volume produzido e sua composição. Em média, de 90% a 95% do volume do leite é soro, nele se retêm aproximadamente 55% dos nutrientes do leite, sendo os mais abundantes a lactose (4,5-5,0% m/v), as proteínas solúveis (0,6-0,8% m/v), os lipídios (0,4-0,5% m/v) e sais minerais (8,0-10,0% m/v) (COSTA, 2013).

Com elevada produção de soro nas indústrias de laticínios, a transformação desse co-produto em derivados do leite e outros alimentos diminuiu gastos com o tratamento de efluentes, contribuiu para a melhoria do meio ambiente e proporcionou ganhos às indústrias. Identificar alternativas para o aproveitamento adequado do soro de leite é fundamental para valorização de suas características nutricionais, tecnológicas e funcionais, devido ao seu volume e poder poluente (BARRETO et al., 2015).

As proteínas do soro na forma de concentrado proteico de soro (CPS) ou ainda isolado proteico de soro (IPS) têm sido usadas na microencapsulação de probióticos (DE

CASTRO-CISLAGHI; FRITZEN-FREIRE; SANT'ANNA, 2012). Elas se mostram como materiais promissores no desenvolvimento de emulsões para encapsulação de diferentes compostos, uma vez que apresentam um bom potencial emulsificante, além de apresentar propriedades físico-químicas de grande interesse tecnológico, como na formação de partículas e de filmes comestíveis e biodegradáveis. Também por se apresentarem como agentes encapsulantes versáteis que podem ser usados isoladamente ou em combinação com outros materiais (ZHAO; SHEN; GUO, 2018; AUGUSTIN; OLIVER, 2014)

Os principais efeitos do soro como agregação, desnaturação e formação de gel estão ligados à temperatura, destacando-se os aspectos relacionados à solubilidade das proteínas e a capacidade de formação de emulsões que servem de bases tecnológicas para a indústria de alimentos (ANDRADE, 2013). Essas proteínas criam partículas coloidais altamente hidratadas, ou seja, "estrutura semelhante à caseína micelar", que contam como matrizes transportadoras eficazes para a encapsulação de diferentes fitoquímicos bioativos, principalmente os hidrofóbicos (SAMBORSKA et al., 2021).

3.2 Emprego de antioxidantes naturais em alimentos

3.2.1 Mecanismo de ação dos antioxidantes

Não existe uma definição uniforme para antioxidante, pois há diversos mecanismos químicos pelos quais a oxidação pode ser inibida. Os mecanismos antioxidantes dos compostos que são usados para aumentar a estabilidade oxidativa de alimentos incluem o controle ou agentes de defesa contra radicais livres, que são produzidos naturalmente em organismos aeróbicos durante o metabolismo celular, por pró-oxidantes e intermediários da oxidação (DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010; CALEGARI et al., 2020).

De acordo com Ramalho e Jorge (2006) são requisitos necessários na seleção de antioxidantes para aplicação em alimentos: ausência de efeitos indesejáveis sensoriais, compatibilidade e fácil aplicação no produto desejado; estabilidade nas condições de processo e armazenamento. Os antioxidantes não podem ser tóxicos, mesmo em doses muito maiores das que normalmente seriam adicionadas no alimento e devem apresentar eficácia em baixas concentrações (0,001 a 0,01%). Além disso, os antioxidantes devem possuir legislação específica e ter custo acessível.

Calegari et al. (2020) citam a crescente tendência ao uso de antioxidantes de origem natural, dentre os quais estão geleia real, a própolis, o orégano, extratos de chá, e algumas

plantas que aparecem como uma opção de reduzir os efeitos adversos associados aos sintéticos.

Alguns estudos toxicológicos citam os inibidores sintéticos de oxidação amplamente utilizados: hidroxitolueno butilado (BHT) e hidroxianisol butilado (BHA) na promoção do desenvolvimento de células cancerígenas em ratos. Devido aos efeitos cancerígenos dos antioxidantes sintéticos, o interesse pelos antioxidantes naturais aumentou, em particular, em ervas e especiarias como fontes inofensivas para a obtenção de antioxidantes naturais (AYDIN; KAHYAOĞLU, 2019; MARINOVA, 2007).

Os antioxidantes podem ser classificados em primários, sinergistas, removedores de oxigênio, biológicos, agentes quelantes e antioxidantes mistos. Os primários são compostos fenólicos que promovem a remoção ou inativação dos radicais livres formados durante a iniciação ou propagação da reação, através da doação de átomos de hidrogênio a estas moléculas, interrompendo a reação em cadeia. Os antioxidantes mistos incluem compostos de plantas e animais que têm sido amplamente estudados como antioxidantes em alimentos. Entre eles estão várias proteínas hidrolisadas, flavonoides e derivados de ácido cinâmico (ácido caféico) (RAMALHO; JORGE, 2006).

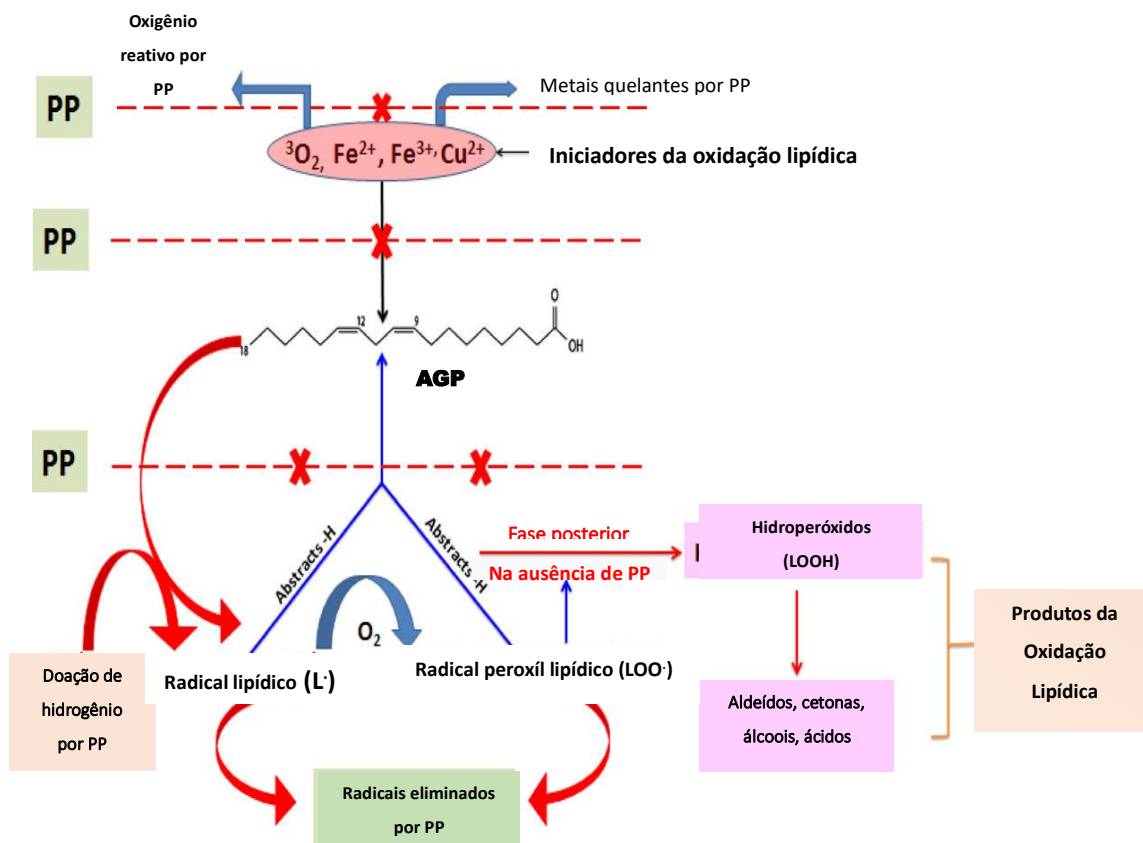
A neutralização da oxidação pode ocorrer por duas maneiras diferentes, protegendo os lípidios alvo dos iniciadores da oxidação ou paralisando a fase de propagação. No primeiro caso, os chamados antioxidantes preventivos dificultam a formação de radicais livres ou eliminam as espécies responsáveis pelo início da oxidação. No segundo caso, os chamados antioxidantes de 'quebra de cadeia' interceptam propagadores de radical da oxidação ou participam indiretamente na interrupção da propagação da reação em cadeia. No entanto, geralmente os antioxidantes agem através de mecanismos mistos que combinam diferentes tipos de oxidação (LAGUERRE; LECOMTE; VILLENEUVE, 2007)

Cada sequestrante de radicais livres (SRL) ou antioxidante, é capaz de inativar pelo menos dois radicais livres, sendo que o primeiro é desativado quando o SRL interage com radicais peroxil ou alcooxil, e o segundo quando o SRL^{\bullet} entra em reação de terminação com outro SRL^{\bullet} ou radical lipídico. Os compostos fenólicos possuem muitas propriedades de SRL eficientes. Eles doam um hidrogênio de seus grupos hidroxil, sendo que o radical fenólico subsequente pode apresentar baixa energia, pois o radical é deslocalizado ao longo da estrutura do anel fenólico. (BOBBIO; BOBBIO, 1984; DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010).

Entre os compostos fenólicos encontrados nas plantas, os flavonoides são a classe de polifenóis mais amplamente estudada em relação às suas atividades antioxidantes e biológicas. A atividade antioxidante, *in vitro*, é capaz de eliminar uma grande variedade de espécies reativas de oxigênio (ERO) e espécies reativas de nitrogênio (ERN). Assim, a doação

rápida de um átomo de hidrogênio a radicais lipídicos por esses antioxidantes fenólicos pode ser uma das formas de impedir a oxidação lipídica (Figura 3). Nesse sentido, os antioxidantes fenólicos são doadores excepcionais de hidrogênio ou elétrons (BONIN et al., 2020; MAQSOOD et al., 2014; RIVERO-CRUZ et al., 2020; ZUCCOLOTTO et al., 2019).

Figura 3 - Esquema mostrando a oxidação de um ácido graxo poli-insaturado (AGP) e o papel dos compostos fenólicos (PP) na prevenção da oxidação de lipídios.



Fonte: Maqsood et al. (2014) com adaptações.

3.2.2 Própolis

A própolis, também chamada de cola de abelha, é uma substância resinosa produzida por abelhas a partir de brotos e exsudatos de plantas selecionadas. Depois de coletado, o material é biotransformado, enriquecido pela adição de cera e secreções salivares e enzimáticas da própria abelha (BRASIL, 2001). Etimologicamente, o termo “própolis” é de origem grega: “pro” significa “na frente de / para” e “polis” significa “cidade”, ou seja, na frente (ou para defesa) da cidade, ou em defesa da colmeia.

Para as abelhas, a própolis é utilizada para selar buracos e rachaduras na colmeia e nos favos de mel, além de suavizar as paredes internas. Desempenha também papel de defesa química contra microrganismos e como embalsamadora de intrusos maiores e mortos (insetos, pequenos animais) que morreram na colmeia e são grandes demais para serem removidos pelas abelhas (GHISALBERTI, 1979).

As atividades biológicas das própolis têm sido relatadas como antibacteriano, antiinflamatório, antiviral, antifúngico, anestésico e antioxidante (ANDRADE et al., 2017; ANDRADE et al., 2018; SIEBERT et al., 2019; JANSEN-ALVES et al., 2019). Ela é um dos muitos produtos naturais que vem sendo utilizado durante séculos pela humanidade devido apresentar propriedades terapêuticas, dentre suas funções benéficas. Os alimentos que contém própolis são considerados alimentos funcionais (VARGAS-SÁNCHEZ et al., 2013).

As substâncias identificadas na própolis são componentes típicos de aditivos alimentares e reconhecidas como GRAS (*Generally Recognized As Safe*). Deste modo, a própolis mostra ser uma alternativa ao uso de conservantes sintéticos. Os compostos fenólicos constituintes da própolis, são considerados antioxidantes naturais que reagem com espécies radicalares e são consumidos durante a reação (NEDJ et al., 2014; NORI et al., 2011).

A encapsulação de extratos de própolis é uma tendência crescente em alimentos, devido sua ação antimicrobiana e antioxidante. O extrato possui sabor amargo e aroma forte quando consumido *in natura*, o que limita sua aplicação em alimentos. A tecnologia de microencapsulação torna-se uma alternativa viável para uso desse composto como aditivo alimentar, reduzindo a volatilidade, reatividade e higroscopicidade e, aumentando a estabilidade do produto final (LIMA et al.; 2020; LIMA, 2015; DA SILVA et al., 2013)

3.2.2.1 Propriedade antioxidante das própolis

A capacidade antioxidante presente nas própolis deve-se principalmente à combinação de compostos fenólicos e flavonoides contidos. Há um alto grau de correlação entre essas substâncias e uma ação sinérgica entre mais de 300 substâncias identificadas, como aminoácidos, ácidos fenólicos, flavonoides, diterpenos, esteroides, aldeídos e cetonas (VIUDA-MARTOS et al., 2008; REIS et al., 2017). Esses compostos bioativos atribuem para a própolis capacidade anticâncer, anti-inflamatória, bactericida, viricida, imunoestimulador e antioxidante *in vivo* e *in vitro* (IBARRA-ESPAIN et al., 2020).

Somente uma amostra pode conter mais de 100 compostos, destacando-se os ácidos fenólicos, ésteres e flavonoides (flavonas, flavanonas, flavonóis, diidroflavonois, chalconas),

terpenos, β -esteroides, aldeídos aromáticos, álcoois, sesquiterpenos, naftaleno e derivados de estilbeno. Os flavonoides são considerados como os principais compostos responsáveis pelos efeitos bioativos da própolis, exercendo função antimicrobiana e antioxidante (LIMA, 2006).

Fatores ambientais como o tipo de solo, clima, estação do ano, a fonte de flores do néctar, fatores genéticos e métodos de processamento da própolis, como pelo simples fato de necessidade/função da colmeia influenciam na capacidade antioxidante, como por exemplo defesa microbiológica, defesa física, térmica, conter umidade, luminosidade ou ser uma simples defesa em fechar frechas ou mumificar animais maiores. Em outras palavras, a atividade antioxidante da própolis irá depender de sua origem e obtenção. Embora seja comprovada a bioatividade de compostos fenólicos e flavonoides, o mecanismo de ação exato ainda é desconhecido. Entre os mecanismos propostos estão o sequestro de radicais livres, doação de hidrogênio, quelação de íons ou sua atuação como substrato para radicais como superóxido e hidroxilo (VAN ACKER et al., 1996).

De acordo com Egi (2003), os radicais livres e a peroxidação lipídica são conhecidos por induzirem danos celulares e desempenharem um papel importante no desenvolvimento de doenças cardiovasculares, artrite reumatoide, câncer, alterações inflamatórias e processos de envelhecimento. Apesar da existência de substâncias antioxidantes no organismo em si, há extensivas linhas de pesquisas na busca de novos componentes que apresentem essas propriedades. Nesse sentido, equipes científicas demonstraram a importância dos flavonoides, uma das substâncias presente na composição de própolis de alta capacidade antioxidante. A propriedade antioxidante da própolis pode ser atribuída a efeito de *scavenging* dependente da dose contra radicais e contra os radicais superóxidos.

Calegari et al. (2020) reportam as atividades biológicas de potencial antioxidante dos compostos fenólicos às estruturas químicas de seus compostos aromáticos e grupos hidroxila, os quais apresentam potencial redox. Como os compostos bioativos geralmente apresentam baixíssimas solubilidades e biodisponibilidades devido ao seu caráter hidrofóbico, o uso da microencapsulação tem se mostrado uma importância considerável, pois melhora a solubilidade e absorção dos compostos flavonoides (BUSCH et al., 2017)

Isla et al. (2001) encontraram uma correlação positiva entre o conteúdo de flavonoides de algumas própolis argentinas e a porcentagem de inibição da oxidação lipídica. De acordo com a cinética da oxidação, as própolis inibiu a oxidação lipídica durante as fases de iniciação e propagação. A extensão da oxidação foi medida pelo ensaio da substância reativa ao ácido tiobarbitúrico, inibindo ou retardando o malonaldeído, sugerindo os extratos de própolis como uso de fonte antioxidante natural.

Muitos produtos alimentícios podem ser transformados em pó, para proporcionar maior vida útil e para proteger a atividade de componentes bioativos. A técnica de secagem por aspersão tem sido utilizada há mais de um século, mas continua sendo um campo ativo de inovação, impulsionada pela crescente demanda produção de partículas mais aprimorada (ENGEL, 2017).

Compostos bioativos geralmente apresentam solubilidades e biodisponibilidades muito baixas devido ao seu caráter hidrofóbico, o pó mostra uma importância considerável, pois melhora a solubilidade e absorção dos compostos flavonoides, além de reduzir sua degradação térmica. As propriedades físico-químicas dos pós e a retenção de compostos bioativos podem ser modificadas pela adição de outro ingrediente (BUSCH et al., 2017; JANSEN-ALVES et al., 2019). Devido as propriedades de sua natureza, as própolis não podem ser dissolvidas em água (hidrofóbica) e faz com que o corpo humano tenha dificuldades na absorção. Com o propósito de tornar a própolis de fácil absorção para o corpo, por seus componentes bioativos, uma das soluções seria o processamento da própolis, usando-se da técnica de encapsulação com uma micela de caseína como revestimento (SAHLAN et al., 2017).

Outro fator importante na encapsulação de própolis por secagem em secador *spray dryer* é a opção para evitar características sensoriais indesejáveis, proteger a bioatividade e alargar a dosagem por uma matriz de encapsulação solúvel em água (DA SILVA et al., 2013).

3.3 Produto lácteo lipídico - manteiga

Entende-se por manteiga o produto gorduroso obtido exclusivamente pela batedura e malaxagem, com ou sem modificação biológica do creme pasteurizado derivado exclusivamente do leite de vaca, por processos tecnologicamente adequados, sendo possível o uso de ingredientes opcionais como sal e fermentos lácticos (manteigas maturadas), além de corantes naturais ou sintéticos (*bixinina orellana*, β -caroteno e cúrcuma ou curcumina) e alguns coadjuvantes como sais neutralizantes (BRASIL, 1996). A gordura láctea é componente obrigatório, devendo encontrar-se em média de 80 a 83%, completando a composição com aproximadamente 15% de água e geralmente menos de 0,5% de carboidratos e proteínas (SANTOS, 2009; QUEIRÓS; GRIMALDI; GIGANTE, 2016).

O regulamento técnico de identidade e qualidade de manteiga estabelece que a manteiga pode ser classificada como manteiga extra ou manteiga de primeira qualidade, onde essas podem receber designação de vendas: manteiga ou manteiga sem sal, manteiga salgada ou manteiga com sal. A manteiga maturada será quando adicionada de fermento láctico

(BRASIL, 1996). Já a Resolução nº04 de 28 de junho de 2000, institui a manteiga comum, como creme obtido a partir do desnatado do soro, regulamentada apenas no mercado brasileiro.

A manteiga possui vida de prateleira relativamente longa, porém durante o período de armazenamento, a ação do oxigênio, luz, água, calor, enzimas e micro-organismos podem ocasionar alterações no sabor (ranço) e cor, principalmente. Inicialmente, as reações com o oxigênio agem na porção insaturada das cadeias de hidrocarbonetos ou ácidos graxos insaturados em ligações duplas provocando a formação de peróxidos e hidroperóxidos (O'CONNOR; O'BRIEN, 2006; AYDIN; KAHYAOĞLU, 2019) proveniente do acúmulo de ácidos graxos livres (AGL) resultantes da hidrólise de triacilgliceróis gordurosos do leite por lipases (lipólise) e da oxidação de ácidos graxos (FRANCISCO et al., 2017).

A gordura do leite é constituída de triglicerídeos formados em média por 400 tipos ácidos graxos saturados de cadeia média e longa. A diferença está no comprimento da cadeia (C4 a C18) com grau de saturação de 65% e grande variedade de espécies de peso molecular de 28 a 56 átomos de carbono, fundindo-se dentro de uma ampla faixa de temperatura (-40 a 40 °C) (ÖZKANLI; KAYA, 2007; QUEIRÓS; GRIMALDI; GIGANTE, 2016). O nível de antioxidantes desempenha um papel importante na estabilidade oxidativa, uma vez que a oxidação dos lipídios é altamente influenciada pelos ácidos graxos insaturados de cadeia longa, que são particularmente suscetíveis à oxidação e podem dar origem a sabores estranhos (SILVA et al., 2019).

Essas reações recorrentes na manteiga podem ser desencadeadas por fermentação bacteriana, ação química ou catalítica ou pela combinação delas. Isto gera uma das maiores preocupações no setor lácteo (ÖZKANLI; KAYA, 2007; VEBERG et al., 2007; QUEIRÓS; GRIMALDI; GIGANTE, 2016; SOULTI; ROUSSIS, [s.d.]).

As vias de contaminação das manteigas por bactérias causam dois tipos de deterioração: a primeira conhecida como “mancha de superfície” ou putrefação, causada pela *Pseudomonas putrefaciens* (4 a 7 °C) com crescimento na superfície da manteiga pronta, tornando-se visível entre 7 e 10 dias. O odor se deve à presença de certos ácidos orgânicos, especialmente o ácido isovalérico. A segunda deterioração é a rancidez causada pela hidrólise da gordura com a liberação de ácidos graxos livres, ou alteradas para peróxidos por oxidação e depois para polímeros, aldeídos, cetonas ou ácidos graxos à medida que a oxidação prossegue (AYAR et al., 2001; MORAES et al., 2007).

Os antioxidantes minimizam a degradação lipídica (gorduras e óleos) de alimentos oriundos de animais e vegetais. Uso de recursos naturais antioxidantes em vez dos sintéticos se tornou cada vez mais utilizado com a finalidade de prolongar a validade de óleos e gorduras

(AYAR et al., 2001). A aplicação de antioxidantes naturais, como extratos de plantas que contenham elevadas quantidades de fenólicos, tocoferóis, flavonoides é uma solução saudável para o problema (NADEEM et al., 2013).

3.4 Processo de rancidez em alimentos gordurosos

Os lipídios são um amplo grupo de compostos quimicamente diversos, solúveis em solventes orgânicos. Os alimentos lipídicos, são indicados como gorduras (sólidas) ou óleos (líquidos), geralmente correspondendo a estado físico em temperatura ambiente. Quase sempre são encontrados na forma de triglicerídeos, compostos por ácidos graxos, os quais desempenham importante papel na qualidade sensorial dos alimentos e em seu valor nutritivo por serem fontes de energia. Esses ácidos graxos, quando presentes em alimentos, podem ser saturados ou insaturados, sendo as estruturas mais susceptíveis à oxidação (SOARES et al., 2012).

Além da oxidação (conhecida como rancidez oxidativa), os lipídios podem sofrer lipólise (rancidez hidrolítica) a qual consiste na hidrólise das ligações éster. A via de oxidação dos ácidos graxos possuem o mecanismo tradicionalmente descrito por diferentes caminhos: reações hidrolíticas, oxidação enzimática, fotoxidação e auto-oxidação, considerada o principal mecanismo de oxidação dos óleos e gorduras (RAMALHO; JORGE, 2006).

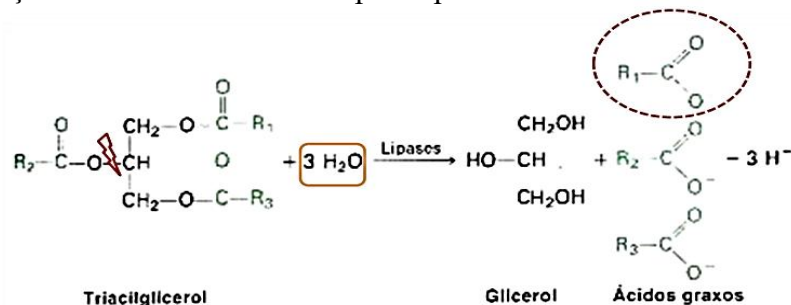
A deterioração dos compostos gordurosos é um fenômeno espontâneo e inevitável, com complexas reações químicas resultantes da interação de lipídios com oxigênio (DE LIMA JÚNIOR et al., 2013), destacando-se como problema de qualidade, industrial, comercial e nutricional, dentre eles o aparecimento de odores indesejados e a diminuição da estabilidade oxidativa causados pelos ácidos graxo livres (DEREWIAKA et al., 2011).

O consumo de alimentos afetados pela rancificação lipídica está associada ao envelhecimento, inflamações no intestino, doenças cardíacas e até cânceres. Por estas razões, a alta estabilidade oxidativa dos lipídios é muito importante para saúde do ser humano, sendo frequentemente um dos fatores decisivos para determinar o prazo de validade de produtos alimentícios (SENEL; ATAMER; ÖZTEKIN, 2011).

3.4.1 Rancificação hidrolítica

Quando a liberação de ácidos graxos livres, a partir de um esqueleto de glicerol (Figura 4), resulta no desenvolvimento de sabor desagradável, por exemplo: ácidos graxos livres voláteis de baixo peso molecular que geram aromas desagradáveis, ou ácidos graxos de cadeia longa que geram sabor de sabão, ocorre o que se chama de rancidez hidrolítica. Mesmo assim, alguns produtos, como queijo, os ácidos graxos de cadeia curta são importantes, pois contribuem para o perfil de sabor. Os ácidos graxos livres podem ser liberados a partir de triacilglicerídeos por enzimas chamadas lipases (DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010).

Figura 4 - Reação de hidrólise catalisada pela lipase.



Fonte: Lason e Ogonowski (2010) com adaptações.

A hidrólise gerada na rancificação causa a separação das cadeias de ácidos graxos do núcleo do glicerol presente nos glicerídeos. Em contrapartida, o processo de oxidação ocorre no carbono vizinho de uma dupla ligação. Uma vez formados, os radicais livres propagam-se rapidamente aumentando o consumo de oxigênio e começam a ser perceptíveis em alterações sensoriais. Nessa fase, há um aumento da concentração dos hidroperóxidos de tal forma que a sua decomposição produz quantidades perceptíveis de seus produtos de decomposição que é acelerada pela presença de ácidos graxos livres que fornecem prótons aos hidroperóxidos propiciando sua rápida decomposição (CURI; POMPÉIA; MIYASAKA; PROCOPIO, 2002).

A gordura do leite e de seus derivados é muito suscetível à rancidez hidrolítica, devido as lipases. Quando essa reação ocorre em produtos lácteos, há liberação de ácido butírico, o que altera as propriedades sensoriais desses alimentos, gerando sabores distintos nos produtos derivados do leite (NESPOLO et al., 2015).

