



BEATRIZ CAMARGO BARROS DE SILVEIRA MELLO

**“EXTRAÇÃO DE PRÓPOLIS EM MEIO AQUOSO E
CONCENTRAÇÃO DOS EXTRATOS POR
NANOFILTRAÇÃO”**

Campinas

2013



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

BEATRIZ CAMARGO BARROS DE SILVEIRA MELLO

“EXTRAÇÃO DE PRÓPOLIS EM MEIO AQUOSO E CONCENTRAÇÃO DOS EXTRATOS POR NANOFILTRAÇÃO”

Orientadora: Miriam Dupas Hubinger

Co-orientador: José Carlos Cunha Petrus

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Doutora em Engenharia de Alimentos.

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA TESE
DEFENDIDA PELA ALUNA BEATRIZ CAMARGO BARROS DE
SILVEIRA MELLO E ORIENTADA PELA PROFA.DRA. MIRIAM DUPAS
HUBINGER

Assinatura do Orientador

CAMPINAS – SÃO PAULO

2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
CLAUDIA AP. ROMANO DE SOUZA – CRB8/5816 - BIBLIOTECA DA FACULDADE DE
ENGENHARIA DE ALIMENTOS – UNICAMP

M489e Mello, Beatriz Camargo Barros de Silveira, 1983-
Extração de própolis em meio aquoso e concentração
dos extratos por nanofiltração / Beatriz Camargo Barros de
Silveira Mello. -- Campinas, SP: [s.n.], 2013.

Orientador: Miriam Dupas Hubinger.
Coorientador: José Carlos Cunha Petrus.
Tese (doutorado) - Universidade Estadual de
Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. Própolis. 2. Extração. 3. Nanofiltração. 4.
Planejamento experimental. 5. Flavonóides. I.
Hubinger, Miriam Dupas. II. Petrus, José Carlos Cunha.
III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de
Engenharia de Alimentos. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em inglês: Propolis extraction in aqueous media and extracts
concentration by nanofiltration

Palavras-chave em inglês:

Propolis

Extraction

Nanofiltration

Experimental design

Flavonoids

Área de concentração: Engenharia de alimentos

Titulação: Doutora em Engenharia de Alimentos

Banca examinadora:

Miriam Dupas Hubinger

Fernando Antônio Cabral

Marco Di Luccio

Silvia Silveira Clareto

Maurício Ariel Rostagno

Data da defesa: 08-02-2013

Programa de Pós Graduação: Engenharia de Alimentos

Banca Examinadora

Profa. Dra. Miriam Dupas Hubinger
Orientadora DEA-FEA/UNICAMP

Prof. Dr. Fernando Antônio Cabral
Membro Titular DEA-FEA/UNICAMP

Prof. Dr. Marco Di Luccio
Membro Titular EQA/UFSC

Profa. Dra. Silvia Silveira Clareto
Membro Titular UNIFAL

Dr. Maurício Ariel Rostagno
Membro Titular DEA-FEA/UNICAMP

Profa. Dra. Miria Hespanhol Miranda Reis
Membro Suplente FEQ/UFU

Dra. Fernanda Yumi Ushikubo
Membro Suplente DEA-FEA/UNICAMP

Dra. Losiane Cristina Paviani Diehl
Membro Suplente DEA-FEA/UNICAMP

*Aos meus pais, Maria Cecília
e Waldomiro, sempre tão
amorosos e dedicados,
a quem devo tudo que sou.*

*Ao Alan, que me faz uma
pessoa melhor todos os dias.*

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, por todo amor, carinho, dedicação e apoio.

Aos meus irmãos, que junto com meus pais, formam minha família.

Ao Alan, meu namorado e amigo que sempre esteve presente e paciente.

À Profa. Dra. Miriam pela orientação e ao Prof. Dr. Petrus pela co-orientação.

Aos membros da banca pelas sugestões propostas para o enriquecimento do trabalho.

Aos colegas do laboratório pela ajuda na resolução de problemas e pelos momentos de descontração.

À Unicamp e à Faculdade de Engenharia de Alimentos pela contribuição na minha formação.

Ao Cnpq e à FAPESP pelo auxílio financeiro para realização deste trabalho.

"O segredo é quebrar os problemas em pequenos pedaços administráveis. Se você lidar com eles, termina antes de saber disso."

“Se nós não pudéssemos rir das coisas que não fazem sentido, nós não poderíamos reagir a muitas coisas da vida.”

“Faça o que tem que fazer e deixe os outros discutirem se é certo ou não.”

Calvin e Haroldo – Bill Watterson.

Resumo

A própolis é um produto natural rico em flavonóides e ácidos fenólicos, além de outros grupos químicos, incluindo minerais e vitaminas. O uso do álcool como solvente gera alguns entraves, tanto para o consumo direto quanto para o uso na indústria de alimentos, como o seu alto sabor residual e algumas reações adversas. Uma forma de viabilizar o uso da água como solvente é o estudo da extração em diferentes pHs seguida de concentração do extrato, que além de ser necessária para o uso industrial, reduz a quantidade de solvente na solução. Em vista disso, esta tese visou desenvolver um novo extrato de própolis, proveniente do extrato aquoso obtido em pHs diferenciados (4,3-8,0), sendo concentrado por nanofiltração. O extrato preparado com pH 8,0 apresentou um aumento de 40% em compostos fenólicos e atividade antioxidante duas vezes maior que o extrato aquoso sem alteração de pH (4,3). Foram realizados diversos ensaios do processo de nanofiltração com variação de temperatura (23-57°C), pressão (5,3-8,7 bar) e pH de extração (4,3-7,7), seguindo um planejamento fatorial 2^3 , com 17 ensaios totais. Como variáveis de resposta, analisou-se o teor de flavonóides e polifenóis do produto concentrado, e o fluxo de permeado durante o processamento. O fluxo de permeado variou entre 25 e 75 L/(h.m²) de acordo com a pressão e temperatura utilizada, ambas atuando de forma diretamente proporcional ao fluxo. A validade do processo foi medida pela comparação dos produtos obtidos da concentração dos extratos aquosos com o extrato alcoólico tradicional, considerando-se o teor de flavonóides e compostos fenólicos existentes no extrato concentrado. Além disso, foi feita uma avaliação da vida de prateleira dos extratos obtidos durante 90 dias em diferentes temperaturas (5°C, 22°C e 40°C) para verificar a estabilidade do produto frente às diversas condições de estocagem. Verificou-se que os compostos funcionais do extrato aquoso de própolis foram susceptíveis ao tempo de armazenamento e à temperatura, sendo que os melhores resultados foram obtidos para temperatura de 5°C, em que houve uma menor degradação dos compostos com o tempo. O extrato de própolis aquoso preparado em meio alcalino, seguido de nanofiltração gerou um produto rico em compostos fenólicos e flavonóides, podendo ser uma alternativa ao extrato etanólico.

Palavras-chave: própolis, extração, nanofiltração, planejamento experimental, flavonóides

Abstract

Propolis is a natural product rich in flavonoids and phenolic compounds and also other chemical groups, as mineral and vitamins (provitamins A and B complex vitamins). Its extract is commercially found in alcoholic solution but the use of ethanol as solvent can have some disadvantages for human consumption and for industrial application, due to the high residual flavor and adverse reactions. One way of making water a feasible solvent is studying the extraction at different pHs and the concentration of the extract. The concentration is needed for industrial usage, since it reduces the solvent amount. This thesis envisioned the development of a novel propolis extract from aqueous products with different pHs, using membrane concentration by nanofiltration. The extract prepared with pH 8,0 showed a 40% increase on phenolic compounds and antioxidant activity two times higher than the aqueous extract without any pH modification. Several trials for membrane concentration, varying the temperature (23-57°C), pressure (5,3-8,7 bar) and pH (4,3-7,7) of the extraction were carried out, following a 2³ experimental design, with 17 assays. Flavonoids and phenolic compounds of the concentrate during the process were analyzed as response variables. Permeate flux varied between 25 and 75 L/h.m² depending on the applied pressure and temperature, both acting directly proportional to the flux. The validity of the process was measured using the comparison among the products obtained through traditional alcoholic and aqueous extract concentration, considering the amount of flavonoids and phenolic compounds between the concentrated and permeated extracts. Moreover, the evaluation of shelf life of the extracts was carried out considering different temperature conditions (5°, 22° and 40° C) during 90 days. The functional compounds of the aqueous extract were susceptible to the storage temperature and the best results were obtained at 5°C, condition that preserved the functional compounds along the storage time. Alkaline aqueous propolis extract, followed by a nanofiltration process, made a product rich in interest functional compounds becoming an alternative to the ethanolic extract.

Keywords: propolis, extraction, nanofiltration, experimental design, flavonoids

Sumário

1. Introdução.....	1
2. Objetivos.....	5
3. Revisão Bibliográfica.....	7
3.1. Própolis.....	7
3.1.1. Importância Econômica.....	10
3.1.2. Atividades Biológicas da Própolis.....	11
3.1.3. Composição Química.....	13
3.1.4. Atividade Antioxidante.....	18
3.1.5. Atividade Antimicrobiana.....	21
3.2. Processos de concentração por membranas : Nanofiltração.....	22
3.2.1. Fenômenos envolvidos no processo.....	27
3.2.2. Parâmetros Operacionais	29
3.2.3. Modelos de Transporte.....	30
3.3. Concentração de extratos vegetais.....	37
4. Material e Métodos.....	39
4.1. Própolis.....	39
4.2. Preparo dos extratos.....	39
4.3. Caracterização físico-química dos extratos iniciais.....	41
4.3.1. Determinação da viscosidade e densidade das soluções.....	41
4.3.2. Determinação de flavonóides totais.....	42
4.3.3. Determinação de substâncias fenólicas totais.....	44
4.3.4. Avaliação da atividade antioxidante.....	44
4.4. Análise estatística.....	47
4.5. Processo de concentração por nanofiltração dos extratos de própolis.....	48
4.5.1. Membrana e equipamento de filtração.....	48
4.5.2. Planejamento Experimental.....	51
4.5.3. Caracterização dos produtos do processo de concentração.....	53
4.5.4. Validação do Planejamento Experimental.....	53
4.5.5. Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).....	53
4.5.6. Espectrofotometria na região ultravioleta-visível.....	54