A oxidação de gorduras lácteas ocorre por foto-oxidação ou é catalisada por íons metálicos. Dentre os minerais presentes na composição do leite, podemos encontrar ferro e

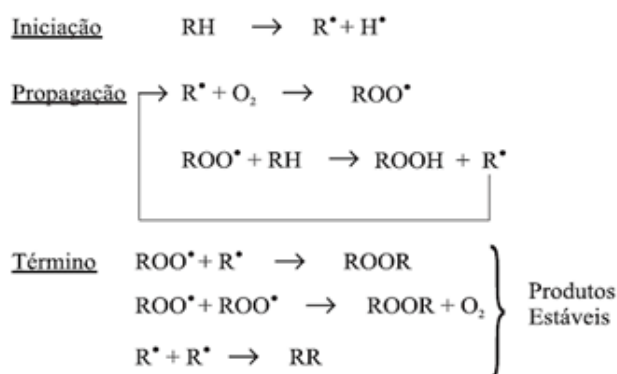
cobre, potentes catalisadores da oxidação de lipídios. No entanto, esse efeito é contrabalançado pela presença de ácido ascórbico, tocoferol e principalmente pela interação da caseína com os metais de transição (Cu e Fe), evitando contato do metal com o triacilglicerol. Caso o leite não seja tratado termicamente de forma adequada, ocorre o desenvolvimento de micro-organismos como o *Staphylococcus aureus*, que libera lipases, provocando a rancidez hidrolítica em produtos derivados como, por exemplo, a manteiga. Como o leite é rico em ácidos graxos de cadeia curta (C4 a C12), a rancidez hidrolítica representa sério problema na qualidade deste produto (CURI; POMPÉIA; MIYASAKA; PROCOPIO, 2002).

3.4.2 Rancificação oxidativa

Os triacilgliceróis e os fosfolipídios têm pouca volatilidade e, portanto, não contribuem de forma direta para o aroma dos alimentos, somente durante as reações de oxidação dos lipídios, que os ácidos graxos esterificados em triacilgliceróis e fosfolipídios decompõem-se formando moléculas pequenas e voláteis produzindo os aromas indesejados conhecidos como rancidez oxidativa (DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010).

Conhecida como auto-oxidação, a rancidez oxidativa é a responsável principal pela deterioração dos alimentos ricos em gorduras. Destaca-se como o mecanismo chave, onde o oxigênio reage com muitos substratos orgânicos para produzir hidroperóxidos e outros compostos oxigenados, através de uma reação em cadeia de radicais livres (Figura 5) que pode ser descrito em termos de um processo trifásico (iniciação, propagação e finalização) (LAGUERRE; LECOMTE; VILLENEUVE, 2007).

Figura 5 - Esquema geral do mecanismo da oxidação lipídica.



RH – Ácido graxo insaturado; R^{\bullet} – Radical livre; ROO^{\bullet} – Radical peróxido e ROOH – Hidroperóxido.
Fonte: Ramalho e Jorge (2006).

As reações de auto-oxidação apresentam normalmente um período de indução (PI), período durante o qual muita pouca mudança ocorre nos lipídios. Após o término do PI a deterioração oxidativa dos lipídios ocorre mais rapidamente com a presença dos compostos aromáticos voláteis. O PI é medido como o tempo necessário para atingir um ponto final de oxidação. Uma consequência do aumento acentuado na concentração desses componentes após o término do período de indução, é que a taxa de deterioração dos alimentos é relativamente insensível com relação ao conteúdo exato de gordura dos alimentos (MORETTO; FETT, 1998).

A cinética da oxidação de lipídios nos alimentos costuma apresentar uma fase estacionária (fase *lag*) seguida pelo aumento exponencial da taxa de oxidação. O tamanho da fase *lag* é importante para processamento de alimentos, pois esse é o período em que a rancidez não é detectada e a qualidade do alimento é elevada. Assim que passa essa fase e alcança-se a fase exponencial, a oxidação dos lipídios e o desenvolvimento de aromas indesejáveis ocorrem com rapidez (DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010).

3.4.3 Métodos de avaliação da inibição da oxidação lipídica

O comportamento de estabilidade oxidativa de óleos ou gorduras foi foco de estudo para desenvolvimento de métodos avaliativos. Essas metodologias aceleram o processo de deterioração e fornecem resultados relacionados à resistência ou suscetibilidade à oxidação. A amostra é submetida a um teste de oxidação acelerada, sob condições padronizadas e um ponto final é escolhido, no qual se encontram sinais de deterioração oxidativa. A partir da análise de estabilidade oxidativa obtém-se como parâmetro, o período de indução definido como o tempo para se atingir um nível de rancidez detectável (SHAHIDI; WANASUNDARA, 2008).

A avaliação do grau de oxidação geralmente é feita na escolha do estágio mais adequado para a determinação. Procura-se avaliar, em condições padronizadas e selecionando um determinado parâmetro indicador, neste caso, o período de indução (PI) da reação, é o tempo necessário para atingir um ponto final de oxidação correspondente a um nível detectável de ranço ou uma mudança súbita na velocidade de oxidação (AUGUSTO, 2013).

A estabilidade de oxidação lipídica é medida sob condições padronizadas de testes de oxidação acelerada. Para se acelerar, os testes incluem elevação de temperatura, adição de metais, aumento da pressão de oxigênio, estocagem sob luz e agitação. Porém, o aquecimento é o meio mais utilizado e eficiente para acelerar a oxidação e o desenvolvimento da rancidez em óleos e emulsões (ANTONIASSI, 2001; FRANKEL, 1993).

Silva, Borges e Ferreira (1998) estabeleceram a distinção entre os testes para determinação da estabilidade oxidativa nas condições normais de armazenamento ou de distribuição (testes de estabilidade em tempo real) e a avaliação da resistência à oxidação efetuada por testes preditivos, os quais promovem um envelhecimento acelerado (testes de estabilidade acelerados).

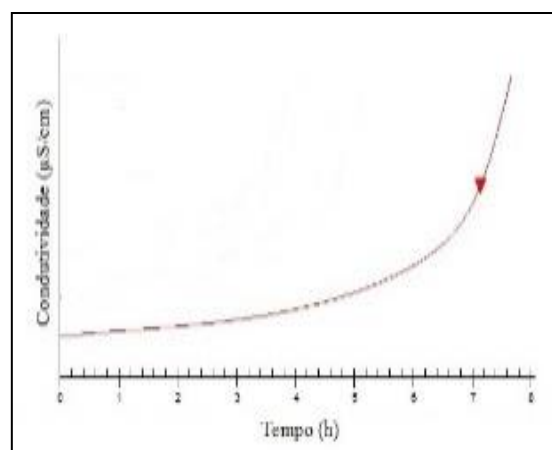
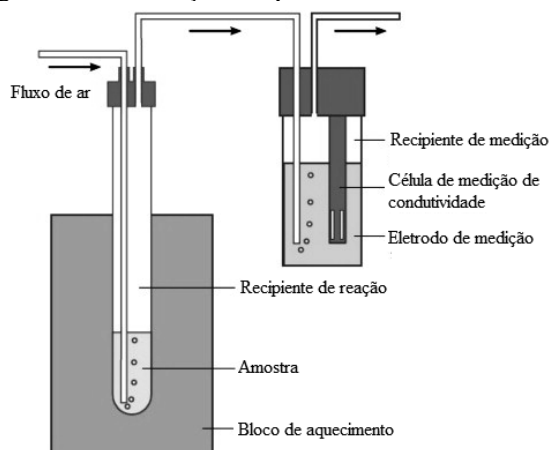
O método de estufa (*Schaal oven test*) apresenta menos limitações que outros métodos acelerados e o ponto final representa o menor grau de oxidação da amostra. Os valores encontrados têm boa correlação com as avaliações de vida de prateleira. Entretanto, foi observado que não existe padronização para o teste de *Schaal* e que se colocados a temperaturas de 100 °C ou mais, os resultados serão duvidosos (ANTONIASSI, 2001; FRANKEL, 1993).

A medição de hidroperóxidos de ácidos graxos é um método comum para avaliar a qualidade oxidativa de lipídios. A maioria dos métodos que medem hidroperóxidos lipídicos baseia-se na capacidade dos hidroperóxidos de oxidar compostos indicadores. Os valores de peróxidos são expressos em miliequivalentes (mEq) de oxigênio por quilo de matéria graxa. A avaliação deste parâmetro de oxidação é geralmente efetuada pela determinação do Índice de peróxidos (IP) (FRANKEL, 1993; DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010).

Os produtos secundários da oxidação de lipídios são compostos que surgem da decomposição de hidroperóxidos de ácidos graxos por reações de β -clivagem. Essas reações podem gerar centenas de compostos distintos, tanto voláteis como não voláteis, a partir da oxidação de lipídios nos alimentos. Como é impossível medir todos esses compostos ao mesmo tempo, estes métodos costumam visar à análise de um composto individual ou de uma classe de compostos. O método do ácido 2-tiobarbitúrico (TBA) é baseado na reação de cor entre TBA e produtos de oxidação de lipídios poli-insaturados. O teste é simples, sensível e muito preciso baseado na reação do ácido tiobarbitúrico com produtos de decomposição dos hidroperóxidos. Um dos principais produtos formados no processo oxidativo é o malonaldeído (MA), um aldeído com 3 átomos de carbono (SILVA; BORGES; FERREIRA, 1998).

Uma das técnicas para determinação da estabilidade oxidativa baseada no aumento da condutividade elétrica é pelo Rancimat (Figura 6).

Figura 6 - Descrição esquemática do Rancimat.



Fonte: Augusto (2013) com adaptações.

O método Rancimat é um teste instrumental automatizado baseado na determinação condutométrica de produtos de degradação voláteis, produzidos durante a auto-oxidação de gorduras a temperatura igual ou superior a 100 °C, e apresenta plotagem automática da condutividade em função do tempo (FRANKEL, 1993). A avaliação é realizada graficamente após a conclusão do experimento. O fluxo de ar passa através do óleo (mantido sob aquecimento em temperatura que varia de 100 a 140° C), depois borbulha em água deionizada, arrastando os ácidos carboxílicos voláteis (principalmente ácido fórmico), gerados do processo de oxidação, que se solubilizam, aumentando a condutividade elétrica da água (ANTONIASSI, 2001).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Matérias-primas

Durante a pesquisa foi utilizada própolis fornecida por um apicultor da região Noroeste do Estado do Ceará coletada em fevereiro de 2019 de colmeias de abelhas *Apis mellifera* procedente do apiário localizado no Morro do Barriga sob coordenadas 3°34'59.07"S 40°18'53.52"O, na cidade de Sobral- Ceará.

A própolis foi coletada diretamente nas colmeias por raspagem das tampas e das melgueiras, retirando-se das fendas entre a parte inferior da tampa e a melgueira superior de dez colmeias, tendo o cuidado de não atingir a madeira de ambas as partes da colmeia. Após a raspagem, a própolis coletada foi acondicionado em sacos plásticos devidamente etiquetados e acondicionados em isopor com gelo para conservação sob refrigeração e encaminhado para o Laboratório de Tecnologia de Química (LTQ) do IFCE *Campus* Fortaleza, onde permaneceu armazenado em freezer (-2° C) por uma semana até início dos experimentos.

A própolis de abelhas africanizadas utilizada foi caracterizada quanto a umidade, teor de cinzas, determinação de ceras, sólidos solúveis, massa mecânica, fenólicos totais e determinação de flavonóides, antes da utilização neste estudo a fim de confirmar pesquisas anteriores por Lima et al (2018), visto que as propriedades bioativas da própolis podem variar de acordo com sua safra. Os valores obtidos estavam dentro dos parâmetros estabelecidos para os padrões de identidade e qualidade da própolis (BRASIL, 2001).

O soro de leite líquido (subproduto do queijo coalho) e a manteiga (Lot 3; 30/01/2020) foram produzidos por uma indústria de laticínios da cidade de Maranguape, Ceará.

A maltodextrina e a goma arábica foram adquiridas em comércio local da cidade de Fortaleza, Ceará.

4.2 Purificação da própolis de abelhas africanizadas e preparo do extrato hidroalcolico

Com base na metodologia de Busch et al. (2017), a amostra de própolis bruta coletada foi congelada (-17 °C) para em seguida ser triturada em liquidificador convencional e dispersa em etanol 70% para extração dos compostos bioativos. O processo de extração foi realizado deixando a própolis em infusão a 35 °C por 24 h em incubadora com agitação orbital MA 410 (Marconi®). Posteriormente, o material foi centrifugado a 6000 rpm por 10 min, obtendo-se o extrato etanólico de própolis (EEP). O processo foi repetido duas vezes visando a

máxima recuperação dos compostos bioativos. O volume final foi reduzido em rota-evaporador digital B - 491 da BUCHI, acoplado a uma bomba de vácuo usando as seguintes condições: 80 rpm; pressão de 7700 Pa e banho-maria com temperatura de 45 °C, até o extrato etanólico de própolis atingir 0,317 g/mL. Os procedimentos foram realizados no Laboratório de Tecnologia Química (LTQ) no IFCE *Campus* Fortaleza.

4.3 Estudo para seleção de agente encapsulante

Um delineamento experimental foi realizado a fim de se determinar as melhores condições de secagem do *spray dryer* no encapsulamento do extrato de própolis por uma mistura de maltodextrina, goma arábica e soro de leite. A partir dos resultados e posterior análise, definiu-se as melhores condições de secagem do *spray dryer*. A seguir, nestas condições, foram testadas outras duas formulações variando-se os encapsulantes. As análises comparativas da eficiência antioxidante foram feitas segundo a metodologia do radical ABTS (RUFINO et al., 2007).

O soro de leite *in natura* antes de ser utilizado como material de parede, foi desidratado isoladamente por aspersão em secador *spray dryer* com temperatura de entrada do ar de secagem a 180 °C e vazão de alimentação de 5mL.min⁻¹, conforme Andrade (2013). O soro de leite nos estados líquido e em pó foram caracterizados em termos de proteína bruta utilizando o método micro *Kjeldahl*, aplicando um fator de conversão (6,38) para nitrogênio total em proteínas (IAL, 2005).

4.3.1 Delineamento experimental

O planejamento experimental realizado com as matrizes poliméricas como agente encapsulante maltodextrina, goma arábica e soro de leite, foi via aspersão em secador *spray dryer*. Os parâmetros de temperatura do ar na entrada e vazão de alimentação (*pump*) do equipamento foram utilizados como variáveis de entrada para variáveis respostas com obtenção das maiores atividade antioxidante e rendimento do pó de extrato de própolis de abelhas africanizadas.

A secagem foi realizada em *spray dryer* modelo B-290 da Büchi® com dimensões de 60 x 50 x 110 cm, 48 kg e capacidade máxima de secagem de 1 L/h de água. O fluxo de ar de 35 m³.h⁻¹ (taxa de aspiração 100%) e de ar comprimido de 357 L.h⁻¹ (altura mínima do rotâmetro de 30 mm) foram mantidos constantes nos processamentos. Todos os ensaios foram

feitos em triplicata, conduzidos em escoamento concorrente utilizando um sistema duplo fluido com bico pulverizador de 0,7 mm de diâmetro.

Antes de se iniciar a secagem foi realizado o cálculo percentual para elaboração da formulação base conforme sugerido por Andrade (2013), Busch et al. (2017); Da Silva et al. (2013) e Tosoni e Rodrigues (2013) com adaptações. A composição inicial da formulação de entrada foi: 21,7% de extrato etanólico de própolis de abelhas africanizadas (EEP); 33,8 % de soro de leite (SL); 16% de maltodextrina (MD); 8% de goma arábica (GA) e 20,6% de água. Oportunamente, a goma arábica foi dispersa em água a 40 °C com auxílio de um agitador mecânico digital, seguidos da maltodextrina e de pó de soro de leite. Todos os componentes foram posteriormente homogeneizados com o EPP em um sistema tipo Ultra-Turrax T16 a 15000 rpm por 5 min, sendo levados posteriormente para o *spray dryer*. O processo de secagem foi mantido em agitação, utilizando placa com agitador, evitando decantação dos constituintes.

Para a otimização da produção de pó partindo da composição inicial citada anteriormente, foi selecionado um Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) contendo quatro ensaios fatoriais e dois níveis (2^2), quatro ensaios axiais (2x2) e o ensaio central repetido três vezes, totalizando 11 ensaios. As variáveis independentes foram temperatura do ar na entrada e vazão de alimentação. E como variáveis dependentes a atividade antioxidante e o rendimento (Tabela 1).

Tabela 1 - Domínio experimental das variáveis estudadas na encapsulação do extrato de própolis em soro de leite via aspersão *spray drying*.

| Variáveis independentes | Níveis | | | | |
|--|--------|-----|-----|-----|-------|
| | -1,41 | -1 | 0 | +1 | +1,41 |
| Temperatura de entrada do ar de secagem (°C) | 121,3 | 130 | 151 | 172 | 180,7 |
| Vazão de alimentação (mL.min ⁻¹) | 4 | 5 | 7 | 9 | 10 |

Fonte: Autor (2021).

Os valores adotados nos níveis de planejamento das variáveis independentes se basearam em referência de estudos relatados na literatura (ANDRADE, 2013; BUSCH et al., 2017; DA SILVA et al., 2013a; DA SILVA et al., 2011b; TOSONI; RODRIGUES, 2013) e nos limites de utilização apresentados pelo equipamento. O rendimento (%) de elaboração e a capacidade antioxidante pelo radical ABTS^{•+} (μmols de trolox/g) foram utilizados como respostas experimentais. Os valores obtidos no delineamento experimental foram submetidos à análise estatística de variância (ANOVA) ao nível de significância de 5%.

A Tabela 2 apresenta a configuração do planejamento fatorial utilizado na pesquisa. Os procedimentos operacionais foram realizados no Laboratório de Tecnologia Química (LTQ) no IFCE Campus Fortaleza.

Tabela 2 - Planejamento experimental com valores codificados e reais para processo de secagem por aspersão em secador *spray dryer* do extrato de própolis em soro de leite.

| Ensaio | Variáveis independentes | | T _{Ent} (°C) | Q _{alim.} (mL.min ⁻¹) |
|--------|-------------------------|----------------|-----------------------|--|
| | x ₁ | x ₂ | | |
| 1 | -1 | -1 | 130 | 5 |
| 2 | -1 | 1 | 130 | 9 |
| 3 | 1 | -1 | 172 | 5 |
| 4 | 1 | 1 | 172 | 9 |
| 5 | -1,41 | 0 | 121,3 | 7 |
| 6 | 1,41 | 0 | 180,7 | 7 |
| 7 | 0 | -1,41 | 151 | 4,2 |
| 8 | 0 | 1,41 | 151 | 9,8 |
| 9 | 0 | 0 | 151 | 7 |
| 10 | 0 | 0 | 151 | 7 |
| 11 | 0 | 0 | 151 | 7 |

T_{Ent} = Temperatura de entrada. Q_{alim} = Vazão de alimentação. Fonte: Autor (2021).

O rendimento foi estimado segundo a Equação 1 a partir da razão entre a massa dos sólidos presentes no pó coletado ao final da secagem e a massa inicial de sólidos presentes no extrato destinado a secagem, calculada a partir dos extratos secos de EEP e SL e das massas dos outros encapsulantes utilizados.

$$R = \frac{(1 - U_{ext}) \cdot m_{ext}}{(1 - U_{pó}) \cdot m_{pó}} \cdot 100 \quad (\text{Equação 1})$$

Onde: R = Rendimento do processo (%); $U_{pó}$ = umidade do pó obtido na secagem (g/g); U_{ext} = umidade do extrato submetido à secagem (g/g); $m_{pó}$ = massa do pó obtida na secagem (g); m_{ext} = massa do extrato submetido à secagem (g).

4.3.2 Teste de validação para obtenção do pó de extrato de própolis de abelhas africanizadas em soro de leite (PPSL)

O planejamento experimental possibilitou obter os parâmetros no *spray dryer* para elaboração do PPSL com valor elevado de atividade antioxidante dentre as formulações testadas, sendo realizado posteriormente o ensaio de validação comparando a utilização da mistura dos 3 encapsulantes (PSSL, maltodextrina e goma arábica), uma formulação contendo maltodextrina e goma arábica e outra contendo apenas soro de leite como encapsulante.

4.4 Caracterização das propriedades físico-químicas e estruturais das microcápsulas

As caracterizações físicas e químicas do PPSL foram realizadas no Laboratório de Controle de Qualidade de Alimentos e Secagem da Universidade Federal do Ceará. As análises executadas estão descritas a seguir:

4.4.1 Umidade

O teor de umidade foi obtido ao se atingir 0,05 % de variação da massa por 30 segundos, utilizando analisador de umidade modelo ID50 sob temperatura 105 °C.

4.4.2 Higroscopicidade

A higroscopicidade foi avaliada a partir de 1,0 g de pó em placa de Petri previamente tarada a qual foi mantida em dessecador por 90 min a 24 °C e 75% de umidade relativa utilizando solução saturada de NaCl, conforme Goula e Adamopoulos (2008). A higroscopicidade foi expressa em massa de água absorvida (g)/100g de amostra.

4.4.3 Solubilidade

Para a determinação de solubilidade 1,0 g da amostra foi dispersa em 100 mL de água destilada sob agitação de 2000 rpm por 5 min. Em seguida, a solução foi centrifugada a 3000 rpm por mais 5 min. Em seguida 25 mL do sobrenadante foram retirados e transferidos para uma placa de Petri, a qual foi levada à estufa a 105 °C por 5 h. A solubilidade (%) foi calculada a partir das massas de pó antes e após a secagem (CANO-CHAUCA, 2005).

4.4.4 Aglomeração (grau de caking)

Nesta análise a amostra seca em estufa a 105 °C por 4 h foi resfriada até a temperatura ambiente, sendo em seguida pesada e transferida para uma peneira com abertura de 500 µm sendo agitada por 5 min em velocidade média, conforme Goula e Adamopoulos (2008) com modificações. O grau de *caking* foi calculado pela razão entre a massa do pó retido na peneira após agitação (g) e a massa de pó inicial utilizada para o peneiramento (g).

4.4.5 Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR-ATR)

A análise por FTIR foi feita em espectrômetro de infravermelho Spectrum 100 FT-IR da Perkin Elmer acoplado a um acessório para pastilhas de brometo de potássio (KBr). O método com pastilha de KBr foi na proporção de 1:100 (p/p) de catalisador: KBr. A resolução adotada foi de 4 cm⁻¹ e a velocidade de varredura de 10 scans/min. Antes das análises, as amostras foram secas em estufa a 120 °C por 3 h para remoção de umidade. Os espectros obtidos foram registrados entre 4000 cm⁻¹ e 700 cm⁻¹. As caracterizações foram realizadas no LTQ do IFCE Campus Fortaleza.

4.4.6 Tamanho de partículas e potencial zeta

O tamanho das partículas e o potencial zeta das amostras em solução foram determinados através de um Nano Zeta Sizer Malvern 3600 utilizando um feixe de luz vermelha ($\lambda = 633$ nm) conforme Chang et. al (2020) com adaptações. Na análise, as amostras são dispersas em água destilada (0,1%) e deixadas em agitação por 24 h. As análises foram realizadas em triplicata no LTQ do IFCE Campus Fortaleza.

4.4.7 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A avaliação da morfologia das micropartículas por microscopia eletrônica de varredura foi executada na Central Analítica da Universidade Federal do Ceará usando um microscópio eletrônico Quanta 450 - FEG (FEI) a 15 kV e ampliação de 300 a 3000x. Conforme recomendado por Jansen-Alves et al. (2019) uma pequena quantidade da amostra foi espalhada em *stub* metálico com fita de carbono e revestida com fina camada de ouro sob vácuo com o auxílio um de dispositivo de revestimento de pulverização catódica.

4.5 Eficiência da microencapsulação

A eficiência da microencapsulação foi realizada conforme Selamat, Muhamad e Sarmidi (2009) com adaptações. A determinação foi dividida em duas etapas: primeiro a extração de compostos fenólicos que não foram microencapsulados (livres), e segundo após ruptura das micropartículas para quantificar o teor de compostos fenólicos nelas contidas. O resultado da eficiência da microencapsulação foi em porcentagem calculado de acordo com a Equação 2. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

$$\text{Eficiência da encapsulação(\%)} = (FTC - FTS) * 100 / (FTC) \quad (\text{Equação 2})$$

Onde: *FTC* = Total de fenólicos contidos nas micropartículas após a ruptura e *FTS* = Total de fenólicos não microencapsulados.

4.5.1 Extração de compostos fenólicos não microencapsulados

Aproximadamente 0,2 g do microencapsulado foram dissolvidos em 8,0 mL de etanol para extrair os compostos fenólicos localizados na superfície das micropartículas. A mistura foi agitada a 250 rpm em incubadora com agitação orbital MA – 410/CF da Marconi por 20 min em temperatura de 35° C, seguida de 10 min de centrifugação e 4000 x G. Posteriormente, o conteúdo total de compostos fenólicos do sobrenadante foi quantificado usando um espectrofotômetro, de acordo com a metodologia descrita por Melo; Matsuda e Muradian-Almeida (2012) e Funari e Ferro (2006). O resultado obtido foi utilizado para calcular a eficiência de encapsulação.

4.5.2 Ruptura para liberação de compostos fenólicos retidos nas micropartículas

Para a ruptura e liberação dos compostos fenólicos contidos no interior das microcápsulas foi pesada em torno de 0,2 g do microencapsulado em tubos de Falcon e adicionados 10 mL de metanol 80% (v / v) acidificado (0,1% HCl). Em seguida, os tubos foram levados para agitação (250 rpm, 20 min, 35 °C) em incubadora orbital (MA – 410/CF), seguido por mais 20 min de sonicação em um aparelho ultrassom (UltraCleaner 1650, Unique) e 10 min de centrifugação (250 rpm). O conteúdo dos compostos fenólicos totais (sobrenadante) foi determinado usando um espectrofotômetro Evolution™ 60S UV-Visible da Thermo Scientific

de acordo com metodologia descrita no item 4.6.4. Os extratos obtidos após a ruptura das micropartículas foram utilizados para calcular a eficiência de encapsulação e atividade antioxidante das microcápsulas de própolis preparadas.