4.5.7. Cor.....	55
4.5.8. Determinação da atividade antimicrobiana (Antibiograma) para extratos de própolis.....	56
4.5.9. Determinação do tamanho de partículas.....	57
4.5.10. Modelagem matemática.....	57
4.5.11. Limpeza da Membrana.....	60
5. Resultados e Discussão.....	63
5.1. Avaliação do tempo de extração em amostras com alteração de pH.....	63
5.2. Caracterização dos extratos iniciais em diferentes pHs.....	65
5.2.1. Atividade antioxidante.....	68
5.3. Processo de concentração.....	73
5.3.1. Seleção das melhores condições operacionais.....	73
5.4. Validação dos resultados do planejamento experimental.....	84
5.5. Modelos de transporte.....	87
5.5.1. Cálculo das resistências.....	88
5.5.2. Modelos matemáticos.....	89
5.6. Análise dos produtos do processo de concentração por membranas.....	91
5.6.1. Cor.....	93
5.6.2. Cromatografia líquida de alta eficiência.....	96
5.6.3. Padrão espectrofotométrico na região U.V.-visível dos extratos de própolis...101	
5.6.4. Distribuição do tamanho de partículas.....	102
5.6.5. Atividade antimicrobiana.....	105
5.6.6. Estudo da vida de prateleira dos extratos aquosos de própolis.....	112
6. Conclusões.....	119
7. Sugestões para trabalhos futuros.....	121
8. Bibliografia.....	123

Índice de Figuras

Figura 3.1. A – Detalhe de própolis verde bruta. B e C – Própolis em colméia de abelhas ..	8
Figura 3.2. Diferentes tipos de própolis brasileira. A: verde; B: marrom; C: vermelha.	9
Figura 3.3. Estrutura básica de um fenol.....	14
Figura 3.4. Alguns compostos presentes na própolis.....	15
Figura 3.5. Alguns compostos presentes na própolis.....	17
Figura 3.6. Esquema de escoamento durante filtração convencional (perpendicular) e tangencial.....	23
Figura 3.7. Variação esquemática no fluxo permeado com o tempo de operação ocasionada por Polarização de Concentração e Incrustação.....	27
Figura 3.8. Resistências à transferência de massa em membranas porosas.	32
Figura 3.9. Mecanismos de bloqueio das membranas.....	34
Figura 3.10. Representação do modelo de filme.....	36
Figura 4.1. Viscosímetro Canon-Fenske.....	41
Figura 4.2. Formação do complexo flavonóide-alumínio.....	43
Figura 4.3. Diagrama de fluxo das etapas de preparação e avaliação dos extratos iniciais de própolis.....	47
Figura 4.4. Diagrama esquemático da unidade de filtração por membranas.....	48
Figura 4.5. Equipamento de filtração tangencial	49
Figura 4.6. Diagrama de Fluxo do processo de filtração tangencial.....	51
Figura 5.1. Variação percentual do pH dos extratos em função do tempo de extração (pH 4,3 (pH 5,0, (pH 6,0, () pH 7,0 e () pH 8,0.....	63
Figura 5.2. Conteúdo de flavonóides (*µg /mL extrato) ao longo do tempo de extração da própolis.....	64
Figura 5.3. Conteúdo de compostos fenólicos (**µg /mL extrato)ao longo do tempo de extração da própolis.	64
Figura 5.4. Atividade antioxidante de extratos de própolis pelo método DPPH.	69
Figura 5.5. Atividade anti-oxidante de extratos de própolis pelo método FTC.....	70

Figura 5.6. Superfícies de resposta e curvas de contorno para a resposta teor de compostos fenólicos	79
Figura 5.7. Superfícies de resposta e curvas de contorno para a resposta fluxo de permeado.	83
Figura 5.8. Fluxo de permeado obtido em sistema fechado para as condições selecionadas de processamento (pH 7,7; 8,7 bar e 30°C).....	85
Figura 5.9. Fluxo de permeado obtido em sistema aberto para as condições selecionadas de processamento (pH 7,7; 8,7 bar e 30°C).....	86
Figura 5.10. Fluxo de permeado de extrato aquoso de própolis em sistema aberto versus tempo de processamento (pH 7,7; 8,7 bar e 30°C).....	90
Figura 5.11. Produtos obtidos no processo de nanofiltração (pH 7,7; 8,7 bar e 30°C).	93
Figura 5.12. Representação do ângulo Hue dos diferentes produtos obtidos no processo de concentração, extrato alcoólico e aquoso sem alteração de pH.....	95
Figura 5.13. Cromatograma do extrato aquoso sem alteração de pH.....	97
Figura 5.14. Cromatograma do extrato aquoso em pH 7,7 (alimentação).....	97
Figura 5.15. Cromatograma do extrato aquoso concentrado.....	98
Figura 5.16. Cromatograma do extrato aquoso permeado.....	98
Figura 5.17. Cromatograma do extrato aquoso basificado a pH 7,7 após a centrifugação do extrato.....	98
Figura 5.18. Cromatograma do extrato alcoólico comercial.....	99
Figura 5.19. Espectrometria na região U.V.-visível dos produtos do processo de concentração com membranas, comparados com o extrato alcoólico e com o extrato aquoso sem alteração de pH.....	102
Figura 5.20. Distribuição do tamanho de partículas dos extratos de própolis.....	103
Figura 5.21. Estrutura da quercetina (aglicona) e suas formas glicosiladas.....	105
Figura 5.22. Inibição do crescimento de <i>Staphylococcus aureus</i> em diferentes extratos de própolis.	111
Figura 5.23. Extratos de própolis antes do armazenamento para avaliação da vida de prateleira.....	112

Figura 5.24. Extratos de própolis após o armazenamento por 90 dias a 5°C para avaliação da vida de prateleira.....	113
Figura 5.25. Extratos de própolis após o armazenamento por 90 dias a 22°C para avaliação da vida de prateleira.....	113
Figura 5.26. Extratos de própolis após o armazenamento por 90 dias a 40°C para avaliação da vida de prateleira.....	113
Figura 5.27. Teor de polifenóis ao longo de 90 dias de estocagem a 22°C.....	114
Figura 5.28. Teor de flavonóides ao longo de 90 dias de estocagem a 22°C	115
Figura 5.29. Teor de compostos fenólicos ao longo de 90 dias de estocagem a 5°C.....	115
Figura 5.30. Teor de flavonóides ao longo de 90 dias de estocagem a 5°C.....	116
Figura 5.31. Teor de compostos fenólicos ao longo de 90 dias de estocagem a 40°C.....	116
Figura 5.32. Teor de flavonóides ao longo de 90 dias de estocagem a 40°C.....	117
Figura B1. Curva padrão de quercetina hidratada.....	149
Figura B2. Cuva padrão de ácido gálico.....	150
Figura B3. Curva padrão de sulfato ferroso.....	151
Figura C1. Curva de permeação da água destilada em função do tempo.....	153

Índice de Tabelas

Tabela 3.1. Produção de mel nos cinco maiores estados produtores nacionais.....	11
Tabela 3.2. Produção de mel nos cinco maiores estados produtores nacionais.....	16
Tabela 3.3. Principais características dos processos de separação por membranas.....	24
Tabela 4.1. Principais características e parâmetros de operação da membrana.....	49
Tabela 4.2. Variáveis independentes e valores codificados e reais dos níveis utilizados no planejamento experimental fatorial 2 ³	51
Tabela 4.3. Ensaios para o planejamento experimental, variando os parâmetros temperatura (T), pressão (P) e pH.	52
Tabela 5.1. Densidade e viscosidade dos extratos obtidos em diferentes pHs.....	66
Tabela 5.2. Teor de flavonóides e compostos fenólicos dos extratos obtidos para extratos aquosos em diferentes pHs.....	67
Tabela 5.3. Atividade antioxidante de extratos de própolis.....	68
Tabela 5.4. Coeficiente de correlação de Pearson para atividade antioxidante, polifenóis e flavonóides em extrato aquoso de própolis.....	72
Tabela 5.5. Respostas obtidas para os ensaios do delineamento composto central rotacional 2 ³ , considerando-se os compostos presentes no produto concentrado.....	74
Tabela 5.6. Coeficientes de regressão e significância das variáveis temperatura, pressão e pH sobre a resposta teor de flavonóides no produto concentrado.....	75
Tabela 5.7. Análise de variância para a resposta teor de flavonóides no produto concentrado.	76
Tabela 5.8. Coeficientes de regressão e significância das variáveis temperatura, pressão e pH sobre a resposta teor de compostos fenólicos no produto concentrado.....	77
Tabela 5.9. Análise de variância para a resposta teor de compostos fenólicos no produto concentrado.....	78
Tabela 5.10. Coeficientes de regressão e significância das variáveis temperatura, pressão e pH sobre a resposta fluxo de permeado.....	81
Tabela 5.11. Análise de variância para a resposta fluxo de permeado.....	81