4.6 Determinação da atividade antioxidante das microcápsulas

Para a caracterização mais completa da atividade antioxidante foram realizadas análises pelos métodos de captura do radical $ABTS^{\bullet+}$, FRAP e DPPH, além da determinação de compostos fenólicos totais. As metodologias usadas estão descritas a seguir.

4.6.1 Atividade antioxidante total pelo método de captura do radical livre $ABTS^{\bullet+}$

De acordo com a metodologia proposta por Andrade et al. (2017) uma alíquota de 30 μ L do extrato obtido após ruptura das microcápsulas como descrito no item 4.5.2, foi transferida para tubos de ensaio com 3,0 mL do radical $ABTS^{\bullet+}$ e homogeneizada em vortex. Após 6 min, o valor de absorbância foi lido a 734 nm em espectrofotômetro Evolution™ da Thermo Scientific. Diferentes concentrações de Trolox variando de 0 a 0,0025 mmol Trolox/mL foram usadas para construir a curva de calibração com base na equação de calibração: $y = -0,0002x + 0,5616$ ($R^2 = 0,9988$). Por esta metodologia os resultados são expressos em Capacidade (atividade) antioxidante ou Equivalentes de trolox (TEAC), onde um equivalente de trolox corresponde a 1 μ mol de trolox/g de amostra.

4.6.2 Atividade antioxidante total pelo método de redução do ferro (FRAP)

A atividade antioxidante através do método de redução do ferro (FRAP) foi determinada de acordo com a metodologia proposta por Thaipong et al. (2006). Para a análise, uma alíquota de extrato (descrito no item 4.5.2) de 90 μ L foi transferida para tubos de ensaio, com 270 μ L de água destilada, misturada com 2,7 mL do reagente FRAP, homogeneizado em um vórtice e mantido a 37 °C em banho-maria. A absorbância o valor foi lido em espectrofotômetro Evolution™ 60S da Thermo Scientific a 595 nm após 30 min. Uma curva de calibração foi construída com base na equação de calibração: $y = 0,0006x - 0,1188$ ($R^2 = 0,9968$). Os resultados foram expressos em termos de μ moles Trolox por g de própolis.

4.6.3 Atividade antioxidante total pelo método de captura do radical livre DPPH

A capacidade antioxidante foi determinada pelo método de eliminação do radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) recomendado descrita por Andrade et al. (2017). Foi misturada uma alíquota de 250 µL do extrato (item 4.5.2) com 1,25 mL de DPPH. Após 5 min, a absorbância foi lida a 517 nm realizada em espectrofotômetro Evolution™ da Thermo Scientific. As leituras foram comparadas com os controles, contendo etanol 95% em vez de extrato. Diferentes concentrações de Trolox variando de 0 a 0,3 mmol Trolox/mL foram usadas para construir a curva de calibração com base na equação: $y = 0,257x + 2,6976$ ($R^2 = 0,9908$) e os resultados foram expressos em termos de µmols Trolox por g de própolis.

4.6.4 Determinação de compostos fenólicos totais

Na determinação são adicionados 5 mL do reagente de Folin-Denis e 10 mL de carbonato de sódio 20% aos padrões de ácido em balão de 100 mL. Ao fim do preparo, as soluções são deixadas em repouso, por 30 min, a temperatura ambiente e, então, efetuada a leitura a 760 nm. Para quantificação das amostras, utilizou-se o mesmo procedimento substituindo a solução de ácido gálico por 0,5 mL das soluções preparadas (4.5.1 e 4.5.2). O conteúdo total de fenólicos foi expresso em % de EAG (equivalentes de ácido gálico) conforme descrito por Melo; Matsuda e Muradian-Almeida (2012) e Funari e Ferro (2006). A curva de calibração correspondente foi construída a partir da análise de diferentes concentrações de ácido gálico variando de 0,5 a 3 µg/mL, com base na equação de calibração: $y = 0,0228 + 0,1084$ ($R^2 = 0,9789$). Os resultados foram expressos em termos de miligramas de equivalente em ácido gálico (GAE) por g de amostra.

4.7 Identificação de compostos bioativos por cromatografia líquida (LC-ESI-qTOF-MS)

Para a identificação das estruturas moleculares dos compostos bioativos foram analisados o extrato etanólico de própolis e o pó de própolis encapsulado com soro de leite. A análise foi realizada em sistema *Acquity UPLC (Waters)* acoplado a um sistema de Quadrupolo /Tempo de Voo (QtoF, *Waters*) pertencente a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA). As corridas foram realizadas em coluna *Waters Acquity UPLC BEH* (150 x 2,1 milímetros, 1,7 µm), temperatura fixa de 40 °C, fases móveis: 0,1% de ácido fórmico em água e 0,1% de ácido fórmico em acetonitrila no modo gradiente variando de 2% a 95% da fase acetonitrila (15 min). O fluxo usado foi de 0,4 mL.min⁻¹ e volume de injeção de 5 µL.

4.7.1 Clean up das amostras

As amostras foram dispersas em solução (1:1) metanol/água, eluidas em cartucho supelclean LC – 18 SPE 500 mg Estrata Fenomenex e submetidas a nitrogênio líquido para retirada de todo solvente. Em seguida foram pesadas 0,0003 g de amostra, as quais foram dissolvidas em metanol e água (90:10) para retiradas de açúcares e posteriormente filtradas. A fração metanólica obtida foi usada na análise cromatográfica.

4.7.2 Análise cromatográfica

A determinação dos espectros de massa foi feita nas seguintes condições analíticas: modo ESI- em uma faixa de 110-1180 Da; temperatura da fonte fixa de 120 °C, temperatura de dessolvatação de 350 °C, fluxo do gás de dessolvatação de 500 L/h, cone de extração de 0,5 V, voltagem capilar de 2,6 kV. No modo ESI+ as condições foram idênticas a exceção da voltagem capilar que foi de 3,2 kV. O instrumento foi operado pelo software Masslynx 4.1 (*Waters Corp.*).

4.8 Estudo da estabilidade oxidativa da manteiga adicionada de PPSL

A manteiga utilizada na pesquisa foi adquirida em uma indústria de leite local, transportada a 4 °C acondicionada em potes plásticos de 500 g dentro de caixas térmicas para o laboratório de laticínio da UFC. A pesagem para homogeneização das amostras, partiu de 200 g de manteiga em copo de vidro de 250 mL levando-os para banho-maria a 30 °C, por aproximadamente 8 min, com propósito de facilitar a homogeneização na adição dos antioxidantes. Com ajuda de bastão de vidro, misturou-se cuidadosamente os antioxidantes BHT e pó de própolis em soro de leite em suas respectivas concentrações. A identificação foi realizada a fim de obter quatro amostras com os seguintes tratamentos: BHT 50 ppm, BHT 100 ppm, PPSL 50 ppm e PPSL 100 ppm. Com os tratamentos prontos, distribuiu-se 40 g de cada em placas de Petri de vidro (9 cm de diâmetro) identificadas (antioxidante/concentração). As amostras foram preparadas em duplicata e um tratamento sem adição de antioxidantes foi utilizado como ‘Controle’.

As amostras de manteiga colocadas em placas de petri foram armazenadas em condições de oxidação acelerada, sob temperatura controlada de 50 °C ± 3 em Incubadora B. O. D. (modelo CT 705 da Cientec) para acompanhamento pelo Método *Schaal Oven Test* descrito por Papadopoulou e Roussis (2008) com adaptações no valor da temperatura.

Nesta condição, as manteigas permaneceram armazenadas por 42 dias com realização de análises periódicas (0, 7, 21, 33 e 42 dias) do índice de peróxido (IP) e das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) para acompanhamento do processo oxidativo. Para que fosse garantida uma perfeita homogeneização das amostras, cada placa foi agitada manualmente e esporadicamente durante o período do estudo de estabilidade.

4.8.1 Índice de peróxido

Os produtos primários da oxidação foram determinados pela medida de índice de peróxido (IP) segundo o método AOCS Cd 8b-90 (2009), por titulação da amostra com tiosulfato de sódio 0,001M após tratamento com solução saturada de iodeto e os resultados expressos em miliequivalentes de oxigênio ativo/kg de amostra.

4.8.2 Determinação do conteúdo de malonaldeído pelo método de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

Para a determinação das TBARS (indica a quantidade de produtos de oxidação secundária) na manteiga, foi utilizada a metodologia descrita por Santos; Shetty, Da Silva Miglioranza (2014). Neste método cerca de 1,5 g de amostra foram homogeneizados em vortex com 1,5 mL de CHCl_3 em tubo de vidro com tampa seguido da adição de 5 mL da solução TBA (15% de TCA, 0,375% de TBA em HCl 0,25M e 3 mL de solução 2% de BHT em etanol). A mistura foi aquecida em banho de água a temperatura de 100 °C durante 20 min até desenvolvimento da cor rosa. Em seguida a mesma foi resfriada em água por 10 min, centrifugada a 3000 RPM por 15 min e por fim filtrada em filtro seringa. Após sedimentação por 20 min foi medida a absorbância do sobrenadante em espectrofotômetro a 532 nm.

O 1,1,3,3-tetraetoxipropane (TEP) da Sigma-Aldrich foi usado como padrão analítico para a curva de calibração. Os resultados foram expressos em “valor de TBARS” definido como mg de malonaldeído/kg de amostra.

4.9 Estudo cinético de degradação oxidativa da manteiga

A fim de estimar os parâmetros cinéticos da oxidação lipídica à $50 \pm 3^\circ\text{C}$, as variações das concentrações de peróxido (IP) e de malonaldeído por TBARS com o tempo foram aplicados aos modelos cinéticos clássicos de ordem zero e de primeira ordem (ÖZKANLI; KAYA, 2007) descritos a seguir.

4.9.1 Modelo de ordem zero

Reações de ordem zero são independentes da concentração dos reagentes e a expressão geral para a velocidade pode ser expressa (Equação 3) como a seguir.

$$\frac{dC}{dt} = k_0 \quad (\text{Equação 3})$$

A Equação 3 acima quando integrada resulta na Equação 4:

$$C - C_0 = k_0 t \quad (\text{Equação 4})$$

Onde: C_0 é a concentração inicial, C a concentração no instante t e k_0 a constante cinética de ordem zero.

4.9.2 Modelo de primeira ordem

O modelo de primeira ordem está descrito na Equação 5.

$$\frac{dC}{dt} = k_1 C \quad (\text{Equação 5})$$

Onde: C é o índice de peróxido (meqO₂/kg) ou de TBARS (mg malonaldeído/kg) no tempo t e k_1 é a constante cinética de primeira ordem (dia⁻¹).

A integração da Equação 5 permite a obtenção direta do valor de k_1 , de acordo com a Equação 6.

$$\ln \left(\frac{C}{C_0} \right) = k_1 t \quad (\text{Equação 6})$$

Onde: C_0 são os valores iniciais de IP e TBARS da amostra.

4.10 Rancimat

A estabilidade oxidativa das amostras de manteiga também foi avaliada em condições de degradação acelerada usando um sistema Rancimat modelo 873 da Metrohm. Nesta determinação foi utilizado o método adaptado de Anwar et al. (2003) para determinar o índice de estabilidade oxidativa (IEO) das manteigas. As amostras de manteiga sem adição de

antioxidante e as manteigas adicionadas com BHT 100 ppm e PPSL 100 ppm, foram aquecidas em banho-maria a 40 °C, transferidas para tubos Falcon e centrifugadas para separação das fases. $2,5 \pm 0,1$ g de matéria oleosa foram pesados nos frascos de reação, oxidadas a 110 °C ($\pm 0,9$) sob uma corrente constante de oxigênio de 10 L/h. Os produtos gasosos de reação (ácidos voláteis) foram absorvidos em 50mL de água Milli-Q. Todos os ensaios foram executados em duplicata e os resultados expressos como período de indução ou índice estabilidade oxidativa (h). Os ensaios foram finalizados quando a condutividade elétrica da solução aquosa formada com os produtos voláteis da oxidação para de crescer.

4.11 Avaliação da composição centesimal das manteigas

As análises para caracterização físico-químicas das amostras sem antioxidante (controle) e contendo o PPSL a 100 ppm foram realizadas nos Laboratórios de Laticínios e Laboratório de Carnes da UFC *Campus* Pici. O teor de cinzas obtido por incineração da amostra em mufla a 550 °C (AOAC, 2005); a proteína bruta foi determinada pelo método micro *Kjeldahl*, aplicando o fator de conversão (6,38) para nitrogênio total em proteínas (IAL, 2005). O teor de umidade e de lipídios foram executados segundo os métodos descrito em IAL (2008).

4.12 Avaliação da qualidade microbiológica das manteigas

A manteiga adicionada de microcápsula de própolis com melhor estabilidade oxidativa foi avaliada quatro dias antes da aplicação do teste sensorial para garantir a segurança microbiológica do alimento pronto para o consumo. As análises microbiológicas foram de acordo com as diretrizes gerais da IN nº 60, de 23 de dezembro de 2019 da ANVISA (BRASIL, 2019). A contagem de coliformes termotolerantes realizada pela técnica do Número Mais Provável (NMP/g), enquanto a pesquisa de *Salmonella sp.* e a contagem de bolores e leveduras, foram executadas conforme a metodologia do *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods of Washington American Public Health Association* (APHA, 2001). Todas as análises foram realizadas em triplicata.

4.13 Análise sensorial dos produtos elaborados

Após aprovação pela Comissão de Ética em Pesquisa (CEPE) da Universidade Federal do Ceará – UFC (Nº CAAE: 28647420.9.0000.5054), a manteiga adicionada com

extrato de própolis de abelhas africanizadas microencapsulado em soro de leite com melhor estabilidade oxidativa foi avaliada sensorialmente através de teste discriminativo triangular com base na NRB ISO 4120: 2016.

O número de julgadores necessários foi calculado com proporção de discriminadores (P_d) definida em 30%, nível de significância (α) de 5 % e poder esperado de 80%. Um número mínimo de 40 (ANEXO A – TABELA 14) julgadores são recomendados para executar o Teste Triangular. A Equação 7 (Dutcosky, 2013) foi utilizada para saber o número mínimo de respostas aceitáveis, em que “n” representa o número de respostas, 1/3 é a probabilidade de acerto ao acaso no teste triangular e “x” é o nível de significância. O resultado do teste foi analisado baseando-se na significância teste estatístico t-Student.

$$x = \frac{n}{3} + z^2 \sqrt{2n/9} \quad (\text{Equação 7})$$

Devido à pandemia provocada pelo novo Coronavírus, o teste foi aplicado ao ar livre no IFCE *Campus* Fortaleza, utilizando-se mesa individual para o provador (Figura 7) a fim de minimizar o risco de contágio e disseminação do vírus. Foram recrutadas pessoas de ambos os sexos, com faixa etária entre 18 e 60 anos de idade, entre servidores e terceirizados do IFCE, consumidores de produtos lácteos, não treinados e dispostos a consumir manteiga. O recrutamento dos analistas foi feito pessoalmente e através de postagem em grupos de trabalho no aplicativo *Whatsapp*. Os participantes receberam o “Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE” (APÊNDICE A), onde havia uma explicação sobre o projeto, com o objetivo, riscos e benefícios aos participantes.

Figura 7 - Aplicação do teste triangular da manteiga adicionada de PPSL.



As manteigas com o antioxidante natural (100 ppm) e sem antioxidante foram servidas aos julgadores. Cada provador um recebeu três destas amostras sendo duas iguais e uma diferente, servidas simultaneamente (Figura 8). As amostras foram codificadas com números de três dígitos aleatórios apresentadas em diversas combinações, sendo que duas amostras eram iguais e um diferente. Os avaliadores foram solicitados a provar as amostras da esquerda para a direita e assinalar na ficha (APÊNDICE B) a amostra diferente. Em complemento, obteve-se questões sobre características sociodemográficas (sexo, idade e escolaridade) e hábitos de consumo de manteiga.

Figura 8 - Distribuição das amostras de manteigas (duas iguais e uma diferente) codificadas com números de três dígitos aleatórios.



Fonte: Autor (2021).

O teste sensorial durou em média 10 min e as amostras de manteiga, aproximadamente 2 g, foram servidas a uma temperatura de 17 °C em pão branco. Um copo contendo aproximadamente 50 mL de água à temperatura ambiente foi servido para que o provador limpasse o palato ao provar a amostra seguinte.

4.14 Análises estatísticas

Todos os testes foram realizados em triplicata, relatados como a média \pm desvio padrão. Os testes de análise de variância (ANOVA) foram usados para determinar a diferença estatística usando o software *Statistic 7*[®] (versão 7, IBM Corp., Armonk, NY, EUA). Diferenças significativas entre as médias foram determinadas usando o teste de Tukey (HSD) ($p < 0,05$). O Teste de t-Student foi utilizado para análise do resultado sensorial, onde há comparação entre duas amostras, as quais não atendiam aos requisitos da análise de variância.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Estudo para seleção de agente encapsulante

5.1.1 Otimização da obtenção do pó de própolis microencapsulado em soro de leite

Nesta etapa foram usados como agentes encapsulantes o soro de leite em pó e os adjuvantes maltodextrina e goma arábica comerciais (Tabela 3).

Tabela 3 - Resultados do planejamento fatorial para secagem por aspersão em secador *spray dryer* do extrato etanólico de própolis.

| Ensaio | Variáveis independentes | | Respostas experimentais* | |
|----------|--------------------------|---|--------------------------|---|
| | T _{Ent} (°C) | Q _{alim.} (mL.min ⁻¹) | Rendimento (%) | ABTS (μmols trolox.g ⁻¹) |
| 1 | 130 | 5 | 51,97 ^b | 134,52 ⁱ |
| 2 | 130 | 9 | 57,77^d | 188,66^a |
| 3 | 172 | 5 | 60,87^e | 172,91^c |
| 4 | 172 | 9 | 70,87 ^c | 97,48 ^f |
| 5 | 121 | 7 | 58,61 ^d | 147,22 ^d |
| 6 | 181 | 7 | 69,23 ^c | 78,21 ^g |
| 7 | 151 | 4 | 54,32 ^a | 121,55 ^e |
| 8 | 151 | 10 | 63,01^e | 178,17^b |
| 9 (C) | 151 | 7 | 61,57 ^e | 138,22 ^h |
| 10 (C) | 151 | 7 | 62,78 ^e | 135,52 ^{ih} |
| 11 (C) | 151 | 7 | 62,99 ^e | 136,44 ^{ih} |

T_{Ent} = Temperatura de entrada. Q_{alim} = Vazão de alimentação *Médias da triplicata das secagens com letras iguais na mesma coluna, não diferem entre si estatisticamente ($p < 0,05$).

Fonte: Autor (2021).

Houve diferença significativa ($p < 0,05$) no planejamento para a variável atividade antioxidante com valores mais elevados as quais puderam ser observadas no ensaio 3 (172,91 μmols trolox. g⁻¹ de ± 0,07), ensaio 2 (188,66 μmols trolox.g⁻¹ ± 0,09) e ensaio 8 (178,17 μmols trolox.g⁻¹ ± 0,04). Dentre estas atividades antioxidantes, os maiores rendimentos foram observados nos ensaios 3 e 8, que se apresentaram estatisticamente iguais.

Considerando o rendimento como resposta de interesse, o valor da temperatura de entrada (variável independente) foi decisivo para definir as condições adequadas para produção de pó de extrato de própolis, já que estatisticamente os ensaios 3 e 8 foram semelhantes. Nestes ensaios considerou-se que para obtenção de pós encapsulados com soro de leite é necessário utilizar mais energia térmica para remoção da água e consecutivamente prolongamento da transição vítrea (SCHUCK et al., 2015) e que temperaturas mais elevadas levam à micropartículas mais túrgidas (BOTH; BOOM; SCHUTYSER, 2020), sendo desta forma selecionado o ensaio 3 com as melhores condições, sendo temperatura de entrada do ar: 172 °C e vazão de alimentação 5 mL.min⁻¹.

5.1.1.1 Influência da temperatura e vazão sobre o rendimento na produção do pó de própolis de abelhas africanizadas

Em geral, os valores de rendimento foram próximos e variaram de 51,9% a 70,87%. Os pontos centrais do delineamento (9, 10 e 11) e os ensaios identificados como 3 (60,87%) e 8 (63,01%) não diferiram estatisticamente entre si. Resultados semelhantes foram encontrados por Busch et al. (2017) em um estudo de encapsulação do extrato etanólico de própolis em gomas arábica e vinal observaram rendimentos entre 60 e 68%. Baysan et al. (2021) em estudos com extratos de própolis em diferentes tipos de materiais encapsulantes observaram valores de rendimento entre 15 e 67%. Um valor de rendimento de 54% para obtenção de microcápsulas de extrato de própolis com proteínas de ervilha foi relatado por Jansen-Alves et al. (2019).

O efeito das variáveis, o coeficiente de regressão e a significância sobre o rendimento do PPSL obtido por aspersão via *spray drying* estão na Tabela 4. O efeito estimado indica o quanto cada fator influi na resposta estudada, ou seja, quanto maior o valor em módulo, maior será sua influência. Um efeito positivo indica que o aumento da variável provoca um aumento na resposta, ao contrário, ocorre com um efeito negativo.

Tabela 4 - Efeito estimado, erro padrão, coeficiente e significância estatística, para cada fator no modelo codificado para o rendimento para obtenção do PPSL por secagem *spray drying*.

| Fator | Efeito estimado | Erro padrão | Coeficiente de regressão | *p |
|---|-----------------|-------------|--------------------------|-----------------|
| Média/Intercepto | 62,40245 | 0,837027 | 62,44667 | 0,000000 |
| Temperatura de entrada (L) | 9,25474 | 1,025144 | 4,62737 | 0,000279 |
| Temperatura de entrada (Q) | 1,01208 | 1,220165 | 0,50604 | 0,444624 |
| Vazão (L) | 7,02238 | 1,025144 | 3,51119 | 0,001013 |
| Vazão (Q) | -4,24292 | 1,220165 | -2,12146 | 0,017709 |
| Temperatura de entrada <i>versus</i> vazão de alimentação (L x Q) | 2,10000 | 1,449773 | 1,05000 | 0,207145 |

*Significância a 95% de confiança ($p < 0,05$). Fonte: Autor (2021).

A obtenção do pó não foi significativa ($p < 0,05$) para os fatores temperatura de entrada (Q) e para interação temperatura de entrada *versus* vazão de alimentação (L x Q). Os efeitos positivos e significativos de temperatura e vazão lineares, indicam que o aumento desses fatores exerce aumento no rendimento do PPSL. Apenas os fatores lineares e quadrático da vazão (x_2) contribuíram para o modelo preditivo do rendimento de obtenção do pó de própolis.

A análise de variância (Tabela 5) mostrou que o modelo obtido foi adequado para correlacionar o rendimento com a temperatura de entrada e vazão de alimentação. O coeficiente de determinação (R^2) explicou 94,37% a variação dos dados observados. Portanto, com base no teste F e na avaliação do coeficiente de determinação, o modelo foi considerado preditivo.

Tabela 5 - Análise de variância do modelo de regressão para o rendimento do PPSL obtido por secagem via *spray drying*.

| | GL | SQ | QM | F _{calc} | F _{tab} | R ² (%) |
|-----------------|----|----------|----------|-------------------|------------------|--------------------|
| Regressão | 3 | 300,2484 | 100,0828 | 39,12 | 4,35 | 94,37 |
| Resíduo | 7 | 17,9074 | 2,5582 | | | |
| Falta de ajuste | 5 | 16,7325 | 3,3465 | 5,69 | 19,30 | |
| Erro puro | 2 | 1,1749 | 0,58745 | | | |
| Total | 10 | 318,1558 | | | | |

*Significância a 95% de confiança ($p < 0,05$). SQ = soma quadrática; GL = Grau de Liberdade; QM = Média Quadrática. Fonte: Autor (2021).

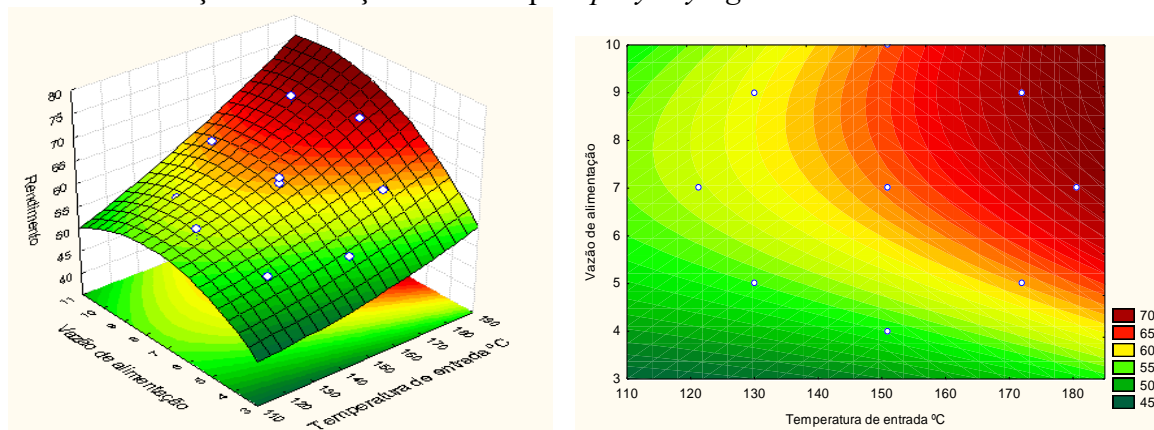
O modelo codificado que considera apenas os fatores significativos para representar o rendimento de obtenção do pó de própolis microencapsulado está descrito na Equação 8.

$$Y_{\text{Rend}} = 62,45 + 4,2674 x_1 + 3,5112 x_2 - 2,1215 x_2^2 \text{ (Equação 8)}$$

Onde: Y_{Rend} = rendimento (%); x_1 = temperatura de entrada (°C) e x_2 = vazão de alimentação (mL.min⁻¹).

As superfícies de respostas para a variável rendimento na obtenção do pó de própolis microencapsulado em soro de leite estão apresentados a seguir (Figura 9).

Figura 9 - Superfícies de resposta para o rendimento em função da temperatura de entrada e da vazão de alimentação na obtenção do PPSL por *spray drying*.



Fonte: Autor (2021).

Notadamente, existe uma tendência em aumentando a temperatura de entrada provocar o aumento do rendimento do produto. Há uma região de inflexão que se observa na curva que promove diminuição do rendimento provocado pelo efeito negativo da vazão em seu efeito quadrático nas temperaturas mais baixas.

5.1.1.2 Influência da temperatura e vazão sobre a atividade antioxidante do pó de extrato própolis de abelhas africanizadas

As condições selecionadas para atividade antioxidante foram geradas em temperatura de entrada 172 °C e vazão de alimentação 5 mL.min⁻¹ as quais geraram 172,91 μmols trolox.g⁻¹ de ± 0,07 para o PPSL. Este valor é maior do que o obtido por Reis et al. (2017) nas mesmas condições de extração dos compostos bioativos. Esses autores relataram 71,84 μmol trolox.g⁻¹ em microcápsulas de própolis empregadas para aumentar a estabilidade de armazenamento em carnes de hambúrguer.

As respostas para o efeito estimado, erro padrão e a significância das variáveis temperatura e vazão sobre a capacidade antioxidante do PPSL obtido por *spray drying* estão apresentados na Tabela 6.

Tabela 6 - Efeito estimado, erro padrão, coeficiente e significância estatística, para cada fator no modelo para a capacidade antioxidante do PPSL obtido por aspersão *spray drying*.

| Fator | Efeito estimado | Erro padrão | Coeficiente de regressão | *p |
|--|------------------------|--------------------|---------------------------------|-----------------|
| Média/Intercepto | 136,7267 | 11,90005 | 136,7267 | 0,000088 |
| Temperatura de entrada (L) | -37,5962 | 14,57452 | -18,7981 | 0,049457 |
| Temperatura de entrada (Q) | -15,4592 | 17,34715 | -7,7296 | 0,413664 |
| Vazão (L) | 14,6957 | 14,57452 | 7,3478 | 0,359580 |
| Vazão (Q) | 21,6858 | 17,34715 | 10,8429 | 0,266579 |
| Temperatura de entrada versus vazão de alimentação (L x Q) | -64,7850 | 20,61148 | -32,3925 | 0,025575 |

*Significância a 95% de confiança ($p < 0,05$). Fonte: Autor (2021).

Os efeitos estimados da temperatura de entrada e da vazão de alimentação sobre a capacidade antioxidante, os termos quadráticos (Q) da temperatura e da vazão e o efeito linear da vazão não apresentaram significância estatística ao nível de 95% ($p < 0,05$). Os efeitos positivos de vazão (L e Q) mostraram-se determinantes para a obtenção do pó. Enquanto os demais efeitos estimados são de influência negativa, em que um aumento deles vai acarretar diminuição na capacidade antioxidante.

A análise de variância (Tabela 7) dos valores obtidos demonstrou que o modelo apresentou regressão significativa, considerando o coeficiente de determinação (R^2) de 0,8029. A influência individual e a interação dos fatores são explicadas da variação dos dados observados descrevendo o funcionamento do processo em 80%.

Tabela 7 - Análise de variância para a capacidade antioxidante do pó de própolis obtido por aspersão *spray drying*.

| | GL | SQ | QM | F _{calc} | F _{tab} | R ² (%) |
|------------------|----|----------|---------|-------------------|------------------|--------------------|
| Regressão | 5 | 8816,77 | 1763,35 | 4,07 | 5,05 | 80,29 |
| Resíduo | 5 | 2164,27 | 432,85 | | | |
| Falta de ajuste. | 3 | 2160,50 | 720,16 | 383,06 | 19,16 | |
| Erro puro | 2 | 3,77 | 1,88 | | | |
| Total | 10 | 10981,04 | | | | |

*Significância a 95% de confiança ($p < 0,05$). SQ = soma quadrática; GL = Grau de Liberdade; QM = Média Quadrática. Fonte: Autor (2021).

Apesar do modelo proposto explicar 80% das respostas, ele não foi considerado satisfatoriamente preditivo. De acordo com o teste F, houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre as variáveis independentes observadas com relação a taxa de capacidade antioxidante e houve uma grande falta de ajuste observada na ANOVA (383,06), modelo não está ajustado aos dados.

Através das análises do planejamento experimental observou-se que não pôde obter um ponto ótimo a partir das superfícies de respostas. Desta forma após a análise estatística do planejamento foram utilizados como condições adequadas de trabalho as do ensaio 3: temperatura de 172 °C e vazão de alimentação de 5 mL.min⁻¹ como as mais apropriadas para a produção do pó de própolis encapsulado em soro de leite.

5.1.3 Teste de validação para obtenção do pó de extrato de própolis em soro de leite (PPSL)

Para fins de validação das melhores condições operacionais encontradas de temperatura e vazão foram realizados testes adicionais (Tabela 8) comparando o uso dos diferentes agentes encapsulantes empregados neste trabalho. Os ensaios de avaliação da atividade antioxidante (ABTS) para a secagem por aspersão via *spray dryer* do extrato etanólico de própolis, foi realizado sob as melhores condições encontradas no delineamento experimental com temperatura do ar de secagem a 172 °C e vazão de alimentação a 5 mL.min⁻¹.

Tabela 8 - Ensaio de avaliação da capacidade antioxidante para a secagem por aspersão via *spray dryer* do extrato etanólico de própolis. $T_{ent} = 172\text{ }^{\circ}\text{C}$, $Q_{alim} = 5\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$.

| Agente encapsulante | Composição % | | | | | Rendimento (%) | ABTS ($\mu\text{mols trolox/g}$)* |
|------------------------|--------------|------|------|-----|------------------|-----------------------------|--|
| | EPP | SL | MD | GA | H ₂ O | | |
| SL, MD e GA | 21,7 | 32,8 | 11,2 | 5,6 | 28,7 | 62,1 ^c \pm 0,2 | 182,3 ^a \pm 0,30 |
| MD e GA | 14,5 | - | 7,4 | 3,7 | 74,4 | 60,8 ^b \pm 0,4 | 182,4 ^a \pm 0,40 |
| SL | 16,5 | 83,5 | - | - | - | 55,2 ^a \pm 0,3 | 183,2 ^a \pm 0,07 |

T_{ent} = Temperatura de entrada. Q_{alim} = Vazão de alimentação. MD = Maltodextrina; GA = Goma arábica; PSSL = Soro de leite. *Valores médios, na mesma coluna, seguidos de letras minúsculas diferentes apresentam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$). Fonte: Autor (2021).

Os resultados do teste de validação sugerem a viabilidade do soro de leite como material de parede. Não houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre os agentes quanto a atividade antioxidante final. A atividade antioxidante inicial do extrato etanólico de própolis utilizado foi de 17,4 $\mu\text{mols trolox/g}$, sendo seu efeito de concentração observado nestas condições foi cerca de 10 a 11 vezes do valor inicial da capacidade antioxidante superficial (sem ruptura das micropartículas).

O valor de rendimento médio na obtenção do pó de própolis encapsulado em soro de leite (Tabela 8) foi de $55,2 \pm 0,3$ calculado com base na equação 2. Esse parâmetro está diretamente condicionado ao processo de secagem, material e *design* do equipamento de secagem (JANSEN-ALVES et al., 2018). Neste sentido, o soro de leite utilizado como material de parede, possui alta higroscopicidade e contribuiu para retenção de partículas ao longo do processo nas paredes da câmara de secagem do equipamento, justificando o valor do rendimento encontrado.

Ahmad; Mudgil; Maqsood (2019) e Bhusari et al. (2014) ressaltam as qualidades do uso do soro de leite como material encapsulante por suas propriedades emulsificantes e retenção de compostos bioativos, advertindo sobre sua capacidade hidrofílica pela composição em proteínas, que podem alterar a solubilidade do produto elaborado devido a uma eventual polimerização.

A validação comprovou a eficácia do soro de leite como agente encapsulante apto a conter os componentes bioativos do extrato de própolis sem combinações com outros adjuvantes. Tal ação é justificada pelo fato de que as proteínas contidas no soro de leite são consideradas biopolímeros com grupos funcionais capazes de interagir e se ligar a uma ampla gama de compostos bioativos (CHUYEN et al., 2019; SOLEIMANIFARD et al., 2021).

O soro de leite utilizado como agente encapsulante foi analisado quanto ao teor de proteínas antes e após processo de secagem por aspersão via *spray dryer*. Os valores encontrados foram de 0,9 % de proteínas para o soro de leite *in natura* e de 12 % de proteínas para soro de leite em pó, ambos estavam conformes a Instrução normativa nº 80, de 13 de agosto de 2020 do MAPA, que fixa os padrões de identidade e qualidade para o soro de leite em diferentes estados físicos. A secagem do soro permitiu uma concentração de proteínas 13 vezes maior, sendo promissor a utilização como agente encapsulante proteico para obtenção do PPSL.

Oportunamente, a partir do ensaio de validação o soro de leite passou a ser utilizado unicamente como material de parede sem adição de adjuvantes para obtenção do pó de extrato de própolis a ser utilizado nas demais etapas de estudo desta pesquisa, pois exibiu um perfil viável como agente encapsulante, dessa forma sendo possível empregar o soro de leite na tecnologia de microencapsulação, contribuindo para sua maior utilização e redução do impacto ambiental ao não ser desperdiçado.

5.2 Avaliação das propriedades físico-químicas e estruturais do PPSL

5.2.1 Caracterização físico-químicas do PPSL

As propriedades físico-químicas do PPSL foram analisadas para os parâmetros de umidade, higroscopicidade, grau de *caking* e solubilidade (Tabela 9).

Tabela 9 - Propriedades físico-químicas do PPSL obtido em *spray dryer*.

| Amostra | Umidade (%) | Higroscopicidade (g/100g) | Grau de <i>caking</i> (%) | Solubilidade (%) |
|---------|-------------|---------------------------|---------------------------|------------------|
| PPSL | 9,1 ± 0,5 | 8,6 ± 0,3 | 58,3 ± 0,9 | 80,0 ± 0,95 |

Fonte: Autor (2021).

O teor de umidade baixo é um dos fatores necessários para garantir a estabilidade e impedir a aglomeração de pós atomizados. De modo geral, alimentos com teor de umidade entre 3 a 10 g/100 g garantem um bom o armazenamento sem sofrer alterações (DA SILVA et al., 2013), contudo o teor do PPSL encontrado (9,1 %), garante uma boa estabilidade sendo esse valor de umidade justificado à capacidade da proteína do soro de leite se ligar a muitas moléculas de água através de suas ligações de hidrogênio (EZHILARASI et al., 2013; DA SILVA et al., 2013).

Valor semelhante encontrado por Andrade et al. (2018) que observaram que a umidade das micropartículas de própolis obtidas em secador *spray dryer* foi influenciada apenas pela característica hidrofílica/hidrofóbica do encapsulante, ou seja, a umidade variava de acordo com o material de parede utilizado, as micropartículas de própolis vermelha preparadas com GA e MD apresentaram os maiores teores de umidade.

Baysan et al. (2021) encontraram umidade dos pós de própolis encapsulados (com diferentes combinações entre os encapsulantes: maltodextrina, goma arábica, lactose, gelatina e caseinato de sódio) e secos por secagem por aspersão em *spray dryer* entre 5,43 e 10,11%, afirmam que a temperatura de transição vítrea e o tipo de material encapsulante, estão entre os fatores que facilitam a transferência de umidade no processo de secagem.

A higroscopicidade é considerado um parâmetro crítico de qualidade para microcápsulas, pois a presença de água pode afetar a fluidez do pó. Essa característica está diretamente relacionada ao teor de umidade, os pós com menor teor de umidade apresentam maior capacidade de absorção da umidade ambiente, o que está relacionado ao maior gradiente de concentração de água entre o produto e o ar circundante. Esse fato pode ser controlado a depender da matriz a ser utilizada (FERRARI; GERMAN; DE AGUIRRE, 2011). O grau de *caking* ($58,3 \pm 0,9$ %) pode ser classificado conforme GEA Niro *Research Laboratory* (2005) como pó com muita formação de *caking*. A aglomeração de um pó alimentício depende de sua higroscopicidade atribuída à absorção de umidade. A água é absorvida na superfície das partículas, formando uma solução saturada e, portanto, tornando as partículas pegajosas e capazes de formar pontes líquidas (GOULA; ADAMOPOULOS, 2010), uma característica que não foi observada fisicamente, o que pôde ser comprovada na análise de distribuição de tamanho de partículas (item 5.2.2).

Jansen-Alves et al. (2018) relatam que apesar de todas as vantagens relacionadas ao processo de secagem por aspersão, os pós resultantes da secagem de materiais com baixa temperatura de transição vítrea geralmente apresentam alguns problemas como pegajosidade e alta higroscopicidade. Nesse estudo, a higroscopicidade encontrada (8,6 %) está relacionado ao alto teor de umidade encontrado. Esse resultado foi menor do que os encontrados nos estudos de Busch et al. (2017) e Da Silva et al. (2011), respectivamente de 8,5 % e 13,1%; valores considerados baixos pelos pesquisadores.

A solubilidade do PPSL ($80,0 \pm 0,95$ %) foi relativamente alta considerando que a própolis é uma substância resinosa de compostos hidrofílicos e hidrofóbicos que podem prejudicar sua solubilidade em solventes polares como a água. Diante do exposto, o problema pode ser superado pelo uso de um transportador hidrófilo durante o processo de secagem, como

uso do soro de leite como material encapsulante por suas propriedades emulsificantes e retenção de compostos bioativos, advertindo sobre sua capacidade hidrofílica pela composição em proteínas, as quais podem alterar a solubilidade do produto elaborado devido a um eventual polimerização (BHUSARI et al., 2014; DA SILVA et al., 2011; FRANCESCHINIS et al., 2015).

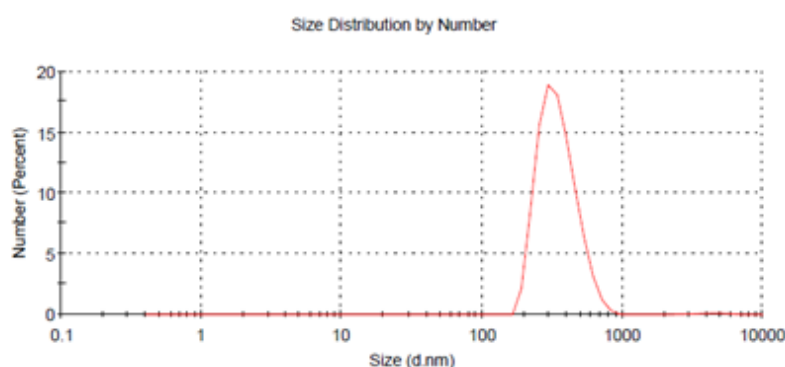
Reis et al. (2017), reforça a escolha do concentrado proteico de soro de leite (WPC) como um bom material encapsulante, adequado para ser usado num processo de secagem por aspersão em *spray dryer* ou *spray drying*. A mesma técnica foi utilizada por Andrade (2013) para obtenção de própolis em pó utilizando o soro líquido e obteve um produto final com baixa umidade, uniformidade granulométrica, bom rendimento e conseguiu manter as características iniciais das matérias-primas.

5.2.2 Tamanho de partícula e potencial zeta

O tamanho das partículas e sua dispersão têm um importante papel na estabilidade coloidal por meio da repulsão eletrostática entre as partículas, encapsulação do produto, solubilidade, liberação e biodisponibilidade (HU et al., 2019; SOLEIMANIFARD; FEIZY; MAESTRELLI, 2021).

A Figura 10 retrata uma distribuição monomodal por número de partículas do pó de extrato de própolis encapsulado em soro de leite dispersos em água ultra Mili-Q. O grau de polidispersão observado a pH = 4,65 foi de 0,387 e o diâmetro médio de 514 nm (0,514 μm) com tamanhos variando entre 105,7 nm e 955,4 nm.

Figura 10 - Distribuição de tamanho de partículas do PPSL obtido por secagem por aspersão em *spray dryer*.



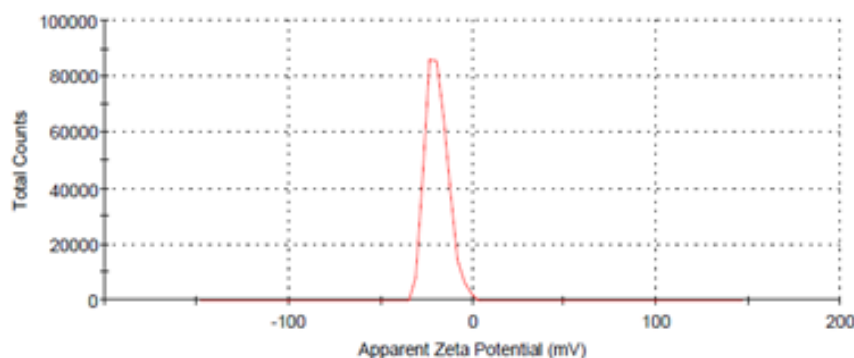
Fonte: Autor (2021).

Chang et al. (2020) correlacionaram em seus estudos a distribuição do tamanho das partículas picos em torno de 170 nm como uniforme, indicando que o isolado proteico de soro de leite pode reduzir a agregação da própolis e melhorar sua hidrossolubilidade. Sugerindo-se que os valores encontrados neste estudo utilizando o soro de leite como matriz, podem facilitar sua solubilidade.

Ong et al. (2017) encontraram índice de polidispersidade em nanopartículas de quitosana-própolis entre 0,225 e 0,573 sugerindo que elas estavam monodispersas. Meyagusku (2014) relata que as melhores nanopartículas obtidas de diferentes formulações do fármaco são aquelas que apresentaram menor diâmetro de partícula e menor índice de polidispersão, conforme o que foi encontrado neste trabalho.

Em relação ao potencial ζ do PPSL o valor encontrado foi negativo e relativamente baixo (-19,8 mV) (Figura 11). Baysan et al. (2021) justificam esse valor à formação insuficiente de ligações cruzadas devido à falta de desnaturação das proteínas do soro de leite.

Figura 11 - Potencial ζ do PPSL obtido por aspersão *spray drying*.



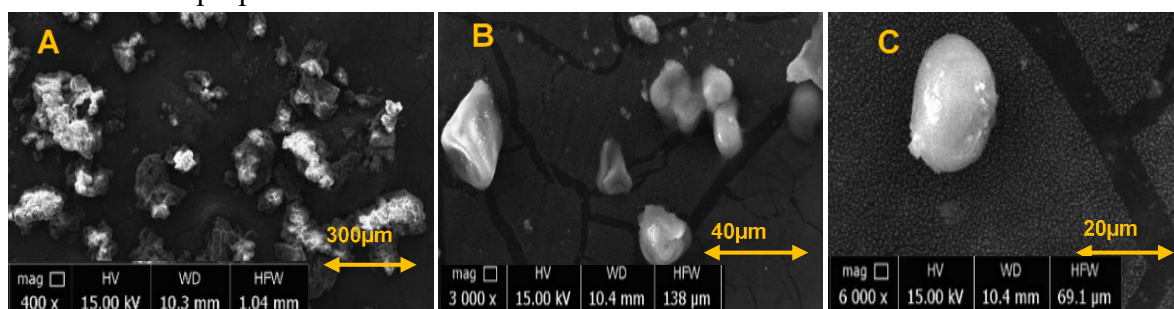
Fonte: Autor (2021).

De acordo com Kong e Kutty (2021), um valor em torno de -30 mV é capaz de impedir a agregação das nanopartículas devido à força de atração de van der Waals entre elas. Porém a agregação de micropartículas carregadas com própolis pode ser evitada apesar do menor valor do potencial zeta, pois as cadeias dos compostos fenólicos hidrofílicos e hidrofóbicos impedem essa ação (KONG; KUTTY, 2021).

5.2.3 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

As microscopias eletrônicas de varredura (MEV) têm sido muito empregadas na obtenção de informações relativas à forma e ao tamanho das micropartículas. As microfotografias dos pós atomizados carregados com extrato de própolis estão reproduzidos na Figura 12 em três níveis de ampliações diferentes, A (400 vezes), B (3000 vezes) e C (6000 vezes) permitiu evidenciar a organização morfológica do PPSL na qual os compostos bioativos do extrato e própolis está circundado por uma parede polimérica.

Figura 12 - Microfotografias de microscopia de luz de varredura das micropartículas carregadas com extrato de própolis.



Fonte: Autor (2021)

Nas imagens, o PPSL apresenta-se com tamanhos não homogêneos, algumas com formatos irregulares, mas maioria no formato esférico, sem fissuras, rachaduras ou rupturas e aparentemente intactas protegendo os materiais internos. A ausência de fissuras ou poros é relevante para uma proteção adequada, garantindo a retenção do agente encapsulado (JANSEN-ALVES et al., 2019). Na Figura 13B, observa-se adesão de partículas menores na superfície de partículas maiores formando aglomerado aparente, classificando o pó como ligeiramente higroscópico e de muita formação de *caking*.

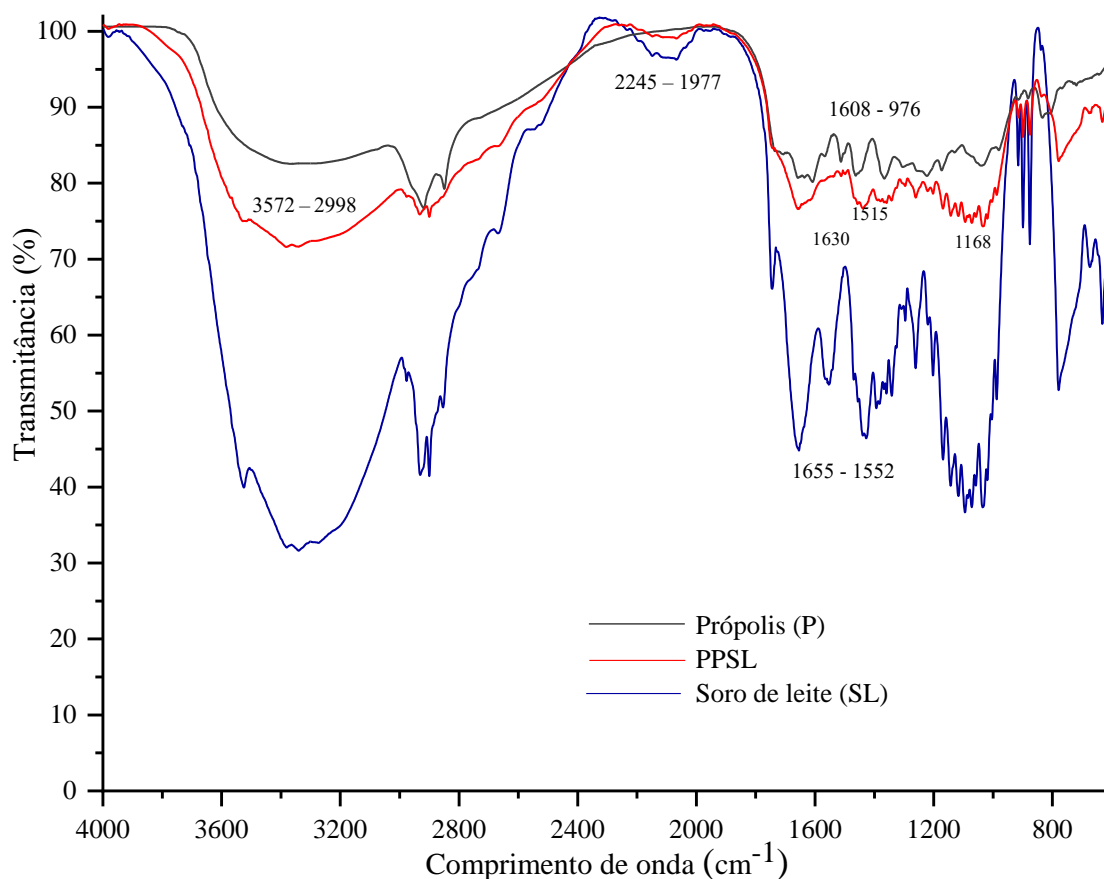
O tamanho das partículas medidas obtidas na leitura por MEV variou entre 5,84 μm a 8,3 μm. Segundo Saifullah et al. (2019), partículas que apresentam essas medidas, independente do formato, são classificadas como micropartículas.

Algumas não se encontravam túrgidas, apresentando regiões murchas. Esta morfologia é esperada de produtos como soro de leite que perdem grande parte da umidade dentro do *spray dryer*, uma vez que a quantidade de água que é possível evaporar a vácuo é limitada. A ausência de amassados, característica morfológica das micropartículas quando apresentam pequenas concavidades, indica o tempo lento e adequado para a evaporação do solvente (PAULO et al., 2021).

5.2.4 Espectroscopia no infravermelho (FTIR)

Os espectros no infravermelho da própolis *in natura* (P), do soro de leite (SL) em pó e do pó de extrato de própolis microencapsulado em soro de leite (PPSL) estão apresentados na Figura 13 a seguir.

Figura 13 - Espectros no infravermelho da própolis *in natura* (P), do soro de leite em pó (SL) e das microcápsulas de própolis encapsuladas em soro de leite (PPSL).



Fonte: Autor (2021).

Na Figura 13 observa-se nos três espectros a presença de banda larga e intensa característica de hidroxila, evidenciada nas deformações axiais de O-H ($3572 - 2998 \text{ cm}^{-1}$) geralmente associadas a fenóis ou água adsorvida (JÚNIOR et al., 2013). Almeida (2017) e Andrade et al. (2018), relacionam estas bandas também como característico ao alongamento OH de água fisicamente adsorvida.

As bandas em 1171 cm^{-1} e 1267 cm^{-1} correspondem as vibrações de estiramento de C–O e C–O–C em álcoois, ésteres e açúcares presentes na própolis (EL-GUENDOUZ et al., 2019), as quais estão presentes nos espectros das três amostras analisadas.

O PPSL e o extrato de própolis apresentaram espectros muito semelhantes no FTIR. Em geral, as bandas presentes de 1608 cm^{-1} a 970 cm^{-1} aparecem com menor intensidade nas microcápsulas, o que pode estar associado a uma possível interação entre estes materiais (JANSEN-ALVES, 2019). Esses resultados sugerem que a própolis foi encapsulada em partículas do soro de leite, o que limitou a vibração de várias ligações dos componentes da própolis.

Particularmente, a diminuição da intensidade observada nas bandas de deformação axial da amida (1650 cm^{-1}) e deformação angular de amina em 1560 cm^{-1} no infravermelho das microcápsulas pode segundo Júnior et. al. (2013) ser atribuído a interação entre estes grupamentos e os grupos fenólicos das substâncias presentes na própolis encapsulada no soro de leite, ratificando a incorporação destes antioxidantes nas microcápsulas.