Tabela 5.12. Valores de fluxo para o cálculo das resistências.....	88
Tabela 5.13. Valores de resistências para nanofiltração de extratos de própolis.....	89
Tabela 5.14. Caracterização dos produtos do processo de concentração por membranas em relação à densidade, viscosidade, compostos fenólicos e flavonóides.....	91
Tabela 5.15. Caracterização dos produtos do processo de concentração por membranas em relação à atividade antioxidante.....	93
Tabela 5.16. Análise instrumental de cor pelo sistema CIELab para as amostras de permeado, alimentação, concentrado, alcoólica e em pH 4,3.....	94
Tabela 5.17. Concentração dos compostos identificados por HPLC.....	97
Tabela 5.18. Atividade antimicrobiana dos extratos aquosos e etanólico de própolis sobre <i>Staphylococcus aureus</i>	106
Tabela 5.19. Atividade antimicrobiana dos extratos aquosos e etanólico de própolis sobre <i>Salmonella choleraesuis</i>	106
Tabela 5.20. Atividade antimicrobiana dos extratos aquosos e etanólico de própolis sobre <i>Bacillus cereus</i>	107
Tabela 5.21. Atividade antimicrobiana dos extratos aquosos e etanólico de própolis sobre <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	107
Tabela 5.22. Atividade antimicrobiana dos extratos aquosos e etanólico de própolis sobre <i>Candida tropicalis</i>	108
Tabela 5.23. Atividade antimicrobiana dos extratos aquosos e etanólico de própolis sobre <i>Aspergillus flavus</i>	108
Tabela C1. Diferença Percentual do Fluxo de permeado após cada ensaio de concentração de extratos de própolis.....	154
Tabela E1. Tempo de retenção dos padrões utilizados no HPLC.....	157

Nomenclatura

MM = Massa molar (g/mol)

J = Fluxo de permeado (L/h.m²)

V_p = Volume de permeado (L)

A_p = Área de permeação da membrana (m²)

t = Tempo (s, h)

R = Índice de retenção

C_p = Concentração de determinado componente no permeado (µg/mL)

C_r = Concentração de determinado componente no concentrado (µg/mL)

F = Fator de concentração

m_a = Massa da alimentação (g, kg)

m_p = Massa de permeado (g, kg)

m_r = Massa de concentrado (g, kg)

P = Pressão (bar)

T = Temperatura (°C)

ρ = Densidade (kg/m³)

μ = Viscosidade (kg/m.s)

R_t = Resistência total do processo de concentração (m⁻¹)

R_m = Resistência ao transporte através da membrana (m⁻¹)

R_f = Resistência devido ao bloqueio físico dos poros (incrustação) (m⁻¹)

R_p = Resistência devido ao fenômeno da polarização de concentração (m⁻¹)

k = Constante para ajuste dos modelos matemáticos

η_w = Viscosidade da água pura (kg/m.s)

A = Medida de absorvância

R² = Coeficiente de determinação

1. Introdução

Com o aumento da preocupação com hábitos de vida e alimentares mais saudáveis, o consumo de alimentos com propriedades funcionais têm crescido consideravelmente. Neste contexto, os produtos apícolas vêm despertando um grande interesse, tanto nos consumidores quanto nos pesquisadores, graças à sua rica composição química. A própolis em especial, destaca-se quanto às suas propriedades terapêuticas (antimicrobiana, antiinflamatória, cicatrizante, anestésica, dentre outras) e quanto à possibilidade de aplicação em indústrias de alimentos (RAMOS e MIRANDA, 2007; BOGDANOV, S., 2012).

A própolis é uma substância resinosa elaborada pelas abelhas a partir de diversas partes de plantas como brotos, cascas e exsudados de árvores que são transformados dentro da colméia com a adição de cera e da enzima 1,3-glicosidase presente na saliva das abelhas, convertendo os flavonóides glicosilados em flavonóides agliconas, através de hidrólise (PARK et al., 1998). É utilizada dentro da colméia para selar frestas e buracos, além de impedir o crescimento microbiano originado pela decomposição de insetos mortos dentro desta (MARCUCCI, 1995).

Seus efeitos terapêuticos têm sido atribuídos justamente aos diversos compostos fenólicos presentes, principalmente aos flavonóides (PARK et al., 1998). Esses efeitos têm sido amplamente estudados em aplicações diretas a animais com o objetivo de estudar a atividade antiprotozoário e antioxidante (GRESSLER et al., 2012; NAKAMURA et al., 2012) e como agente auxiliar de proteção antimicrobiana em alimentos, como no caso de brócolis tratado com filme de quitosana e própolis para aumentar a segurança do brócolis fresco (ALVAREZ et al., 2012). Os compostos fenólicos correspondem a cerca de 50% dos constituintes da própolis, mas esse percentual varia de acordo com a região de coleta do produto, já que a própolis é proveniente das plantas da região (KRELL, 1996; PARK et al., 2002).