Para Almeida (2017), a banda a 1025 cm^{-1} apresentada nas microcápsulas pode ser atribuída ao estiramento de ligação éter aromático C–O, presente comumente em flavonoides. Rassu et al. (2015) associam as bandas entre 1100 cm^{-1} e 1600 cm^{-1} a presença de lipídios e flavonoides na estrutura da própolis, incluindo os grupos principais de –COO e –O–.

Bandas entre 2924 cm^{-1} e 2883 cm^{-1} podem ser atribuídas a vibrações de alongamento dos grupos C=C em flavonoides e aminoácidos, ou a vibrações de alongamentos de C = O e de C = C, ou a vibração assimétrica de –NH ou a vibração de alongamento do C=O em lipídios e flavonoides (OLIVEIRA et al., 2016).

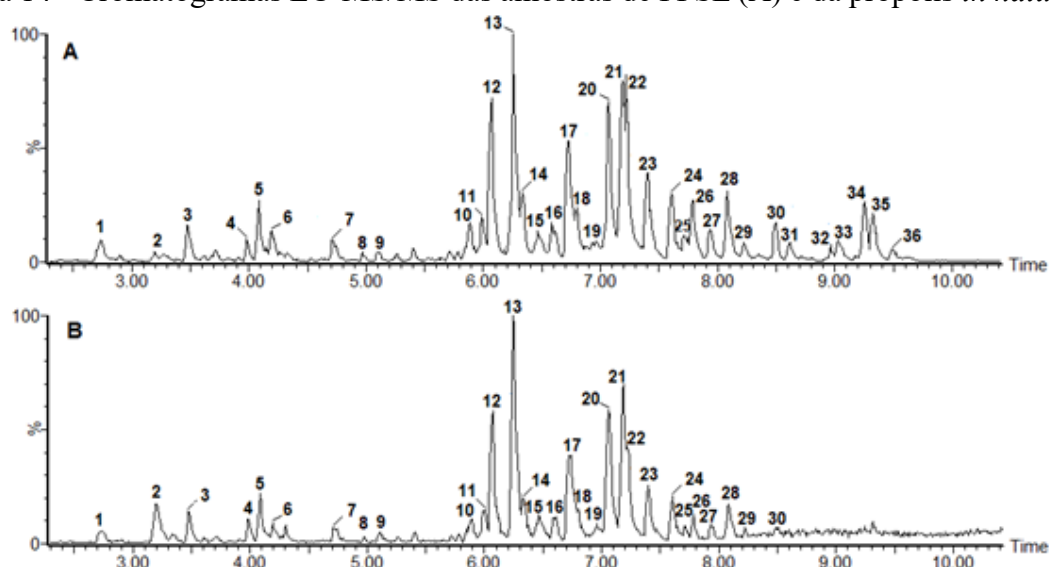
Uma banda de 1513 cm^{-1} pode ser relacionada a deformações de anéis aromáticos e a flavonoides. As bandas com 945 cm^{-1} e uma banda em 878 cm^{-1} estão provavelmente relacionadas à vibração do anel aromático ou ao etanol (JÚNIOR et al., 2013; SHARAF; HIGAZY; HEBEISH, 2013).

Mot, Silaghi-Dumitrescu e Sârbu (2011) identificaram bandas a 1515 cm^{-1} , 1633 cm^{-1} e 1683 cm^{-1} como sendo específicas para extratos de própolis, considerado os alongamentos e modos vibracionais dos anéis polifenólicos. A banda a 1515 cm^{-1} corresponde a um modo vibratório aromático, mas tem pouca relação com o comportamento antioxidante, enquanto a banda a 1630 cm^{-1} correlaciona-se a alguns compostos, como os flavonoides, e pode ser usada como parâmetro para medir a capacidade antioxidante. Ainda segundo estes autores a transmitância a 1168 cm^{-1} é uma característica espectroscópica da própolis ocorrendo em diferentes intensidades conforme a natureza do material.

5.3 Identificação dos compostos bioativos

A própolis *in natura* e pó de própolis encapsulado em soro de leite foram analisados por LC-ESI-qTOF-MS sendo encontrados os perfis de identificação qualitativos apresentados na Figura 15. Os cromatogramas (Figura 14) foram obtidos no modo de ionização eletrospray (ESI⁻) e a estrutura dos compostos foi determinada comparando os valores *m/z* dos espectros de MS/MS com a literatura.

Figura 14 - Cromatogramas LC-MS/MS das amostras de PPSL (A) e da própolis *in natura* (B).



Fonte: Autor (2021).

Os perfis cromatográficos apresentaram similaridade entre os picos majoritários, demonstrando que a presença dos componentes bioativos da própolis manteve-se mesmo após o processo de secagem por aspersão em *spray dryer*. Notadamente, nas condições analíticas empregadas, observou-se a predominância de flavonoides e seus derivados entre os compostos bioativos, sendo identificados 36 flavonoides entre flavanonas (picos 17, 30 e 36), fenol-éster (pico 2), flavonas (picos 8, 9, 16, 24, 25, 29 e 31), flavonóis (picos 1, 3 - 7, 10 - 15, 18 - 23, 26, 27, 28, 32, 33 e 34) e um isoflavonoide (pico 35). A numeração das estruturas foi baseada na ordem de eluição desses compostos nos cromatogramas.

A composição química da própolis é variável e complexa dependendo de fatores como a origem da amostra que está intimamente relacionada com a flora do entorno da colmeia, as características geográficas e climáticas do local, espécies de abelhas, fatores botânicos e geográficos (LIMA et al., 2018).

Os compostos bioativos determinados a partir da amostra de propolis verde usada nesta pesquisa estão apresentados no Apêndice C. Para a elucidação, estudos adicionais por ressonância magnética são necessários. Os espectros de massas bem como a fragmentação da molécula e suas fórmulas estruturais encontram-se no Apêndice D deste estudo.

Comparando as amostras, observou-se que os compostos: acacetina (31), kaempferol 7,4'-dimetil éter (32), kaempferol-3,4'-dimetil éter (33), quercetina 3,5,3'-trimetil éter (34), medicarpina (35), 8-prenilnaringenina (36) foram identificados somente nas microcápsulas de própolis, provavelmente por serem as espécies mais apolares da fração, uma vez que foram detectados no final da corrida cromatográfica, o que é esperado para a separação em uma coluna de octadecilsilano (C18), em que substâncias apolares são mais fortemente retidas pelo adsorvente do que pelos componentes polares (hidrofílicos), o que justificaria a ausência desses compostos no extrato de própolis.

Os flavonoides são as principais classes de compostos fenólicos em diversos produtos naturais (VIEIRA DE MORAIS et al., 2021). A quercetina, kaempferol, pinocembrina, apigenina e naringenina identificados nesta pesquisa e que se fizeram presente em ambas amostras, são compostos frequentemente relatados e reconhecidos como constituintes principais e mais importantes da própolis que exibem poder antioxidante (ANDRADE et al., 2018; RISTIVOJEVIĆ et al. 2018; ZUCCOLOTTO et al., 2019; BONIN et al., 2020).

Havsteen (2002) afirma que os flavonoides quando aplicados em alimentos são compostos relativamente estáveis, pois podem resistir à oxidação, temperaturas elevadas e variações de acidez, podendo proteger os ácidos graxos insaturados e eliminar radicais livres.

Algumas fontes de flavonoides para o consumo humano seriam as substâncias sintéticas e produtos à base de própolis. No entanto, nem todas as resinas da composição das própolis exibem quantidades significativas de compostos fenólicos. A composição da própolis está relacionada com a variedade de componentes fenólicos dentro de uma resina vegetal, mas também devido à combinação de muitas plantas diferentes visitadas pelas abelhas, particularmente em locais com diversidade fitogeográfica (FALCÃO et al., 2013; RIVERO-CRUZ et al., 2020).

Neste estudo, os resultados sugerem que a própolis interagiu com o soro de leite para formar complexos, gerando as micropartículas. Estudos semelhantes de Fu et al. (2016) com albumina sérica bovina e extrato de própolis identificaram sete flavonoides, sendo dois deles (apigenina e acacetina) também encontrados nesta pesquisa, e confirmaram que há interação dos flavonoides e polifenóis com as proteínas por meio de interação hidrofóbica e ligações de hidrogênio.

5.4 Avaliação da eficiência da encapsulação e da atividade antioxidante

Para calcular a eficiência da microencapsulação foi quantificado primeiramente os compostos fenólicos totais, relatados na literatura como compostos totais livres ou superficiais das microcápsulas (118,64 mg/g) e após a ruptura (729,21 mg/g) das micropartículas, sendo encontrado uma eficiência de $83,7 \% \pm 0,03$.

Os resultados da eficiência da encapsulação e de avaliação das atividades antioxidantes a partir das metodologias utilizadas estão apresentados na Tabela 10.

Tabela 10 - Atividade antioxidante do PPSL após ruptura das microcápsulas.

| Amostras | Eficiência da encapsulação ^a | Atividade antioxidante (TE, $\mu\text{mols Trolox} \cdot \text{g}^{-1}$) | | |
|--------------|---|---|----------------------|---------------------|
| | | ABTS | DPPH | FRAP |
| PPSL 100 ppm | $83,7 \% \pm 0,08$ | 1220,57 ^a | 1050,55 ^a | 5712,5 ^a |
| BHT 100 ppm | - | 1122,88 ^b | 996,51 ^b | 825,13 ^b |

^a A partir do teor de compostos fenólico totais.

*Valores médios, na mesma coluna, seguidos de letras minúsculas diferentes apresentam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

Fonte: Elaborada pelo autor (2021).

Os resultados obtidos neste estudo foram considerados promissores. A eficiência de encapsulação encontrada foi semelhante ao de Zhang et al. (2018) que estudaram a atividade antioxidante e a liberação *in vitro* do extrato de própolis por agregação induzida por ácido usando zeína desnaturada por calor e carboximetilquitosana. Os autores encontraram eficiência ótima de encapsulação com base no conteúdo fenólico total de 83,36%.

Da Silva et al. (2013) obtiveram eficiência de 76% em pós de própolis elaborados com goma arábica. Reis et al. (2016) verificaram uma eficiência da encapsulação de $76,86 \pm 0,02\%$ na microencapsulação da própolis brasileira utilizando amido modificado como material encapsulante. Andrade et al. (2018) relataram eficiência de microencapsulação entre 70 e 79% de extratos de própolis em sistemas com goma arábica. Nori et al. (2011) obtiveram 72,01% e 66,12% de eficiência em seus microencapsulados de extrato de própolis obtidos por coacervação complexa. Estes autores avaliaram como bem-sucedida a microencapsulação quando o resultado de compostos fenólicos de um pó apresenta um mínimo de material de superfície ativo e uma máxima retenção do material ativo, ou seja, um valor fenólico maior na ruptura das micropartículas do que seu valor em relação à superfície, efeito observado neste estudo.

A eficiência de encapsulação do PPSL encontrada neste trabalho foi superior aos valores encontrados na literatura, mostrando capacidade de retenção do soro de leite. Baysan et al. (2021) relatam que as proteínas do soro de leite protegem os materiais encapsulantes contra a oxidação, pois exibem boas propriedades emulsificantes.

Em termos, observando-se o valor dos compostos fenólicos contido dentro das microcápsulas (após ruptura), concluímos que o soro de leite reteve com eficácia o material bioativo do extrato de própolis. De acordo com Sahlan et al. (2017) uma boa eficiência na encapsulação deve ser em torno de 80%, porque mostra que o processo não elimina as substâncias ativas existentes.

O PPSL apresentou alta atividade antioxidante em todas as determinações quando comparado a amostra com BHT na mesma concentração, observando-se diferença significativa ($p < 0,05$) entre os ensaios para a mesma amostra, quanto em comparação entre as amostras. Os ensaios ABTS e DPPH são baseados na capacidade dos antioxidantes de reagir com os radicais livres, enquanto no ensaio FRAP mede-se a atividade de redução dos antioxidantes. A realização de um único teste para avaliar a atividade antioxidante pode não ser suficiente conforme relatado por (LIAUDANSKAS et al., 2021).

Os valores das atividades antioxidantes foram altos comparando a relatos na literatura. Dos Reis et al. (2017) obtiveram na microencapsulação de extrato de própolis (20%) com Capsul[®] valores de DPPH de $2,31 \pm 0,06 \mu\text{mols Trolox g}^{-1}$, ABTS de $71,84 \pm 1,75 \mu\text{mols Trolox g}^{-1}$ e FRAP de $3,39 \pm 0,01 \mu\text{mols Trolox g}^{-1}$. Os estudos da capacidade antioxidante realizados por Jansen-Alves et al. (2019) mostraram valores pelo método FRAP de $815,75 \mu\text{mols Trolox g}^{-1}$ e DPPH de $51,12 \mu\text{mols Trolox g}^{-1}$.

A vegetação ao redor das colmeias influencia na composição da própolis, que por sua vez é produzida a partir de resinas coletadas por abelhas da espécie *A. mellifera* L. Todas as características e qualidade da própolis coletada podem ser alteradas dependendo da diversidade vegetal da região, da variabilidade genética das abelhas rainhas, além do gênero e espécie das próprias abelhas que a produz, pois elas poderão conduzir a preferências por diferentes plantas (LIS et al., 2020). Estes fatores podem modificar os valores das capacidades antioxidantes da própolis, sendo esta propriedade importante para a preservação dos alimentos durante o armazenamento e prolongamento do tempo de consumo (BASANTA et al., 2016).

Andrade et al. (2017) analisaram amostras de própolis marrom, verde e vermelha do Brasil e encontraram 471,51, 604,20 e 633,18 $\mu\text{mols Trolox g}^{-1}$, respectivamente, pelo método FRAP, valores inferiores aos obtidos neste estudo.

A avaliação da atividade inibidora do PPSL pelo método espectrofotométrico FRAP revelou capacidade antioxidante de 5712,5 $\mu\text{mols Trolox}\cdot\text{g}^{-1}$, um valor cerca de sete vezes maior que do BHT (825,13 $\mu\text{mols Trolox}\cdot\text{g}^{-1}$). Quando a mesma amostra (PPSL) foi analisada a partir dos métodos DPPH (1050,55 $\mu\text{mols Trolox}\cdot\text{g}^{-1}$) e ABTS (1220,57 $\mu\text{mols Trolox}\cdot\text{g}^{-1}$), os valores também foram maiores que do BHT (DPPH 996,51 $\mu\text{mols Trolox}\cdot\text{g}^{-1}$, e ABTS 1122,88 $\mu\text{mols Trolox}\cdot\text{g}^{-1}$), caracterizando atividade sequestrante de radicais livres mais forte do que o antioxidante sintético (Tabela 10). Com os resultados obtidos, observou-se que os valores para atividade antioxidante são dependentes do método usado em sua avaliação.

Devido às condições metodológicas, pode-se observar a diminuição da atividade antioxidante de alguns compostos da própolis que abrangem não apenas compostos hidrofóbicos, mas também hidrofílicos. Por ser um produto natural, a própolis possui uma variedade e complexidade de compostos fenólicos com lipofilicidade diferenciada que poderão agir com mecanismos desiguais em diferentes meios (LIAUDANSKAS et al., 2021).

5.5 Estudos de estabilidade oxidativa em manteiga

A fim de avaliar a estabilidade química de amostras de manteigas contendo o pó de extrato de própolis microencapsulado em soro de leite (antioxidante) foram executados estudos de oxidação lipolítica a temperatura de 50 °C e de oxidação acelerada pelo método Rancimat. O acompanhamento cinético da degradação foi realizado para os parâmetros de índices de peróxido (IP), que infere sobre a fase primária de oxidação e de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), relacionado a fase rancificação dos óleos e gorduras.

5.5.1 Estudo cinético da degradação lipídica

Para a cinética de degradação PPSL e BHT foram testados nas concentrações de 50 e 100 ppm como inibidores da oxidação da manteiga a 50 ± 3 °C em períodos de 7, 21, 33 e 42 dias. Os efeitos protetores dos antioxidantes selecionados foram avaliados com base em sua capacidade de inibir a formação de produtos de oxidação e retardar a degradação de ácidos graxos poli-insaturados.

A modelagem cinética de degradação lipídica foi avaliada para ordem zero e de primeira ordem. Os valores da constante de velocidade k_0 ($\text{meq kg}^{-1} \text{min}^{-1}$) e k_1 (min^{-1}) nas condições do estudo estão apresentados na Tabela 11.

Tabela 11 - Parâmetros cinéticos a $50 \pm 3^\circ\text{C}$ para a oxidação da manteiga na presença dos diferentes sistemas antioxidantes testados: antioxidante sintético (BHT) e antioxidante natural PPSL (pó de própolis microencapsulado em soro de leite).

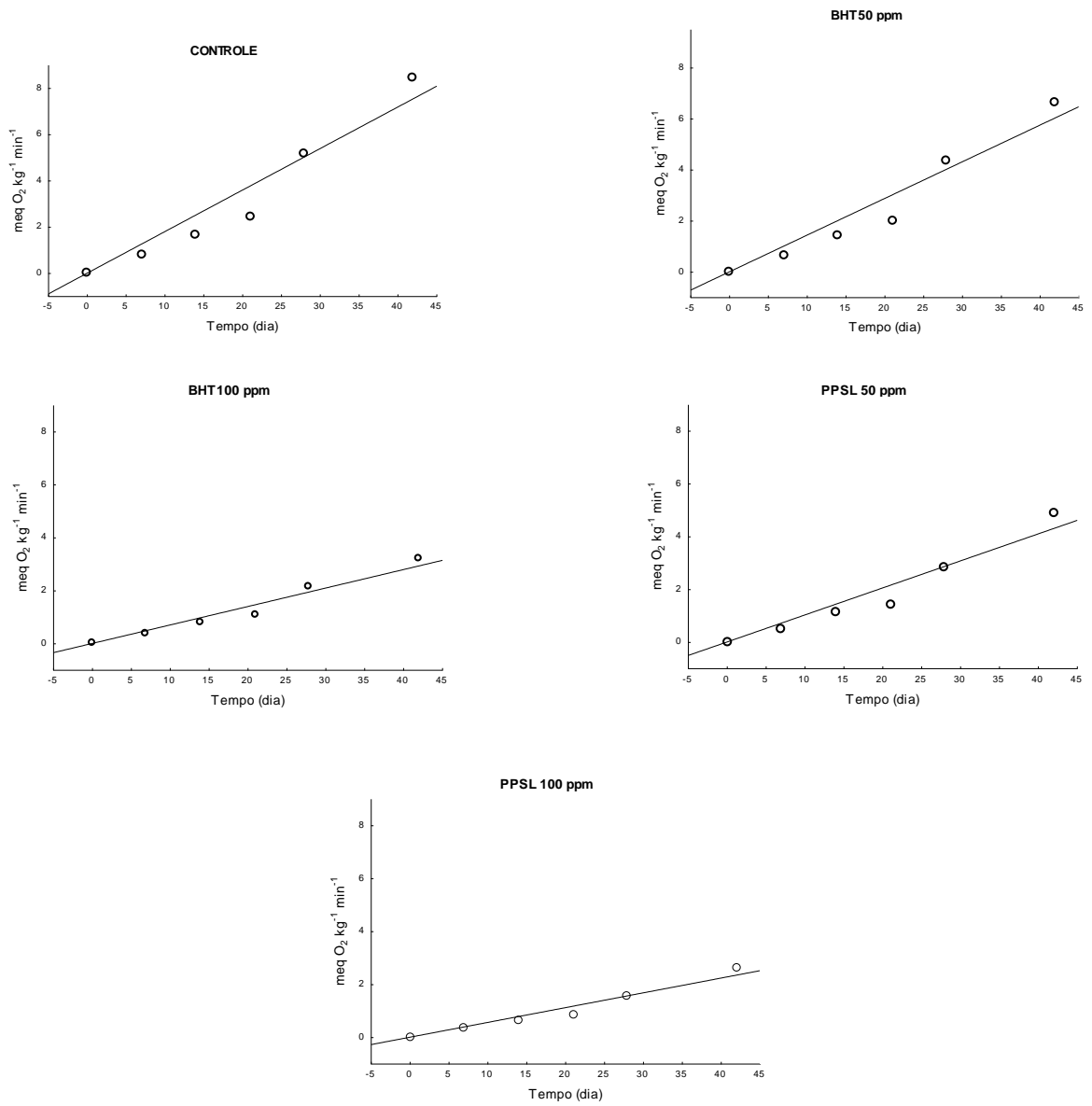
| Índice de peróxido | | | | |
|----------------------------|--|----------------------|---|----------------------|
| Amostra de manteiga | k_0 meq O₂ kg⁻¹ dia⁻¹ | R² | k_1 (dias⁻¹) | R² |
| Controle | 0,180 | 0,9269 | 0,149 | 0,5282 |
| com BHT 50 ppm | 0,144 | 0,9392 | 0,143 | 0,4668 |
| com PPSL 50 ppm | 0,102 | 0,9336 | 0,136 | 0,5797 |
| com BHT 100 ppm | 0,070 | 0,9587 | 0,126 | 0,4651 |
| com PPSL 100 ppm | 0,056 | 0,9596 | 0,121 | 0,5498 |

| TBARS | | | | |
|----------------------------|---|----------------------|---|----------------------|
| Amostra de manteiga | k_0 mg MDA kg⁻¹ dia⁻¹ | R² | k_1 (dias⁻¹) | R² |
| Controle | 0,049 | 0,6910 | 0,134 | 0,9770 |
| com BHT 50 ppm | 0,025 | 0,7549 | 0,117 | 0,9724 |
| com PPSL 50 ppm | 0,019 | 0,7693 | 0,110 | 0,9611 |
| com BHT 100 ppm | 0,011 | 0,8421 | 0,095 | 0,9347 |
| com PPSL 100 ppm | 0,008 | 0,8805 | 0,088 | 0,9145 |

Fonte: Autor (2021).

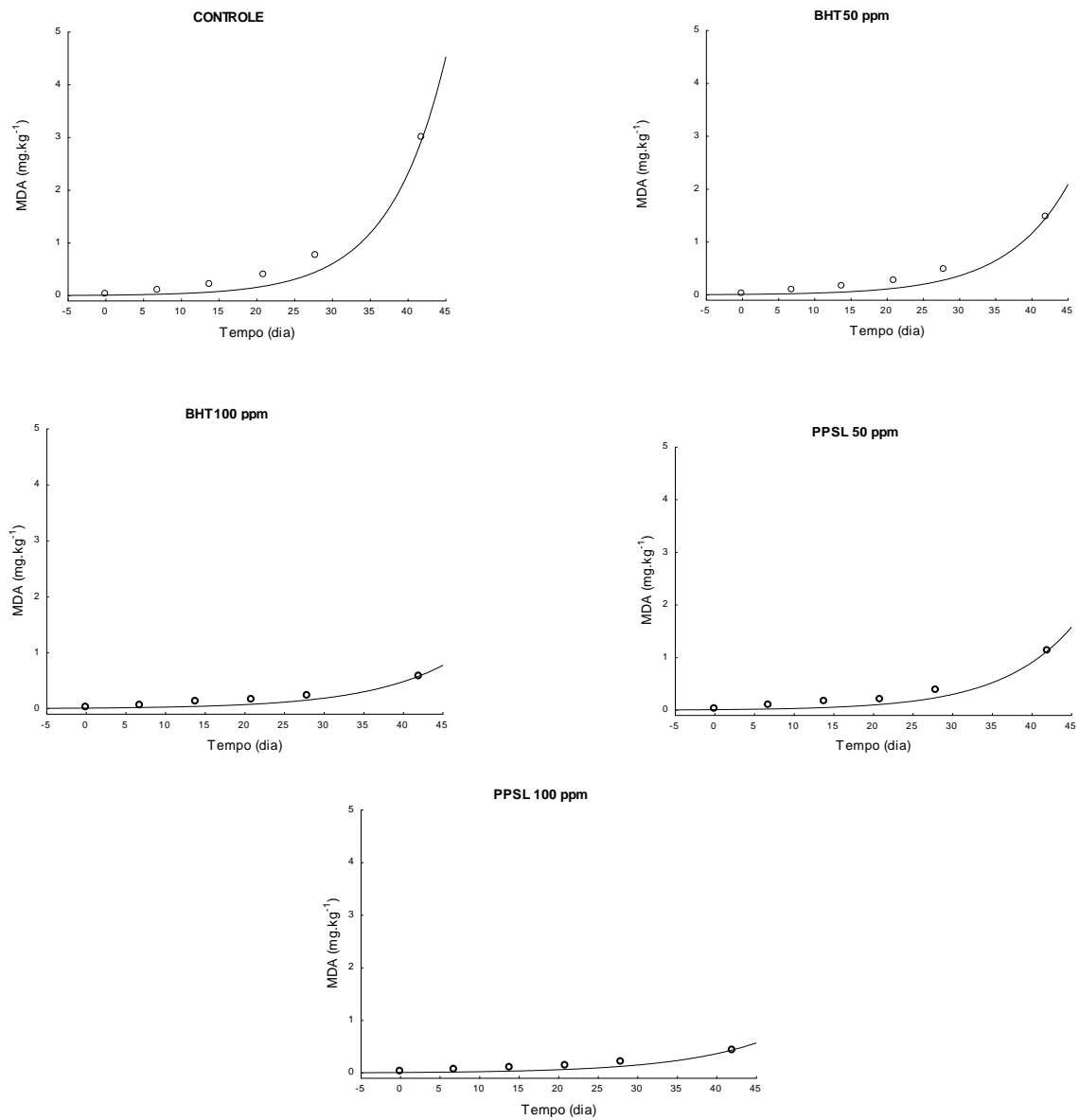
Notadamente, o modelo de primeira ordem para a estimativa cinética na fase de indução oxidativa via índice peróxido (IP) e de ordem zero na fase de rancificação via índice de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) não apresentaram boas correlações quando da aplicação aos dados experimentais, sendo observados valores de R² inferiores a 0,58 e 0,88; respectivamente. Assim os melhores ajustes foram observados para a descrição cinética na fase primária segundo um modelo de ordem zero e na fase de rancificação a partir de um modelo de primeira ordem. Os perfis cinéticos para o acompanhamento do processo oxidativo estão apresentados nas Figuras 15 e 16 a seguir. Oportunamente, as curvas cinéticas do modelo de primeira ordem para as variações de IP e de ordem zero para as variações de TBARS não foram apresentadas, considerado os baixos valores de R² observados na Tabela 11.

Figura 15 - Cinética de ordem zero para índice de peróxido a temperatura de $50 \pm 3^\circ\text{C}$ para a oxidação da manteiga na presença dos diferentes antioxidantes testados.



Fonte: Autor (2021).

Figura 16 - Cinética de primeira ordem para TBARS a temperatura de $50 \pm 3^\circ\text{C}$ para a oxidação da manteiga na presença dos diferentes antioxidantes testados.



Fonte: Autor (2021).

Em ambas as concentrações, os compostos bioativos contidos no PPSL foram eficazes como antioxidantes, reduzindo a taxa de oxidação da manteiga quando comparado a amostra sem antioxidante (controle) e ao BHT na mesma concentração. As ações neste caso podem ser relacionadas a redução da formação e decomposição de peróxidos e ao retardo do processo de hidrólise dos triglicerídeos e consequentemente da formação de ácidos graxos livres.

Na Tabela 11 os valores de k_0 e k_1 para as amostras de manteiga com 100 ppm de PPSL e 100 ppm de BHT apresentaram os melhores resultados de redução da oxidação lipídica. O maior efeito foi atribuído à concentração 100 ppm do PPSL durante o período de 42 dias

refletindo na menor formação de peróxidos e de substâncias redutoras ao TBA. Quando comparado ao sistema lipídico sem inibidor ($0,180 \text{ meq kg}^{-1} \text{ min}^{-1}$), na presença de 100 ppm de PPSL a taxa de reação (k_0) para formação de peróxidos foi de $0,056 \text{ meq kg}^{-1} \text{ min}^{-1}$, um valor cerca de três vezes inferior, correspondente à inibição de 68,9% da velocidade de oxidação. Por outro lado, o sistema lipídico contendo 100 ppm de BHT inibiu 61,1% a taxa de oxidação ($0,07 \text{ meq kg}^{-1} \text{ min}^{-1}$) quando comparado a amostra controle. Estes resultados confirmam o maior potencial do pó de própolis como agente antioxidante na fase primária da degradação lipídica da manteiga em estudo.

Santos; Shetty e Da Silva Miglioranza (2014) mostraram em seus experimentos com adição de extratos de fenólicos (200 ppm) de ervas *Lamiaceae* em manteigas um aumento da atividade antioxidante com o tempo de armazenamento à 60 °C. Em 40 dias o valor de k_0 encontrado foi de $0,995 \text{ meq O}_2 \text{ kg}^{-1} \text{ min}^{-1}$, o qual foi superior ao observado neste estudo e mesmo assim considerado promissor quanto a inibição pelos autores.

Na fase de rancificação, o efeito sobre a cinética de oxidação (k_1) da manteiga com 100 ppm de PPSL com relação a manteiga sem antioxidante observou-se uma redução de 34,3% da taxa de formação de produtos secundários de oxidação (TBARS) após os 42 dias de reação a 50 °C. Este mesmo feito foi de 29,1% na presença de 100 ppm de BHT como antioxidante. De acordo com Papadopoulou e Roussis (2008), o aquecimento a essa temperatura simula o armazenamento em condições ambientais e pode ser correlacionado ao armazenamento a 4 °C, confirmando a ação do antioxidante em produtos de secundários em temperaturas de refrigeração. Quanto mais tardia a detecção dos produtos secundários, mais longa será a estabilidade (CHUACHAROEN; SABLIOV, 2019).

Aydin e Kahyaoğlu (2019) investigaram o efeito do alho na estabilidade da manteiga e observaram que para todas as amostras contendo o antioxidante natural os valores de TBA reduziram durante estudo de estabilidade, mostrando uma atividade antioxidante equivalente ao BHT 50 ppm. Estes resultados são semelhantes aos achados neste estudo.

As variações de TBA podem ser explicadas pela formação de peróxidos resultante da oxidação primária que rapidamente se transformaram em produtos de oxidação secundária são instáveis (ERKAYA et al., 2015). É consenso na literatura a relação direta entre o perfil de ácidos graxos e a oxidação lipídica, e que o aumento de ácidos graxos insaturados é inversamente proporcional à estabilidade oxidativa devido à reatividade das duplas ligações.

O antioxidante natural PPSL possui mecanismo químico muito mais determinante na fase primária do que na fase secundária de oxidação. Desta forma, o perfil saturado das manteigas, juntamente à presença de compostos bioativos tais como fenólicos garantiram

elevada estabilidade oxidativa em todos os tratamentos ao longo do estudo da vida de prateleira.

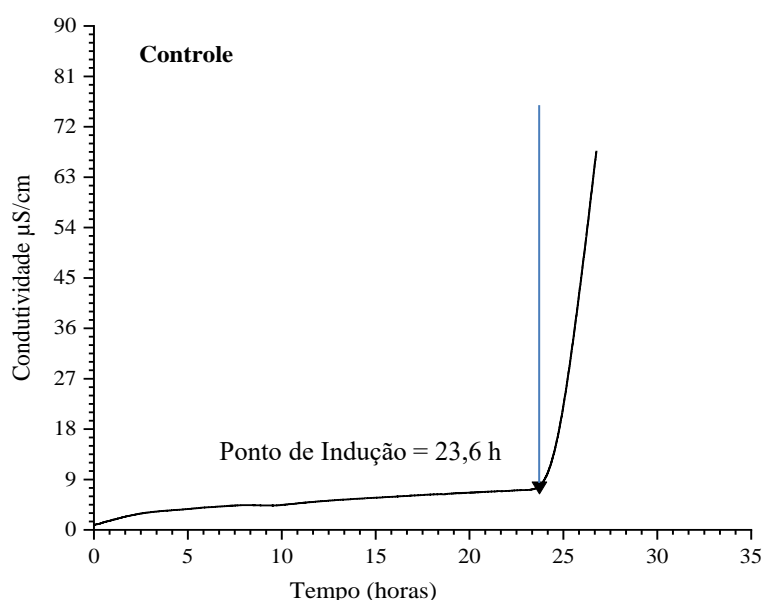
5.6 Oxidação Rancimat

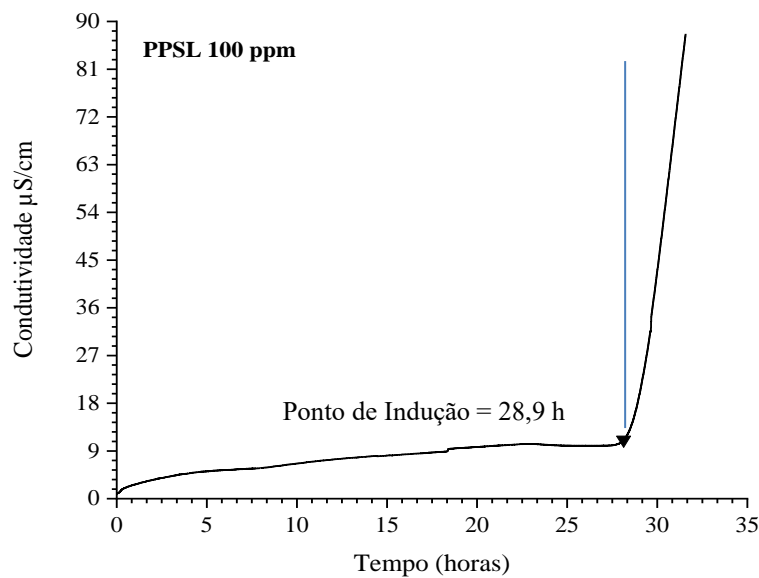
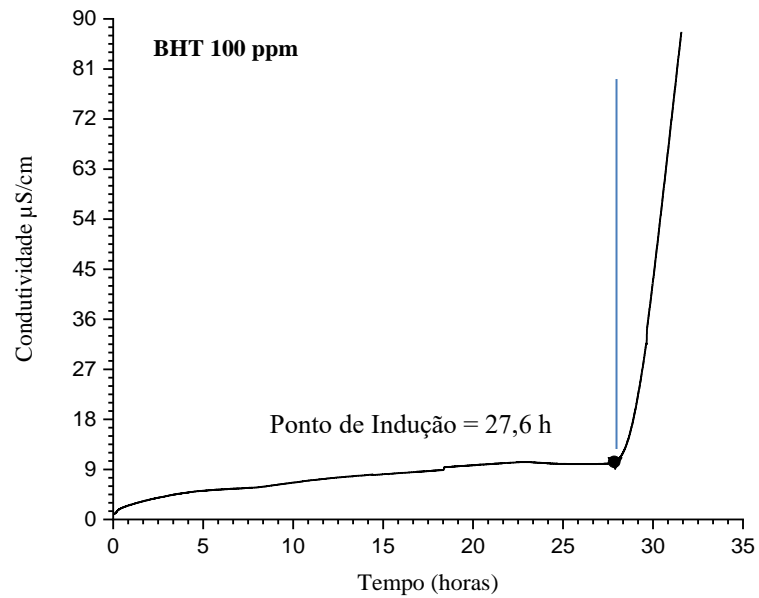
O efeito dos antioxidantes PPSL (100 ppm) e BHT (100 ppm) na estabilidade oxidativa da manteiga foi também avaliado a partir da oxidação acelerada em sistema Rancimat a 110 °C, uma condição mais severa da termo-oxidação de óleos e gorduras. Nesta metodologia o tempo de indução foi utilizado como principal indicador da atividade dos antioxidantes utilizados. Em um sistema lipídico, o tempo de indução representa o ponto de inflexão entre a fase de iniciação e propagação da oxidação, enquanto a vida útil representa o período de tempo que alguns óleos e gorduras comestíveis excedem as limitações regulamentares. Quando os antioxidantes são consumidos, o período de indução terminará e a oxidação ocorrerá na mesma taxa que na ausência de antioxidantes (ZHOU; XIONG; SHI, 2016).

A determinação do período de indução (PI) é um parâmetro útil para prever a expectativa de vida de prateleira e manutenção da qualidade de óleos e gorduras. Um PI mais alto está associado à manutenção prolongada da qualidade e vice-versa (NADEEM et al. 2014).

A Figura 17 mostra os perfis de estabilidade oxidativa das amostras de manteiga controle e com os antioxidantes PPSL e BHT.

Figura 17 - Perfil oxidativo a 110 °C obtida nos ensaios de estabilidade pelo método de Rancimat para as amostras de manteigas contendo PPSL e BTH como antioxidantes.





Fonte: Autor (2021).

Na Figura 17 observa-se que na amostra contendo PPSL, o período de indução (PI) foi de 28,9 h; enquanto para as amostras controle e BHT os valores foram de 23,6 h e 27,6h respectivamente. Esses resultados indicaram que o antioxidante natural preparado (PPSL) apresentou comportamento de proteção maior em comparação com BHT em igual concentração, ratificando os resultados de inibição encontrados no estudo de cinética de oxidação a 50 °C.

Nadeem et al. (2014) ao avaliarem a adição de extrato de gergelim (150 ppm) a manteiga no estudo de estabilidade oxidativa a 10 °C encontraram um período de indução (PI) de 12,16 h. Neste estudo o valor de PI foi considerado importante e o extrato vegetal de alta

eficiência antioxidante. Comparando ao desta pesquisa, o resultado foi duas vezes menor para o período de indução da manteiga com o pó de extrato de própolis em soro de leite, o que mostra a eficiência antioxidante das microcápsulas preparadas.

Os antioxidantes podem ser consumidos gradativamente pela reação com os radicais livres durante o mecanismo oxidativo. As diferenças na eficiência dos antioxidantes podem ser atribuídas às suas estruturas químicas. Os compostos bioativos, principalmente de natureza fenólica presentes no PPSL tem pelo menos dois grupos hidroxila ativos em seu anéis benzênicos tornando-os mais facilmente doadores de átomos de hidrogênio para os radicais produzidos, interrompendo a propagação da cadeia oxidativa, o BHT por exemplo só possui um -OH fenólico em sua estrutura. Os extratos de própolis possuem combinações de compostos fenólicos e flavonoides que lhes conferem alto potencial bioativo e correlação positiva com a capacidade antioxidante (REIS et al., 2017; IBARRA-ESPAIN et al. 2020).

De acordo com Antoniassi (2001), o acréscimo de algumas horas no período de indução de um produto triglicéridico pode corresponder a várias semanas adicionais de tempo de armazenagem sem rancificação. Oportunamente, a manteiga contendo PPSL 100 ppm (agente antioxidante natural) apresentou a maior proteção e inibição de radicais livres no processo de degradação da manteiga preparada, prologando em quase 22% o tempo de início da fase de rancificação acelerada do material lipídico na amostra original (sem antioxidante). Comparado ao BHT o aumento de eficiência no valor de PI foi de 4,7%, o que se considerou como promissor nesta pesquisa.

5.7 Caracterização físico-químicas e microbiológicas das manteigas

A manteiga adicionada de 100 ppm de PPSL e a manteiga controle (sem adição de antioxidante) apresentaram resultados microbiológicos dentro dos padrões estabelecidos pelo Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade da Manteiga (Brasil, 1996) quanto a contagem de coliformes a 45 °C (< 3,0 NMP/g), estafilococos coagulase positiva (< 10 UFC/g) e “ausência” para a pesquisa de *Salmonella sp.* Os resultados apresentados nesta etapa foram fundamentais para o consumo seguro do produto na realização do teste triangular sensorial.

A adição do PPSL à manteiga, aumentou os valores de proteínas, cinzas e carboidratos. O teor de gordura, não apresentou variação significativa ($p < 0,05$) com a adição do antioxidante natural (TABELA 12).

Tabela 12 - Parâmetros composicionais da manteiga natural e com a adição de antioxidante PPSL.

| Amostra | Umidade | Proteínas | Lipídios | Cinzas | Carboidratos |
|----------------|--------------------------|---------------------------|------------------------|----------------------------|----------------------------|
| Controle | 13,7 ^b ± 0,06 | 0,19 ^d ± 0,001 | 86 ^c ± 0,01 | 0,003 ^g ± 0,001 | 0,069 ^j ± 0,056 |
| PPSL | 15,4 ^a ± 0,10 | 0,23 ^c ± 0,006 | 84 ^f ± 0,01 | 0,069 ^h ± 0,001 | 0,296 ⁱ ± 0,094 |

*Valores médios, na mesma coluna, seguidos de letras minúsculas diferentes apresentam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$). Fonte: Elaborada pelo autor (2021).

Para o valor de umidade, mesmo apresentando um aumento significativo, o mesmo permaneceu dentro dos parâmetros exigidos pela legislação brasileira vigente que estabelece um valor máximo de 16% em água (BRASIL, 1996). Isso é importante visto que um maior teor de umidade pode levar a um elevado grau de hidrólise, o que pode acarretar no desenvolvimento de sabores questionáveis e de menor aceitabilidade (NADEEM et al., 2017).

Mehdizadeh et al. (2019) apresentaram resultados semelhantes em suas análises físico-químicas na pesquisa sobre o efeito do extrato hidroalcoólico das membranas do septo do caroço de noz na vida de prateleira da manteiga tradicional com teores de gordura de 79,7% ± 0,8 e umidade de 15,1% ± 0,20 e por Nadeem et al. (2014) com gordura de 83,1% ± 1,59 e umidade de 15,3% ± 0,24.

Os valores dos parâmetros físico-químicos encontrados na manteiga adicionada de PPSL modificaram composição final, mas permanecendo dentro dos padrões legais de identidade e qualidade. Este fato também foi observado por Lima et al (2020) em suas pesquisas com manteigas. Estes autores relataram que as propriedades físicas e tecnológicas do produto são dependentes do método de produção podendo haver grandes variações nos resultados encontrados nas amostras entre uma marca comercializada e outra, ou até mesmo entre a mesma fabricante.

5.8 Análise sensorial

Após aprovação dos resultados microbiológicos foi realizado o teste sensorial triangular entre as amostras de manteiga controle e com a manteiga adicionada do pó de própolis. Participaram por livre e espontânea vontade, 66 provadores sem distinção de gêneros, com idades variando entre 36 e 56 anos e de escolaridade identificados como ensino médio completo (62%) e ensino superior (38%)

Os provadores foram questionados quanto a frequência de consumo de manteiga e 44 disseram consumir diariamente enquanto 26 disseram “consumir 2 ou 3 vezes na semana”.

Para a segunda pergunta sobre o quanto eles gostavam de manteiga observou-se que 81,8% dos julgadores declararam “gostar muitíssimo” e 18,2% responderam “gostar muito”. Uma observação satisfatória foi que nenhum dos provadores respondeu “não gosto” ou “gosto ligeiramente” do produto consumido, revelando um aspecto positivo da avaliação pelos provadores.

No espaço para os comentários (opção facultativa) contido na ficha sensorial entregue aos provadores foram encontrados 20 relatos do tipo: “não se consegue detectar nenhuma diferença entre as amostras servidas”.

Segundo Dutcosky (2013), o número mínimo de respostas corretas do total de julgadores para concluirmos se houve diferença significativa entre as duas amostras testadas é de 29 ($p \geq 0,05$). No presente estudo, o resultado do painel sensorial obtido foi de 24 (36,36 %) avaliadores detectando diferença entre os produtos degustados. Este valor abaixo do mínimo de julgamentos corretos esperados permite inferir que as amostras não são diferentes em suas propriedades sensoriais e apresentam similaridade. Isso sugere que adição do pó do extrato de própolis encapsulado com soro de leite (PPSL) a manteiga não causou diferença detectável na qualidade sensorial do produto.

A significância foi analisada através do Teste de t-Student comprovando nenhuma correlação significativa ($p = 0,372$) assegura com 95% de certeza, considerada a proporção de discriminadores (Pd), que não mais que 30% da população conseguirá detectar diferença entre as amostras de manteigas adicionadas de 100 ppm de extrato de própolis microencapsulado em soro de leite. Tendo em vista os aspectos conceituais do teste triangular, é oportuno a realização de outros testes sensoriais (descritivos) visto que ele não identifica os atributos responsáveis pela composição da manteiga.

Os resultados encontrados neste trabalho reforçam os pressupostos citados na literatura por Andrade et al. (2018), Dos Reis et al. (2017), Lima et al. (2020), Mangiring et al. (2018) e Spinelli et al. (2015) que relatam ser a microencapsulação dos extratos de própolis uma alternativa de mascarar os sabores e odores intensos da própolis quando inserida em alimentos.

6 CONCLUSÕES

As melhores condições de desidratação por aspersão em secador *spray dryer* permitiram a obtenção do pó de extratos de própolis microencapsulado em soro de leite com eficiência na encapsulação e com características físico-químicas, antioxidantes e morfológica condizentes a um promissor inibidor de oxidação lipídica.

O estudo da estabilidade oxidativa pelos métodos *Schaal Oven Test* e teste Rancimat permitiu observar que a inibição da degradação lipídica é três vezes maior na manteiga contendo 100 ppm de PPSL quando comparada à amostra sem antioxidante.

O pó de própolis encapsulado em soro de leite empregado como aditivo na manteiga mesmo promovendo alterações em sua composição centesimal, mantém suas propriedades tecnológicas e as características do produto permanecem de acordo com os limites estabelecidos pela legislação vigente. O sabor característico do extrato de própolis não é perceptível de acordo com a avaliação sensorial.

O extrato de própolis microencapsulado com soro de leite representa um avanço em aditivos naturais com eficiente ação antioxidante, na concentração de 100 ppm. Este material pode ser aplicado pela indústria de alimentos para substituir os compostos sintéticos (BHT), a fim de reduzir os efeitos nocivos à saúde do consumidor.

REFERÊNCIAS

- ABD EL-HADY, F. K.; HEGAZI, A. G.; WOLLENWEBER, E. Effect of Egyptian propolis on the susceptibility of LDL to oxidative modification and its antiviral activity with special emphasis on chemical composition. **Z Naturforsch C J Biosci.** v. 62, p. 645-55, 2007.
- ALBUQUERQUE, IRINEU L. DE; ALVES, L. A.; LEMOS, T. L. G.; MONTE, F. J. Q.; BRAZ-FILHO, R. Ácido canárico (3,4-seco derivado do lupano) em própolis do Ceará. **Química Nova**, v. 30, n. 4, p. 828-831, 2007.
- ANDRADE, J. K. S.; DENADAI, M.; ANDRADE, G. R. S.; NASCIMENTO, C. C.; BARBOSA, P. F.; M. S. JESUS, NARAIN, N. Development and characterization of microencapsules containing spray dried powder obtained from Brazilian brown, green and red propolis. **Food Research International**, v. 109, p. 278-287, 2018.
- ANDRADE, J. K. S.; DENADAI, M.; DE OLIVEIRA, C. S.; NUNES, M. L.; NARAIN, N. Evaluation of bioactive compounds potential and antioxidant activity of brown, green and red propolis from Brazilian northeast region. **Food Research International**, v. 101, p. 129-138, 2017.
- ANDRADE, V. H. O. **Utilização do soro de leite bovino no processo de secagem de própolis vermelha em spray dryer.** 2013. 63 f. Dissertação (Mestrado em Nutrição) - Faculdade de Nutrição, Programa de Pós-graduação em Nutrição, Universidade Federal de Alagoas, Maceió, 2013.
- ANTONIASSI, R. Métodos de avaliação da estabilidade oxidativa de óleos e gorduras. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 19, n. 2, p. 353-380, 2001.
- ANWAR, F.; BHANGER, M. I.; KAZI, T. G. Relationship between rancimat and active oxygen method values at varying temperatures. **Measurement**, v. 80, n. 2, 2003.
- ARPAGAUS, C.; COLLENBERG, A.; RÜTTI, D.; ASSADPOUR, E.; JAFARI, S. M. Nano spray drying for encapsulation of pharmaceuticals, **International Journal of Pharmaceutics**, v. 546, n. 1-2, p. 194-214, 2018
- AUGUSTIN M. A.; OLIVER C.M. Use of milk proteins for encapsulation of food ingredients. In: Gaonkar AG, Vasisht N, Khare AR, Sobel R (Eds.). **Microencapsulation in the Food Industry**, p. 211-226, 2014.
- AUGUSTO, T. R. **Avaliação da atividade antioxidante de extrato hidroalcoólico de murtila (*Ugni molinae* Turcz).** 2013. 123 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2013.
- AYDIN, S.; KAHYAOĞLU, D. T. Antioxidant effect potential of garlic in vitro and real food system: Effects of garlic supplementation on oxidation stability and sensory properties of butter. **Eur. J. Lipid Sci. Technol.** v.122, n. 3, p. 1900261, 2020.

BARRETO, A. R.; RAMÍREZ-MÉRIDA, L. G.; ETCHEPARE, M. A.; JACOB-LOPES, E.; MENEZES, C. R. Materiais de revestimento utilizados na microencapsulação de probióticos. **Ciência e Natura**. Ed. Especial-Nano e Microencapsulação de compostos bioativos e probióticos em alimentos, v. 37, p. 164-174, 2015.

BASANTA, F.; MARIN, A.; LEO, S.A.; GERSCHENSON, L.N.; ERLEJMAN, A.G.; TOMÁS-BARBERÁN, F.A.; ROJAS, A.M. Antioxidant Japanese plum (*Prunus salicina*) microparticles with potential for food preservation. **Journal of Functional Foods**, v. 24, p. 287-296, 2016.

BAYSAN, U.; BASTIOĞLU, A. Z.; COŞKUN, N. Ö.; TAKMA, D. K.; BALÇIK, E. Ü.; SAHIN-NADEEM, H.; KOÇ, M. The defect. of coating material combination and encapsulation method on propolis powder properties, **Powder Technology**, v. 384, p. 332-341, 2021.

BUSCH, V. M.; PEREYRA-GONZALEZ, A.; ŠEGATIN, N.; SANTAGAPITA, P. R.; POKLAR ULRIH, N.; BUERA, M. P. Propolis encapsulation by spray drying: Characterization and stability. **Food Science and Technology**, v. 75, p. 227-235, 2017.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Defesa Animal. Legislações. Legislação por Assunto. Legislação de Produtos Apícolas e Derivados. **Instrução Normativa nº 3, de 19 de janeiro de 2001**. Regulamentos técnicos de identidade e qualidade de apitoxina, cera de abelha, geléia real, geléia real liofilizada, pólen apícola, própolis e extrato de própolis.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA. Instrução Normativa nº 94, de 18 de setembro de 2020. Regulamento Técnico que fixa os Padrões de Identidade e qualidade para o soro de leite e o soro de leite ácido. **Diário Oficial da União**, Brasília. DF, 22 de setembro de 2020. Edição: 182, Seção: 1, p. 5.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA. Portaria nº 146 de 07 de março de 1996. Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade dos Produtos Lácteos. **Diário Oficial da União**, Brasília. DF, 11 de março de 1996. Edição: 48, Seção: 1, p. 398.

BOTH, E. M.; BOOM R. M.; SCHUTYSER, M. A. I. Particle morphology and powder properties during spray drying of maltodextrin and whey protein mixtures, **Powder Technology**, v. 363, p. 519-524, 2020.

BONIN, E.; CARVALHO, V. M.; AVILA, V. D.; DOS SANTOS, N. C. A.; BENASSI-ZANQUETA, E.; LANCHEROS, C. A. C.; PREVIDELLI I. T. S.; UEDA-NAKAMURA, T.; ABREU FILHO, B. A.; NUNES DO PRADO, I. Baccharis dracunculifolia: Chemical constituents, cytotoxicity and antimicrobial activity. **Food Science and Technology**, v. 120, p. 108920, 2020.

CALEGARI, M. A.; AYRES, B.; TONIAL, L. M. DOS S.; DE ALENCAR, S.; OLDONI, M. T. L. C. Fourier transform near infrared spectroscopy as a tool for predicting antioxidant activity of propolis. **Journal of King Saud University - Science**, v. 32, n. 1, p. 784-790, 2020.

CHANG, X.; FENG, W.; HE, L.; CHEN, X.; LIANG, L. Fabrication and characterisation of whey protein isolate–propolis–alginate complex particles for stabilising α -tocopherol-contained emulsions. **International Dairy Journal**, v.109, 104756, 2020.

CHANG, R.; PILÓ-VELOSO, D.; MORAIS, S. A. L.; NASCIMENTO, E. A. Analysis of a Brazilian green propolis from *Baccharis dracunculifolia* by HPLC-APCI-MS and GC-MS. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 18, n. 4, p. 549-556, 2008.

CHUACHAROEN, T.; SABLIOV, C. M. Comparative effects of curcumin when delivered in a nanoemulsion or nanoparticle form for food applications: Study on stability and lipid oxidation inhibition. **Food Science and Technology**, v. 113, p. 108319, 2019.

CHUYEN, H. V., ROACH, P. D., GOLDING, J. B., PARKS, S. E., e NGUYEN, M. H. Encapsulation of carotenoid-rich oil from Gac peel: Optimisation of the encapsulating process using a spray drier and the storage stability of encapsulated powder. **Powder Technology**, v. 344, p. 373-379, 2019.