A importância da própolis no cenário mundial pode ser evidenciada pela análise dos dados de estudos e patentes publicadas sobre o produto recentemente. Apenas em 2012

mais de 230 trabalhos científicos foram publicados envolvendo a própolis, segundo a base Scopus (SCOPUS, 2012). O interesse no tema é justificado de duas formas: primeiro devido às suas características de panacéia, que podem também atrapalhar o seu consumo, já que muitas pessoas tendem a desconfiar de um produto ao qual se atribuem tantas atividades biológicas simultaneamente; segundo, devido ao seu alto valor agregado (PEREIRA et al., 2002). Um frasco do extrato alcoólico é vendido no Brasil por cerca de 10 reais, mas pode chegar a custar 50 dólares em Tóquio. Os japoneses são os maiores consumidores do produto, importando a própolis brasileira para diversas pesquisas devidos às suas características de qualidade.

Não existem estatísticas confiáveis sobre a produção de própolis mundial, mas sabe-se que os maiores produtores mundiais são a China, Brasil, Estados Unidos, Austrália e Uruguai, e que o processamento mundial de própolis em 2006 foi de aproximadamente 200 toneladas por mês. O maior consumidor mundial é o Japão, seguido da Nova Zelândia, que consome cerca de nove milhões de doses diárias. No Brasil ela é consumida principalmente como suplemento alimentar ou como remédio, geralmente combinada ao mel na elaboração de xaropes (SEBRAE, 2006).

Os principais usos da própolis estão na medicina e nas indústrias de cosméticos, e a principal forma de consumo é o extrato líquido. O extrato alcoólico é o mais comum comercialmente, devido às melhores propriedades de extração desse solvente. No entanto, o álcool possui características que podem restringir a utilização da própolis industrialmente como seu alto sabor residual e restrições ao consumo. Dessa forma, outros solventes têm sido estudados para a substituição do álcool, como o propileno-glicol e a água, no entanto, a baixa solubilidade da própolis em água limita o seu uso como solvente (KONISHI et al., 2004). A mudança de pH no meio de extração representa um fator a ser considerado durante o processamento, pois modifica a solubilidade do solvente, tornando-o eficaz na extração dos compostos.

Dependendo da aplicação, o solvente utilizado deve ser reduzido ou eliminado, geralmente por liofilização, destilação a vácuo ou evaporação (KRELL, 1996). Estes processos de concentração apresentam algumas desvantagens que podem ser o uso de alta

temperatura, que pode degradar alguns flavonóides da própolis e/ou o alto consumo de energia dos processos. A validação de um processo de concentração alternativo que não apresente as mesmas desvantagens é de grande importância para a indústria alimentícia e farmacêutica. Assim, surge o interesse no estudo da tecnologia de membranas para a realização da concentração dos extratos de própolis.

O processo de concentração por membranas vem crescendo ao longo dos anos graças às vantagens de propiciar a concentração de soluções sem a necessidade de altas temperaturas, e possibilitando até a reutilização de solventes (GEANKOPOLIS, 2003). A técnica começou a ser utilizada com a dessalinização de água e com o estudo de novos tipos de membranas, principalmente as membranas compostas; a técnica pode ser estendida ao uso em diversas áreas como clarificação de sucos, remoção de solventes, tratamento de água, entre outros. Alguns estudos têm sido realizados para viabilizar a nanofiltração de extratos de própolis. Tylkowski et al. (2010) estudaram a nanofiltração do extrato etanólico em módulo de bancada, avaliando as principais características do produto e da membrana, atingindo retenção de cerca de 95% dos compostos fenólicos e observaram a sedimentação de compostos de pequenos (menos de 0,3 μm de diâmetro) na superfície da membrana. Mello, Petrus e Hubinger (2010a) estudaram a nanofiltração de extratos etanólicos e aquosos de própolis e obtiveram retenção de até 100% dos flavonóides em meio aquoso e de 90% em meio etanólico, para um fator de concentração de 4,0. TSIBRANSKA, PEEV e TYLKOWSKI (2011) estudaram o fracionamento de compostos da própolis por nanofiltração e obtiveram rejeição de 30 a 94% dos polifenóis de acordo com a membrana utilizada, durante um processo com fluxo constante e sem a ocorrência de incrustação.

A eficiência do processo de nanofiltração é diretamente afetada pela ocorrência de incrustação na membrana e por alguns fatores do processo, como velocidade tangencial, pressão, temperatura, turbulência, tamanho das partículas e características da membrana. Esta técnica pode ser de grande utilidade para aplicação em extratos aquosos de própolis já que a remoção do solvente provoca um aumento na concentração de compostos funcionais e também permite uma expansão do uso do produto nas áreas alimentícia e farmacêutica através do seu uso como ingrediente funcional. Outro ponto positivo da nanofiltração é que

não provoca alteração na qualidade do produto, pois não requer altas temperaturas durante processo. Além disso, o uso de diferentes pHs para a extração da própolis tem se mostrado efetivo em meio aquoso (MELLO, 2008) e, aliado à concentração com membranas, pode tornar o produto viável comercialmente, tornando-se uma alternativa frente ao extrato alcoólico.