COSTA, J. M. G. **Eficiência de diferentes encapsulantes e condições operacionais de secagem por atomização na produção e aplicação de micropartículas de bioaroma de queijo suíço**. 2013. Tese (doutorado) – Universidade Federal de Lavras - UFPA, Lavras, 2013.

DAMODARAN, S.; PARKIN, K. L.; FENNEMA, O. R. **Química de Alimentos de Fennema**. Tradução Adriano Brandelli et al. 4 ed. Porto Alegre: Atmed, 2010.

DAVIS, M.; WALKER, G. Recent strategies in spray drying for the enhanced bioavailability of poorly water-soluble drugs. **Journal of Controlled Release**, v. 269, p. 110-127, 2018.

DA SILVA, F. C., FONSECA, C. R., ALENCAR, S. M., THOMAZINI, M., BALIEIRO, J. C. C., PITTIA, P. Assessment of production efficiency, physicochemical properties and storage stability of spray-dried propolis, a natural food additive, using gum Arabic and OSA starch-based carrier systems. **Food and Bioproducts Processing**, v. 91, p. 28-36, 2013.

DA SILVA, F.C., FAVARO-TRINDADE, C.S., DE ALENCAR, S.M., THOMAZINI, M.; BALIEIRO, J.C.C. Physicochemical properties, antioxidant activity and stability of spray dried propolis. **Journal of Api Product and Api Medical Science**, v. 3. p. 94-100. 2011.

DE CASTRO-CISLAGHI, F. P.; FRITZEN-FREIRE, C. B.; SANT'ANNA, E. S. Potencial do soro de leite líquido como agente encapsulante de *Bifidobacterium* Bb-12 por *spray drying*: comparação com goma arábica. **Ciência Rural**, v. 42, n. 9, p. 1694-1700, 2012.

DI BATTISTA, C. A.; CONSTENLA, D.; RAMÍREZ-RIGO, M. V.; PIÑA, J. The use of arabic gum, maltodextrin and surfactants in the microencapsulation of phytosterols by *spray drying*. **Powder Technology**, v. 286, p. 193-201, 2015.

DIAS, M. I.; FERREIRA, I. C.; BARREIRO, M. F. Microencapsulation of bioactives for food applications. **Food Funct.**, v. 6, n. 4, p. 1035-1052, 2015.

DOS REIS, A. S.; DIEDRICH, C.; MOURA, C.; PEREIRA, D.; ALMEIDA, J. F.; SILVA, L. D.; PLATA-OVIEDO, M. S. V.; TAVARES, R. A. W.; CARPES, S. T. Physico-chemical characteristics of microencapsulated propolis co-product extract and its effect on storage stability of burger meat during storage at - 15 °C. **Food Science and Technology**, v 76, p. 306-313, 2017.

DUTCOSKY, S. D. **Análise sensorial de alimentos**. 4.ed. Curitiba: Champagnat, 2013.

ENGEL, B. Emprego de *Spray Dryer* na indústria de alimentos: uma breve revisão. **Revista Jovens Pesquisadores**, v. 7, n. 2, p. 2-11, 2017.

ERKAYA, T. et al. Probiotic butter: Stability, free fatty acid composition and some quality parameters during refrigerated storage. **International Dairy Journal**, v. 49, p. 102-110, 2015.

FALCÃO, S. I.; VALE, N.; GOMES, P.; DOMINGUES, M. R. M.; FREIRE, C.; CARDOSO, S. M.; VILAS-BOAS, M. Phenolic profiling of portuguese propolis by LC-MS spectrometry: uncommon propolis rich in flavonoid glycosides. **Phytochem. Anal.**, v. 24, p. 309-318, 2013.

FERNANDES, L. P.; CANDIDO, R. C.; OLIVEIRA, W. P. Spray drying microencapsulation of *Lippia sidoides* extracts in carbohydrate blends. **Food and Bioproducts Processing**, Rugby, v. 90, n. 9, p. 425-432, 2012.

FERRARI, C. C.; GERMAN, S. P. M.; DE AGUIRRE, J. M. Effects of spray-drying conditions on the physicochemical properties of blackberry powder. **Drying Technol.** v. 30, n. 2, p. 154 – 163, 2011.

FERRERES, F.; ANDRADE, P.; GIL, M. I.; TOMFIS-BARBERFIN, F. A. Floral nectar phenolics as biochemical markers for the botanical origin of heather honey. **Z Lebensm Unters Forsch**, v. 202, p. 40-44, 1996.

FIB. A microencapsulação a serviço da indústria alimentícia. **Food Ingredients Brasil**, v. 25, p. 30-36, 2013.

FRANCESCHINIS, L., SALVATORI, D. M., SOSA, N.; SCHEBOR, C. Physical and functional properties of blackberry freeze and spray dried powders. **Drying Technology: An International Journal**, v. 32, p. 197-207, 2015.

FU, L.; SUN, Y.; DING, L.; WANG, Y.; GAO, Z.; WU, Z.; WANG, S.; LI, W.; BI, Y. Mechanism evaluation of the interactions between flavonoids and bovine serum albumin based on multi-spectroscopy, molecular docking and Q-TOF HR-MS analyses. **Food Chemistry**, v. 203, p. 150-157, 2016.

GEA NIRO RESEARCH LABORATORY. Analytical methods dry milk products. Soeborg: GEA Niro, 2005. 103 p. (GEA Niro Analytical Methods 14a-15a).

GHARSALLAOUI, A.; ROUDAUT, G.; CHAMBIN, O.; VOILLEY, A.; SAUREL, R. Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: An overview. **Food Research International**. v. 40, p. 1107-1121, 2007.

GHISALBERTI, E.L. Propolis: a review. **Bee World**, v. 60, p.59-84. 1979.

GOULA, A. ADAMOPOULOS, K. Effect of maltodextrina addition during spray drying of tomato pulp in dehumidified air: I. Drying kinetics and recovery. **Drying technology**, v. 26, p. 714-725, 2008.

HAVSTEEN, B. H. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 96, n. 2-3, p. 67-202, 2002.

HU, JING.; ZHAO, T.; LI, S.; WANG Z.; WEN C.; WANG, H.; YU, C.; JI, C. Stability, microstructure, and digestibility of whey protein isolate – Tremella fuciformis polysaccharide complexes. **Food Hydrocolloids**, v. 89, p. 379-385, 2019.

IBARRA-ESPAIN, J. I.; CARMONA-GASCA, C. A.; ESCALERA-VALENTE, F.; AVILA-RAMOS, F. Efecto del propóleo y aceite de orégano sobre parámetros productivos leucocitos, metabolitos y estabilidad oxidativa de la pechuga de pollo Introducción. **Rev Mex Cienc Pecu.** v.11 n. 153, p. 153-166, 2020.

ISIDOROV, V. A.; BUCZEK, K.; ZAMBROWSKI, G.; MIASTKOWSKI, K.; SWIECICKA, I. In vitro study of the antimicrobial activity of European propolis against *Paenibacillus* larvae. **Apidologie**, v. 48, p. 411-422, 2017.

ISLA, M. I.; MORENO, N.; SAMPIETRO, A.R.; VATTUONE, M. A. Antioxidant activity of Argentine propolis extracts. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 76, n. 2, p. 165-170, 2001.

JANSEN-ALVES, C.; MAIA, D. S. V.; KRUMREICH, F. D.; CRIZEL-CARDOSO, M. M.; FIORAVANTE, J. B.; DA SILVA, W. P.; C. D. B.; ZAMBIAZI, R. C. Propolis microparticles produced with pea protein: Characterization and evaluation of antioxidant and antimicrobial activities. **Food Hydrocolloids**, v. 87, n. 2018, p. 703-711, 2019.

JANSEN-ALVES, C.; FERNANDES, K. F.; CRIZEL-CARDOZO, M. M.; KRUMREICH, F. D.; BORGES, C. D.; ZAMBIAZI, R. C. Microencapsulation of propolis in protein matrix using spray drying for application in food systems. **Food and Bioprocess Technology**, v. 11, n. 7, p. 1422-1436, 2018.

JUNIOR, V.; ARRUDA, I. BEMME, L.; OLIVEIRA, K. A. M.; STEFANI, R. Caracterização térmica e espectroscópica de microcápsulas de quitosana incorporada de propolis. **Revista Eletrônica da Univar**, v. 2, n. 10, p. 161-165, 2013.

KONG, Y. T.; KUTTY, R. V. Physical characterization of propolis encapsulated vitamin E TPGS as nanomedicine. **Materials Today: Proceedings**, 2021.

LAGUERRE, M.; LECOMTE, J.; VILLENEUVE, P. Evaluation of the ability of antioxidants to counteract lipid oxidation: Existing methods, new trends and challenges. **Progress in Lipid Research**, v. 46, n. 5, p. 244-282, 2007.

LIAUDANSKAS, M.; KUBILIENĖ, L.; ŽVIKAS, V.; TRUMBECKAITĖ, S. Comparison of ethanolic and aqueous-polyethylenglycolic propolis extracts: Chemical composition and antioxidant properties. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, 2021 Mar 17;2021:5557667. doi: 10.1155/2021/5557667. PMID: 33815551; PMCID: PMC7994069.

LIMA, L. S. C. **Caracterização físico-química e atividades antioxidante e antimicrobiana de própolis produzidas em colônias de abelhas *Apis Mellifera* L. na região Noroeste do Estado do Ceará.** 2015. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Ceará, *Campus* Limoeiro do Norte, Limoeiro do Norte, 2015.

LIMA, L. S. C.; LIMA, N. M de F.; CRUZ, G. A.; MACHADO, F.L.de O.; ARAÚJO, R. dos S.; CARVALHO, J. D. G. Estudo da adição de antioxidante natural na manteiga. **Pesquisa, Sociedade e Desenvolvimento**, v. 9, n.11, p. 83091110366, 2020.

LV, X.; SUN, J. Z.; XU, S. Z.; CAI, Q.; LIU, Y. Q. Rapid characterization and identification of chemical constituents in *Gentiana radix* before and after wine-processed by UHPLC-LTQ-Orbitrap MSⁿ. **Molecules**, v. 23, n.12, p. 3222, 2018.

MANCINI, S.; MATTIOLI, S.; NUVOLONI, R.; PEDONESE, F.; DAL BOSCO A.; PACI, G. Effects of garlic powder and salt additions on fatty acids profile, oxidative status, antioxidant potential and sensory properties of raw and cooked rabbit meat burgers. **Meat Science**, v. 169, p. 108226, 2020.

MANGIRING, G. A.; PRATAMI, D. K.; HERMANSYAH, H.; WIJANARKO, A.; ROHMATIN, E.; SAHLAN, M. Microencapsulation of ethanol extract propolis by maltodextrin and freeze-dried preparation. **AIP Conference Proceedings**, v. 1933, 2018.

MAQSOOD, S.; BENJAKUL, S.; ABUSHELAIBI, A.; ALAM, A. Phenolic Compounds and Plant Phenolic Extracts as Natural Antioxidants in Prevention of Lipid Oxidation in Seafood: A Detailed Review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 13, n. 6, p. 1125-1140, 2014.

MAQSOU DLOU, A.; ASSADPOUR, E.; MOHEBODINI, H.; JAFARI, S. M. Improving the efficiency of natural antioxidant compounds via different nanocarriers. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 278, p. 102122, 2020.

MARINOVA, N. V. Y. E. M. Activity of natural antioxidants on lipids. **Food – Global Science Books**, v. 1, n. 2, p. 149-160, 2007.

MEHDIZADEH, T; MOHAMMADIPOUR, N.; LANGROODI, A. M.; RAEISI, M. Effect of walnut kernel septum membranes hydroalcoholic extract on the shelf life of traditional butter. **Heliyon**, v. 5, n. 3, e01296, 2019.

MEYAGUSKU, V. M. **Desenvolvimento e caracterização de nanopartículas lipídicas sólidas contendo ciprofloxacino.** 2014. 96 f. Tese (Doutorado) - Curso de Ciências Farmacêuticas, Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2014.

MOȚ, A. C.; SILAGHI-DUMITRESCU, R.; SÂRBU, C. Rapid and effective evaluation of the antioxidant capacity of propolis extracts using DPPH bleaching kinetic profiles, FT-IR and UV-Vis spectroscopic data. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 24, n. 4-5, p. 516-522, 2011.

NADEEM, M., SITU, C.; MAHMUD, A.; KHALIQUE, A.; IMRAN, M.; RAHMAN, F. E.; KHAN, S. Antioxidant activity of sesame (*Sesamum indicum* L.) cake extract for the stabilization of olein based butter. **J Am Oil Chem Soc**, v. 91, p.967-977, 2014.

NADEEM, M.; IMRAN, M.; TAJ, I.; AJMAL, M.; JUNAID, M. Omega-3 fatty acids, phenolic compounds and antioxidant characteristics of chia oil supplemented margarine. **Lipids Health Dis.**, v. 16, n. 102, 2017.

NADEEM, M.; IMRAN, M.; IQBAL, Z.; ABBAS, N.; EHMUD, A. Enhancement of the oxidative stability of butter oil by blending with mango (*Mangifera indica* L.) kernel oil in ambient and accelerated oxidation. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 41, p. e12957, 2017.

NORI, M. P.; FAVARO-TRINDADE, C. S.; ALENCAR, S. M.; THOMAZINI, M.; BALIEIRO, J. C. C.; CASTILLO, C. J. C. Microencapsulation of propolis extract by complex coacervation. **Food Science and Technology**, v.44, n. 2, p. 429-435, 2011

Norma Brasileira Regulamentadora – NBR. Associação Brasileira de Normas Técnicas - ABNT. Análises sensorial – Metodologia - Teste triangular – NBR ISO 4120. São Paulo: ABNT, 2013.

OLIVEIRA, R. N.; MANCINI, M. C.; OLIVEIRA, F. C. S.; PASSOS, M. T.; QUILTY, B.; THIRÉ, R. M. S. M.; MCGUINNESS, G. B. Análise por FTIR e quantificação de fenóis e flavonoides de cinco produtos naturais disponíveis comercialmente utilizados no tratamento de feridas. **Revista Matéria**, v. 21, n. 3, p. 767-779, 2016.

OMAR, R. M.; IGOLI, J.; GRAY, A. I.; EBILOMA, G. U.; CLEMENTS, C.; FEARNLEY, J, EBEL, R. A.; ZHANG, T.; DE KONING, H. P.; WATSON, D. G. Chemical characterisation of Nigerian red propolis and its biological activity against *Trypanosoma Brucei*. **Phytochem Anal.** v. 27, n. 2, p. 107-115, 2016.

ONG, T. H.; CHITRA, E.; RAMAMURTHY, S.; SIDDALINGAM, R. P., YUEN, K. H.; AMBU, S. P.; DAVAMANI, F. Chitosan-propolis nanoparticle formulation demonstrates anti-bacterial activity against *Enterococcus faecalis* biofilms. **PLOS ONE**, v. 12, n. 3, e0174888, 2017.

ÖZKAN, G.; BILEK, S. E. Microencapsulation of natural food colourants. **International Journal of Nutrition and Food Sciences**, v.3, n. 3, p. 145-156, 2014.

ÖZKANLI, O.; KAYA, A. Storage stability of butter oils produced from sheep's non-pasteurized and pasteurized milk. **Food Chemistry**. v. 100, n. 3, p. 1026-1031, 2007.

PAPADOPOULOU, D.; ROUSSIS, I. G. Inhibition of butter oxidation by N-acetylcysteine and glutathione. **European Food Research Technology**, v. 227, p. 905-910, 2008.

PARK, Y. K.; IKEGAKI, M.; ABREU, J. A. S.; ALCICI, N. M. F. Estudo da preparação dos extratos de própolis e suas aplicações. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v 18, p. 313-318, 1998.

- PAULO, F.; PAULA, V.; ESTEVINHO, L. M.; SANTOS, L. Propolis microencapsulation by double emulsion solvent evaporation approach: Comparison of different polymeric matrices and extract to polymer ratio. **Food and Bioproducts Processing**, v. 127, p. 408-425, 2021.
- PAVLOVIC, R.; BORGONOVO, G.; LEONI, V.; GIUPPONI, L.; CECILIANI, G.; SALA, S.; BASSOLI, A.; GIORGI, A. Effectiveness of different analytical methods for the characterization of propolis: A Case of study in Northern Italy. **Molecules**, v. 25, n. 3, p. 504, 2020.
- QUEIRÓS M. S.; GRIMALDI, R.; GIGANTE, M. L. Addition of olein from milk fat positively affects the firmness of butter. **Food Research International**, v. 84, p. 69-75, 2016.
- RAMAKRISHNAN, Y.; ADZAHAN, N. M.; YUSOF Y. A.; MUHAMMAD, K. Effect of wall materials on the spray drying efficiency, powder properties and stability of bioactive compounds in tamarillo juice microencapsulation. **Powder Technology**, v. 328, p. 406-414, 2018.
- RAMALHO, V. C.; JORGE, N. Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos. **Química Nova**, v. 29, n. 4, p. 755-760, 2006.
- REZAUL, M.; SHISHIR, I. E.; CHEN, W. Trends in food science e technology trends of spray drying: A critical review on drying of fruit and vegetable juices. **Trends in Food Science e Technology**, v.65, p. 49-67, 2017.
- RISTIVOJEVIĆ, P.; DIMKIĆ, I.; GUZELMERIC, E.; TRIFKOVIĆ, J.; KNEŽEVIĆ, M.; BERIĆ, T.; YESILADA, E.; MILOJKOVIĆ-OPSENICA D.; STANKOVIĆ, S. Profiling of Turkish propolis subtypes: Comparative evaluation of their phytochemical compositions, antioxidant and antimicrobial activities. **Food Science and Technology**, v. 95, p. 367-379, 2018.
- RIVERO-CRUZ, J. F.; GRANADOS-PINEDA, J.; PEDRAZA-CHAVERRI, J.; PÉREZ-ROJAS, J. M.; KUMAR-PASSARI, A.; DIAZ-RUIZ, G.; RIVERO-CRUZ, B. Phytochemical constituents, antioxidant, cytotoxic, and antimicrobial activities of the ethanolic extract of Mexican brown propolis. **Antioxidants**, v. 9, n. 1, p. 70, 2020.
- RUFINO, MARIA DO S. M.; ALVES, RICARDO E.; BRITO, E. S.; MORAIS, SELENE M. DE.; SAMPAIO, CAROLINE DE G.; JIMÉNEZ, JARA P.; CALIXTO, FULGENCIO D. S. Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pela Captura do Radical Livre ABTS⁺. **Comunicado Técnico 128**, Embrapa, 2007.
- SAIFULLAH, M.; SHISHIR, M. R. I.; FERDOWSI, R.; TANVER RAHMAN, M. R.; VANVUONG, Q. Micro and nano encapsulation, retention and controlled release of flavor and aroma compounds: a critical review. **Trends in Food Science and Technology**, v. 86, p. 230-251, 2019.
- SALEH, K.; ZHANG, T.; FEARNLEY, J.; WATSON, D. G. A Comparison of the constituents of propolis from different regions of the United Kingdom by liquid chromatography-high resolution mass spectrometry using a metabolomics approach. **Current Metabolomics**, v. 3, p. 42-53, 2015.

SAMBORSKA, K.; BOOSTANI, S.; GERANPOUR, M.; HOSSEINI, H.; DIMA, C.; KHOSHNOUDI-NIA, S.; ROSTAMABADI, H.; FALSAFI, S. R.; SHADDEL, R.; AKBARI-ALAVIJEH, S.; JAFARI, S. M. Green biopolymers from by-products as wall materials for spray drying microencapsulation of phytochemicals. **Trends in Food Science & Technology**, v. 108, p. 297-325, 2021.

SANTOS, R. D., SHETTY, K.; DA SILVA MIGLIORANZA, L. H. Oxidative stability of butter with added phenolics from Lamiaceae herbs and in vitro evaluation of potential cytotoxicity of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) extract. **Int J Food Sci Technol**, v. 49, n. 3, p. 768-775, 2014.

SCHUCK, P.; JEANTET, R.; TANGUY, G.; MÉJEAN, S.; GAC, A.; LEFEBVRE T.; LABUSSIÈRE, E.; MARTINEAU, C. Energy consumption in the processing of dairy and feed powders by evaporation and drying. **Drying Technology**, v. 33, n. 2, p.176-184, 2015.

SHAHIDI, F.; WANASUNDARA, U. N. Methods for measuring oxidative rancidity in fats and oils. In: AKOH, C. C.; MIN, D. B. **Food lipids: chemistry, nutrition and biotechnology**, v. 3, p. 387-407, 2008.

SHARAF, S., HIGAZY, A., HEBEISH, A. Propolis induced antibacterial activity and other technical properties of cotton textiles. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 59, p. 408-416, 2013.

SILVA, C. C. G.; SILVA, S. P. M.; PRATES, J. A. M.; BESSA, R. J. B.; ROSA, H. J. D.; REGO, O. A. Physicochemical traits and sensory quality of commercial butter produced in the Azores, **International Dairy Journal**,v. 88, p. 10-17, 2019.

SILVA, F. A. M.; BORGES, M. F. M.; FERREIRA, M. Métodos para avaliação do grau de oxidação lipídica e da capacidade antioxidante. **Química Nova**. v. 22, n. 1, p. 4-6, 1998.

SPINELLI, S.; CONTE, A.; LECCE, L.; INCORONATO, A. L.; DEL NOBILE, M. A. Microencapsulated propolis in fish burgers. **J. Food Process. Eng.**, v. 38, p. 527-535, 2015.

SOLEIMANIFARD, M.; FEIZY, J.; MAESTRELLI, F. Nanoencapsulation of propolis extract by sodium caseinate-maltodextrin complexes. **Food and Bioproducts Processing**, v. 128, p. 177-185, 2021.

UKWUEZE, S. E.; OSADEBE, P. O.; OKOYE, F. B. A new antibacterial benzophenone glycoside from *Psidium guajava* (Linn.) leaves. **Nat Prod Res**. v. 29, n. 18, p. 1728-1734, 2015.

VARGAS-SÁNCHEZ, R. D.; TORRESCANO-URRUTIA, G. R.; SÁNCHEZ-ESCALANTE, A. El propóleos: conservador potencial para la industria alimentaria. **Interciencia**, v. 38, p. 705-711, 2013.

VIEIRA DE MORAIS, D.; ROSALEN, P. L.; IKEGAKI, M.; SILVA, A. P. S.; MASSARIOLI, A. P.; DE ALENCAR, S. M. Active Antioxidant phenolics from brazilian red propolis: an optimization study for their recovery and identification by LC-ESI-QTOF-MS/MS. **Antioxidants**, v. 10, n. 2, p. 297, 2021.

VIUDA-MARTOS, M., RUIZ-NAVAJAS, Y., FERNANDEZ-LOPEZ, J., PEREZ-ALVAREZ, J. Functional properties of honey, propolis and royal jelly. **Concise Reviews and Hypotheses in Food Science**, v. 73, n. 9, p. 117-124, 2008.

XU, X.; PU, R.; LI, Y.; WU, Z.; LI, C.; MIAO, X.; YANG, W. Chemical compositions of propolis from China and the United States and their antimicrobial activities against *Penicillium notatum*. **Molecules**, v. 24, n. 19, p. 3576, 2019.

ZHANG, H.; FU, Y.; NIU, F.; LI, Z.; BA, C.; JIN, B.; CHEN, G.; LI, X. Enhanced antioxidant activity and in vitro release of propolis by acid-induced aggregation using heat-denatured zein and carboxymethyl chitosan. **Food Hydrocolloids**, v. 81, p. 104-112, 2018.

ZHAO, C.; SHEN, X.; GUO, M. Stability of lutein encapsulated whey protein nanoemulsion during storage. **PLoS One**, v. 13, n. 2, p. 1-10, 2018.

ZHOU, J.; XIONG, Y.; SHI, Y. Antioxidant consumption kinetics and shelf-life prediction for biodiesel stabilized with antioxidants using the rancimat method. **Energy and Fuels**, v. 30, n. 12, p. 10534-10542, 2016.

APÊNDICE A – MODELO DO TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E
ESCLARECIDO (TCLE) UTILIZADA PARA APLICAÇÃO DO TESTE SENSORIAL

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO
(TCLE)

O(a) Sr(a) está sendo convidado a participar da avaliação sensorial de manteiga adicionado de extrato de própolis em pó, sob a responsabilidade da Pesquisadora Lidiana Souza Correia Lima, aluna de doutorado da Universidade Federal do Ceará, *Campus Pici*, Fortaleza-CE. O objetivo desta pesquisa é desenvolver um pó feito com própolis e soro de leite, para estudo como conservante natural em manteiga e desta forma verificar através do teste sensorial triangular se houve diferença significativa com a adição do produto na amostra.

Sua participação é voluntária e se dará por meio da degustação de amostras de manteigas para avaliarmos se existe diferença entre as amostras por consumidores potenciais. Sua participação não implicará em riscos a sua saúde e, caso aceite participar, estará contribuindo para o desenvolvimento científico nacional. **Se você for alérgico a leite ou intolerante a lactose não deve participar.** Se depois de consentir a sua participação o(a) Sr(a) desistir de continuar participando, tem o direito e a liberdade de retirar seu consentimento em qualquer momento da pesquisa, seja antes ou depois da coleta dos dados, independente do motivo e sem nenhum prejuízo a sua pessoa.

Os resultados da pesquisa serão analisados e publicados, mas sua identidade não será divulgada, sendo mantida em sigilo.

Para qualquer outra informação, o(a) Sr(a) poderá entrar em contato com a pesquisadora no endereço Avenida Mister Hull, 2977, Bloco 858, *Campus do Pici* - Fortaleza - CE, ou com Comitê de Ética em Pesquisa da UFC/PROPESQ – Rua Coronel Nunes de Melo, 1000 - Rodolfo Teófilo, fone: 3366-8344. (Horário: 08:00-12:00 horas de segunda a sexta-feira).

Consentimento Pós-Informação Declaro que fui informado sobre o projeto de pesquisa e sobre minha colaboração, e compreendi os objetivos. Por isso, concordo em participar da pesquisa, sabendo que a qualquer momento posso retirar meu consentimento em participar. Este documento é emitido em duas vias que serão ambas assinadas por mim e pelo pesquisador, ficando uma via com cada um de nós.