Baseando-se no fato de que a própolis é um produto de alto valor no mercado internacional e o Brasil possui um grande potencial para a sua produção, este trabalho visou o aprimoramento de um novo extrato de própolis preparado com água como solvente em pH alcalino, passando por processo de nanofiltração para remoção do solvente e concentração dos compostos bioativos. Para tanto, foram avaliados os efeitos da variação do pH do solvente durante a extração dos compostos fenólicos e flavonóides da própolis em meio aquoso, estabelecendo-se o melhor tempo para a extração destes compostos. Estes extratos, chamados de “extratos iniciais” foram caracterizados quanto à densidade, viscosidade, teor de flavonóides e de compostos fenólicos. Os extratos em diferentes pHs foram submetidos ao processo de concentração por nanofiltração com variação da temperatura e pressão durante o processamento, seguindo um delineamento composto central rotacional 2^3 com 3 repetições no ponto central sendo que o fluxo de permeado, teor de flavonóides e teor de compostos fenólicos totais foram as variáveis dependentes. A partir da seleção das condições ótimas, o processo foi validado verificando-se a composição química, atividade antioxidante e antimicrobiana, distribuição do tamanho de partículas e vida de prateleira. O fluxo de permeado obtido foi comparado com modelos matemáticos obtidos da literatura.

2. Objetivos

Este trabalho teve como objetivo o estudo do processo de extração e concentração dos flavonóides e compostos fenólicos de solução aquosa de própolis utilizando-se membranas de nanofiltração.

Os objetivos específicos do trabalho foram:

- definir o tempo necessário para a realização da extração da própolis em meio aquoso a diferentes pHs;
- avaliar a influência do pH na solução de alimentação durante o processo de nanofiltração, e as variáveis temperatura e pressão do processo, no teor de flavonóides e compostos fenólicos do produto concentrado e no fluxo de permeado;
- determinar as melhores condições de processamento por nanofiltração e validar o processo;
- validar o processo nas melhores condições de trabalho, caracterizando-se as soluções iniciais e finais da nanofiltração em relação ao teor de flavonóides, compostos fenólicos, atividade antimicrobiana e antioxidante dos produtos obtidos no processo de concentração por membranas;
- determinar os principais mecanismos de decaimento do fluxo de permeado no processo através de modelagem matemática;
- avaliar a estabilidade dos extratos com o tempo e temperatura de armazenamento.

3. Revisão Bibliográfica

3.1. *Própolis*

Entende-se por própolis o produto oriundo de substâncias resinosas, gomosas e balsâmicas, colhidas pelas abelhas de brotos, flores e exsudados de plantas, às quais as abelhas acrescentam secreções salivares, cera e pólen para elaboração final do produto. Sua composição é de aproximadamente 55% de resinas vegetais e bálsamos, 30% de cera de abelhas, 8 a 10% de óleos essenciais e 5% de pólen e outros compostos orgânicos (MARCUCCI, 1996). Como é um produto proveniente das plantas, sua composição depende dos tipos de plantas acessíveis às abelhas. A própolis pode apresentar variações em cor, odor, faixa de fusão (60° - 70°C) e composição, de acordo com a região e estação do ano (BRASIL, 2001, KRELL, 1996). A própolis bruta encontra-se no estado sólido, sendo dura a 15°C e maleável a partir dos 30°C (MARCUCCI, 1996; PRÓPOLIS, 2002). A Figura 3.1 mostra a própolis em detalhe e sendo retirada de uma colméia de abelhas, onde foi produzida para fechar a fresta existente.

É usada pelas abelhas dentro da colméia para preencher cavidades e frestas, reparar danos, como regulador térmico (mantendo a temperatura ideal para suas crias), reduzir o tamanho da entrada, desinfecção da colméia e os alvéolos onde é feita a postura dos ovos e cobrir qualquer animal ou inseto morto que seja grande demais para ser carregado para fora, para evitar que sua putrefação contamine a colméia. Estes usos são importantes, pois aproveitam os efeitos anti-bactericidas e anti-fúngicos para proteger a colônia de doenças (KRELL, 1996; PRÓPOLIS, 2002; RAMOS e MIRANDA, 2007).