Data: 24/11/2020

Ciente: _____

Assinatura do participante

Data: 24/11/2020

Nome do pesquisadora: **Lidiana Souza Correia Lima**

Assinatura da pesquisadora

APÊNDICE B – MODELO DE FICHA UTILIZADA PARA APLICAÇÃO DO TESTE TRIANGULAR.

TESTE TRIANGULAR

NOME _____ IDADE: 18 – 25 () 26 – 35 () 36 – 56 () 57 – 60 ()

ESCOLARIDADE: _____ DATA: _____

1) Com que frequência você consome manteiga? 2) O quanto você gosta de manteiga?

() Diariamente

() Gosto muitíssimo

() Semanalmente (2 -3 x)

() Gosto muito

() Ocasionalmente

() Não gosto

() Quinzenalmente

() Gosto ligeiramente

Você está recebendo três amostras codificadas de MANTEIGA ADICIONADA DE EXTRATO DE PRÓPOLIS EM PÓ. Duas amostras são iguais e uma é diferente. Por favor, prove as amostras da esquerda para direita e circule o número que corresponde a amostra diferente.

Comentários: _____

APÊNDICE C - TABELA 13 - PARÂMETROS ANALÍTICOS E COMPOSTOS BIOATIVOS DETERMINADOS POR LC-MS/MS PARA AS AMOSTRAS DE PRÓPOLIS IN NATURA E ENCAPSULADA EM SORO DE LEITE (PPSL).

Tabela 13 - Parâmetros analíticos e compostos bioativos determinados por LC-MS/MS para as amostras de própolis *in natura* e encapsulada em soro de leite (PPSL).

| Pico | Composto | Fórmula molecular | T _r (min) | [M-H] ⁻ Observado | [M-H] ⁻ Calculado | Fragmentos de íons (MS/MS) | Erro (ppm) | Amostra de própolis | | Referências |
|------|-------------------------|---|----------------------|------------------------------|------------------------------|--|------------|---------------------|------------------|------------------------|
| | | | | | | | | PPSL | <i>in natura</i> | |
| 1 | Kaempferol derivado | C ₂₉ H ₁₇ O ₁₅ | 2,74 | 455,0812 | 455,0826 | 303,0707; 285,0627; 169,0144; 125,0216 | -1,5 | + | + | * |
| 2 | Galato de metila | C ₈ H ₇ O ₅ | 3,20 | 183,0266 | 183,0293 | 125,0213, 124,0133 | 1,6 | + | + | Chang et al. (2008) |
| 3 | Kaempferol derivado | C ₂₆ H ₂₃ O ₁₇ | 3,47 | 607,0929 | 607,0935 | 455,0782, 437,0727, 285,0573, 169,0144; 125,0232 | -0,7 | + | + | * |
| 4 | Kaempferol derivado | C ₃₃ H ₂₇ O ₂₁ | 3,98 | 759,1033 | 759,1045 | 607,1250, 589,0784; 437,0558; 285,0658; 169,0052, 125,0188 | -2,4 | + | + | * |
| 5 | Garcimangosone D | C ₁₉ H ₂₀ O ₉ | 4,08 | 427,0794 | 427,0796 | 229,0462 | -0,1 | + | + | Ukwueze et al. (2015) |
| 6 | Miricetina | C ₂₁ H ₁₉ O ₁₂ | 4,20 | 463,0863 | 463,0877 | 316,0192 | -3,0 | + | + | Bonin et al. (2020) |
| 7 | Quercetina 3-ramnosídeo | C ₂₁ H ₁₉ O ₁₁ | 4,71 | 447,0917 | 447,0927 | 300,0235 | -1,1 | + | + | Ferreres et al. (1996) |
| 8 | Isoscoparina | C ₂₂ H ₂₁ O ₁₁ | 4,97 | 461,1069 | 461,1084 | 315,0087; 299,0547; 283,0166 | -1,8 | + | + | Lv et al. (2018) |
| 9 | Isômero de isoscoparina | C ₂₂ H ₂₁ O ₁₁ | 5,26 | 461,1078 | 461,1084 | 315,0015; 299,0587; 283,0201 | -0,7 | + | + | Lv et al. (2018) |

Tabela 13 - Parâmetros analíticos e compostos bioativos determinados por LC-MS/MS para as amostras de própolis *in natura* e encapsulada em soro de leite (PPSL) (continua).

| Pico | Composto | Fórmula molecular | T _r (min) | [M-H] ⁻ Observado | [M-H] ⁻ Calculado | Fragmentos de íons (MS/MS) | Erro (ppm) | Amostra de própolis | | Referências |
|------|------------------------------------|--|----------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------|---------------------|------------------|--|
| | | | | | | | | PPSL | <i>in natura</i> | |
| 10 | Kaempferol | C ₁₅ H ₉ O ₆ | 5,91 | 285,0421 | 285,0399 | 151,0011; 133,0279 | -4,2 | + | + | Ristivojević et al. (2018); Saleh et al. (2015); Bonin et al. (2020) |
| 11 | Tamarixetina | C ₁₆ H ₁₁ O ₇ | 5,97 | 315,0465 | 315,0475 | 300,0240; 151,0030 | -1,1 | + | + | Falcão et al. (2013) |
| 12 | Quercetina | C ₁₅ H ₉ O ₇ | 6,07 | 301,0345 | 301,0348 | 193,0092 | -0,3 | + | + | Ristivojević et al. (2018) |
| 13 | Isorhamnetina | C ₁₆ H ₁₁ O ₇ | 6,25 | 315,0490 | 315,0505 | 300,0229; 271,0190 | -1,2 | + | + | Falcão et al. (2013) |
| 14 | Seringetina | C ₁₇ H ₁₃ O ₈ | 6,33 | 345,0562 | 345,0577 | 330,0317; 315,0403; 151,0015 | -0,6 | + | + | Falcão et al. (2013) |
| 15 | Isômero de isorhamnetina | C ₁₆ H ₁₁ O ₇ | 6,47 | 315,0500 | 315,0505 | 300,0263; 271,0223 | -0,2 | + | + | Falcão et al. (2013) |
| 16 | Apigenina | C ₁₅ H ₉ O ₅ | 6,59 | 269,0429 | 269,0450 | 151,0004 | -1,8 | + | + | Bonin et al. (2020) |
| 17 | Nariagenina | C ₁₅ H ₁₁ O ₅ | 6,61 | 271,0573 | 271,0606 | 151,0020 | -3,9 | + | + | Bonin et al. (2020) |
| 18 | Kaempferol-3-metil éter | C ₁₆ H ₁₁ O ₆ | 6,73 | 299,0488 | 299,0515 | 284,0267; 151,0019 | -4,3 | + | + | Saleh et al. (2015) |
| 19 | 3-Metoxiluteolina | C ₁₆ H ₁₁ O ₇ | 6,84 | 315,0480 | 315,0505 | 300,0286; 192,0020 | 1,9 | + | + | Falcão et al. (2013) |
| 20 | Kaempferol-7-metil éter | C ₁₆ H ₁₁ O ₆ | 7,06 | 299,0484 | 299,0515 | 284,0257; 150,9998 | -4,4 | + | + | Xu et al. (2019); Saleh et al. (2015) |
| 21 | Isômero de quercetina-dimetil éter | C ₁₇ H ₁₃ O ₇ | 7,20 | 329,0617 | 329,0661 | 314,0404; 299,0202; 271,0213 | -3,4 | + | + | Xu et al. (2019); Saleh et al. (2015) |

Tabela 13 - Parâmetros analíticos e compostos bioativos determinados por LC-MS/MS para as amostras de própolis *in natura* e encapsulada em soro de leite (PPSL) (continua).

| Pico | Composto | Fórmula molecular | T _r (min) | [M-H] ⁻ Observado | [M-H] ⁻ Calculado | Fragmentos de íons (MS/MS) | Erro (ppm) | Amostra de própolis | | Referências |
|------|--|--|----------------------|------------------------------|------------------------------|--|------------|---------------------|------------------|---------------------------------------|
| | | | | | | | | PPSL | <i>in natura</i> | |
| 22 | Isômero de quercetina-dimetil éter | C ₁₇ H ₁₃ O ₇ | 7,22 | 329,0669 | 329,0661 | 314,0359; 299,0198; 271,0197 | 0,4 | + | + | Xu et al. (2019); Saleh et al. (2015) |
| 23 | Metil pinobanksin | C ₁₆ H ₁₃ O ₅ | 7,40 | 285,0766 | 285,0763 | 165,0177; 119,0471 | 0,2 | + | + | Xu et al. (2019); Saleh et al. (2015) |
| 24 | Homoeriodictiol | C ₁₆ H ₁₃ O ₆ | 7,64 | 301,0681 | 301,0712 | 285,0695; 149,9937; 135,0423 | -3,0 | + | + | Isidorov et al. (2016) |
| 25 | Pinocembrina-7-metil éter | C ₁₆ H ₁₃ O ₄ | 7,71 | 269,0775 | 269,0814 | 255,0775; 150,9973; 135,0424; 119,0491 | -3,7 | + | + | Pavlovic et al. (2020) |
| 26 | Kaempferol-3,5-dimetil éter | C ₁₇ H ₁₃ O ₆ | 7,79 | 313,0682 | 313,0712 | 283,0245; 255,0283 | -3,4 | + | + | Falcão et al. (2013) |
| 27 | Ramnetina | C ₁₆ H ₁₁ O ₇ | 7,91 | 315,0454 | 315,0480 | 283,0193; 165,0155 | -1,0 | + | + | Pavlovic et al. (2020) |
| 28 | Dillenetina | C ₁₇ H ₁₃ O ₇ | 8,06 | 329,0608 | 329,0631 | 314,0424; 299,0165; 271,0201; 135,0037 | -2,2 | + | + | Rivero-Cruz et al. (2020) |
| 29 | 5,7-Diidroxi-3',4',5'-trimetoxiflavona | C ₁₈ H ₁₅ O ₇ | 8,22 | 343,0766 | 343,0788 | 313,0295; 270,0148; 151,0047 | -1,0 | + | + | Abd El-Hady et al. (2007) |
| 30 | Sakuranetina | C ₁₆ H ₁₃ O ₅ | 8,49 | 285,0720 | 285,0763 | 270,0111; 165,0144; 119,0467 | -3,2 | + | + | Park et al. (1998) |
| 31 | Acacetina | C ₁₆ H ₁₁ O ₅ | 8,61 | 283,0627 | 283,0610 | 268,0324; 151,0010 | 2,5 | + | - | Albuquerque et al. (2007) |
| 32 | Kaempferol 7,4'-dimetil éter | C ₁₇ H ₁₃ O ₇ | 8,96 | 329,0691 | 329,0661 | 299,0414; 165,0217 | 3,5 | + | - | Abd El-Hady et al. (2007) |

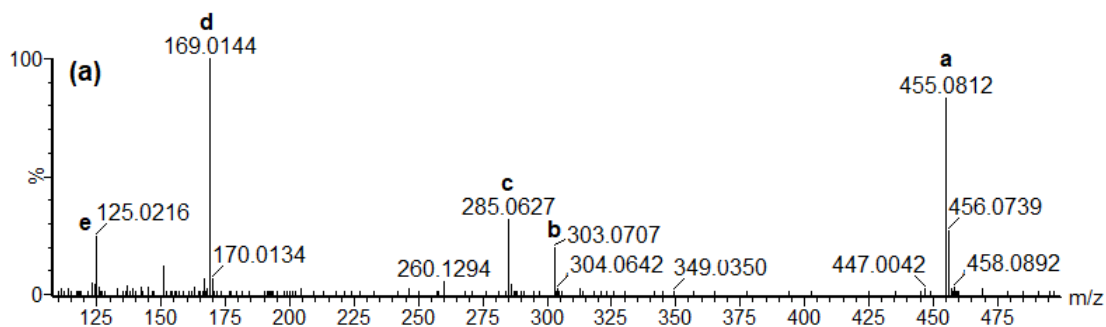
Tabela 13 - Parâmetros analíticos e compostos bioativos determinados por LC-MS/MS para as amostras de própolis *in natura* e encapsulada em soro de leite (PPSL) (conclusão).

| Pico | Composto | Fórmula molecular | T _r (min) | [M-H] ⁻ Observado | [M-H] ⁻ Calculado | Fragmentos de íons (MS/MS) | Erro (ppm) | Amostra de própolis | | Referências |
|------|---------------------------------|--|----------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------|---------------------|------------------|--|
| | | | | | | | | PPSL | <i>in natura</i> | |
| 33 | Kaempferol-3,4'-dimetil éter | C ₁₇ H ₁₃ O ₆ | 9,03 | 313,0715 | 313,0712 | 283,0247; 255,0285 | -0,3 | + | - | Xu et al. (2019); Falcão et al. (2013) |
| 34 | Quercetina 3,5,3'-trimetil éter | C ₁₈ H ₁₅ O ₇ | 9,26 | 343,0792 | 343,0818 | 328,0529; 270,0123; 162,8337 | -0,5 | + | - | Xu et al. (2019); Falcão et al. (2013) |
| 35 | Medicarpina | C ₁₆ H ₁₃ O ₄ | 9,32 | 269,0814 | 269,0814 | 254,0545; 148,0130; 135,0050 | 0,0 | + | - | Omar et al. (2015) |
| 36 | 8-Prenilnaringenina | C ₂₀ H ₁₉ O ₅ | 9,49 | 339,1213 | 339,1232 | 271,1002; 151,0031 | -2,1 | + | - | Omar et al. (2015) |

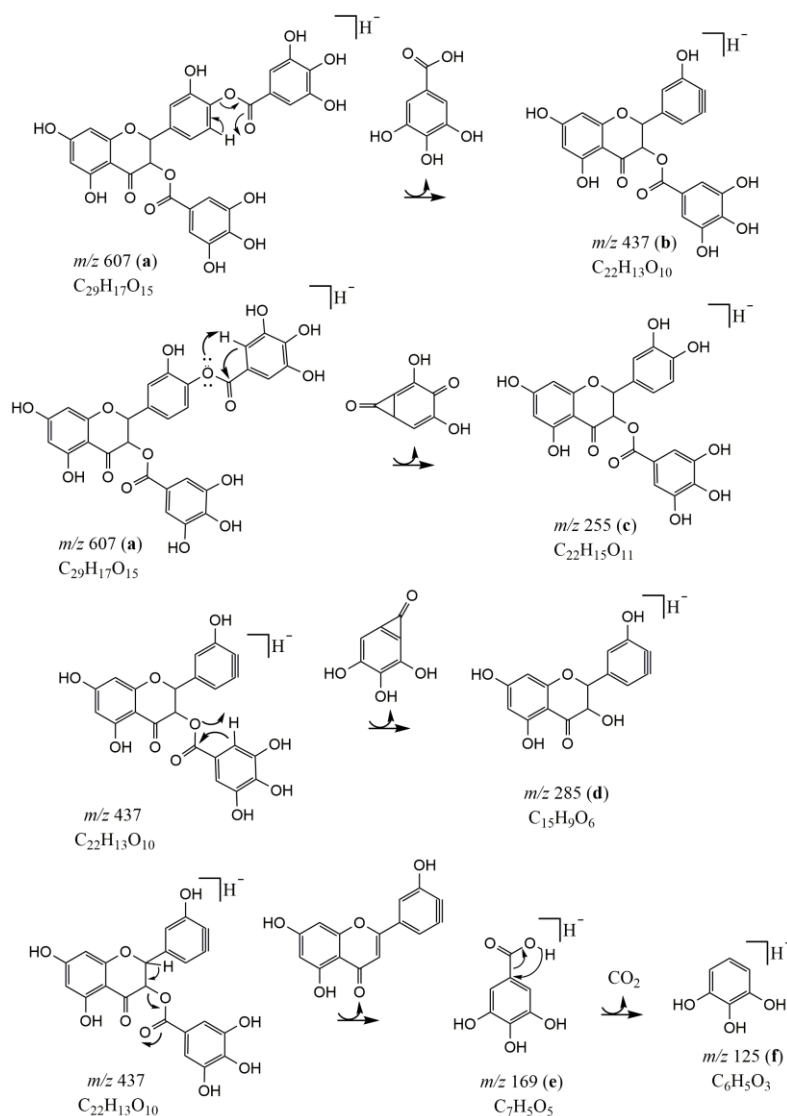
*Descrito neste trabalho.

**APÊNDICE D - PROPOSTA DE FRAGMENTAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DOS
COMPOSTOS KAEMPFEROL DERIVADO COM PICOS DE NÚMEROS 1, 3 E
4 NA CARACTERIZAÇÃO LC-ESI-QTOF/MS DE COMPOSTOS
POLIFENÓLICOS DE PPSL E PRÓPOLIS *IN NATURA***

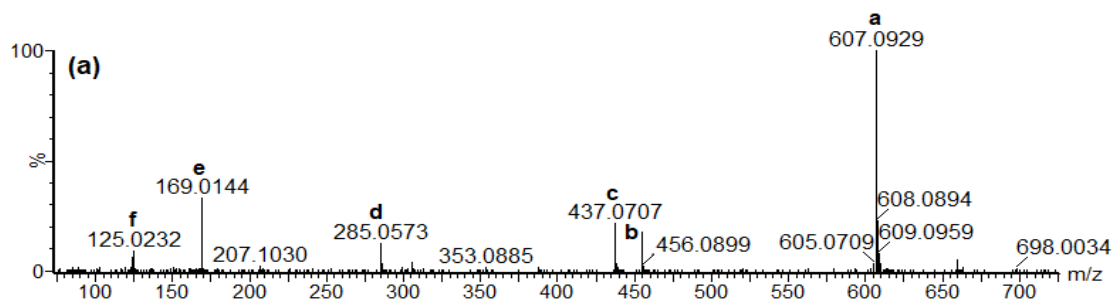
Pico número 1



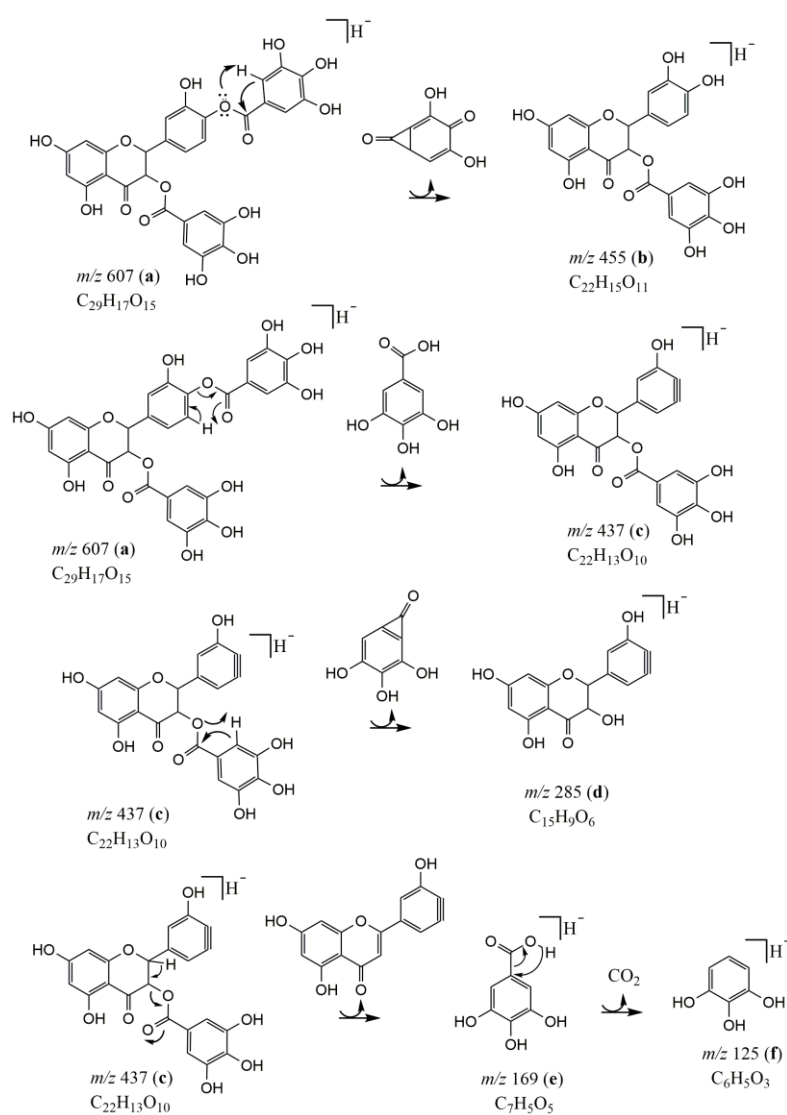
(b)



Pico número 3

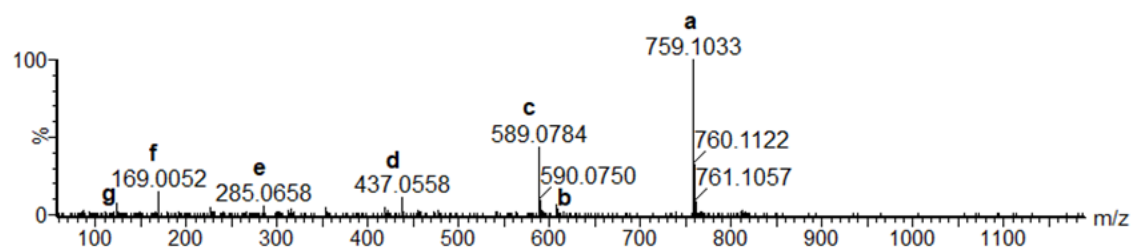


(b)

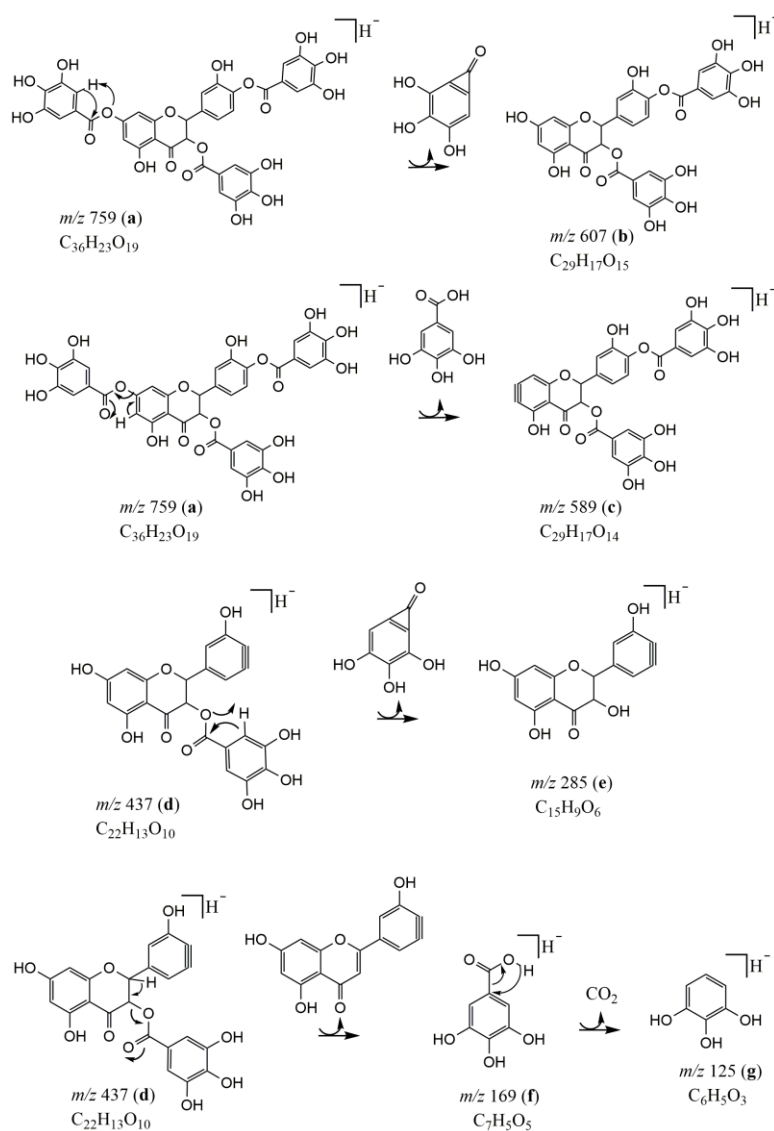


Pico número 4

(a)



(b)



**ANEXO A - NÚMERO DE JULGADORES NECESSÁRIOS PARA TESTE
TRIANGULAR**

Tabela 14 - Número de julgadores necessários para teste triangular.

| α | | β | | | | |
|----------|----------|---------|------|------|------|-------|
| | | 0,20 | 0,10 | 0,05 | 0,01 | 0,001 |
| 0,20 | Pd = 50% | 7 | 12 | 16 | 25 | 36 |
| 0,10 | | 12 | 15 | 20 | 30 | 43 |
| 0,05 | | 16 | 20 | 23 | 35 | 48 |
| 0,01 | | 25 | 30 | 35 | 47 | 62 |
| 0,001 | | 36 | 43 | 48 | 62 | 81 |
| 0,20 | Pd = 40% | 12 | 17 | 25 | 36 | 55 |
| 0,10 | | 17 | 25 | 30 | 46 | 67 |
| 0,05 | | 23 | 30 | 40 | 57 | 79 |
| 0,01 | | 35 | 47 | 56 | 76 | 102 |
| 0,001 | | 55 | 68 | 76 | 102 | 130 |
| 0,20 | Pd = 30% | 20 | 28 | 39 | 64 | 97 |
| 0,10 | | 30 | 43 | 54 | 81 | 119 |
| 0,05 | | 40 | 53 | 66 | 98 | 136 |
| 0,01 | | 62 | 82 | 97 | 131 | 181 |
| 0,001 | | 93 | 120 | 138 | 181 | 233 |
| 0,20 | Pd = 20% | 39 | 64 | 86 | 140 | 212 |
| 0,10 | | 62 | 89 | 119 | 178 | 260 |
| 0,05 | | 87 | 117 | 147 | 213 | 305 |
| 0,01 | | 136 | 176 | 211 | 292 | 397 |
| 0,001 | | 207 | 257 | 302 | 396 | 513 |
| 0,20 | Pd = 10% | 149 | 238 | 325 | 529 | 819 |
| 0,10 | | 240 | 348 | 457 | 683 | 1011 |
| 0,05 | | 325 | 447 | 572 | 828 | 1181 |
| 0,01 | | 525 | 680 | 824 | 1132 | 1539 |
| 0,001 | | 803 | 996 | 1165 | 1530 | 1992 |

Fonte: ASTM, E1885 – 04.