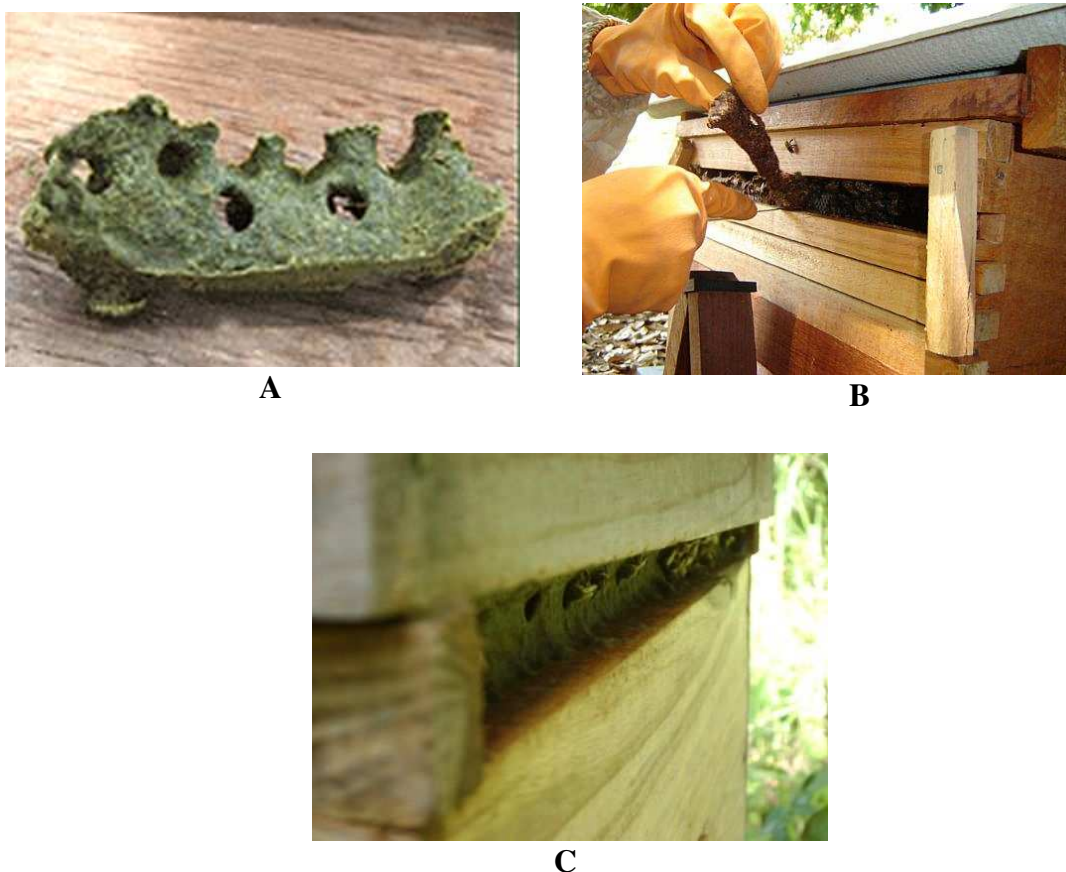


Figura 3.1. A – Detalhe de própolis verde bruta. B e C – Própolis em colméia de abelhas

Desde a antiguidade, a própolis já era utilizada como medicamento popular no tratamento de feridas e infecções. A história da medicina das civilizações chinesa, tibetana, egípcia e também a greco-romana contém, em seus escritos antigos, centenas de receitas onde usavam-se principalmente mel, própolis, larvas de abelhas e às vezes as próprias abelhas, para curar ou prevenir enfermidades. A própolis era usada pelos egípcios como um dos materiais para embalsamar os mortos; os romanos a consideravam um medicamento capaz de reduzir inchaços e dores e os gregos a usavam como cicatrizante. Foram estes últimos que deram o nome ao produto: pro (em defesa de) e polis (cidade), ou seja, em defesa da cidade (ou da colméia) (PEREIRA et al., 2002; MARCUCCI, 1996; BOGDANOV, 2012).

A coloração da própolis é dependente principalmente da região da coleta, podendo variar do marrom escuro passando ao verde até o marrom avermelhado, dependendo do seu tipo e idade. As abelhas transformam as resinas coletadas nas plantas com cera, pólen e a enzima 13-glicosidase presente em suas salivas, acarretando a hidrólise dos flavonóides glicosilados até suas respectivas agliconas para a formação da própolis (PARK et al., 1997). A Figura 3.2 apresenta as própolis verde, marrom e vermelha.



Figura 3.2. Diferentes tipos de própolis brasileira. A: verde; B: marrom; C: vermelha.

Apesar do uso ancestral da própolis, somente nas últimas décadas foram intensificados os estudos de suas propriedades medicinais, sendo que o número de publicações sobre o assunto teve um crescimento quase exponencial, com início nas décadas de 80 e 90, além do grande número de patentes registradas sobre o tema. No entanto, os artigos científicos sobre a própolis ainda são relativamente escassos. A quantidade de patentes registradas sobre o assunto evidencia as regiões com mais interesse na própolis. Até o final da década de 80, as patentes eram dominadas pela antiga URSS e seus países satélites, principalmente a Romênia. No final da década de 90, o Japão já era o país com maior número de patentes referentes ao assunto (98) e o Brasil possuía somente cerca de 3 patentes. No entanto, o país ocupa posição de destaque na produção e comercialização do produto e a produtividade científica no assunto vêm aumentando consideravelmente (PEREIRA et al., 2002).

A estocagem da própolis é um fator muito importante para a manutenção das suas características biológicas. Recomenda-se que o produto “in natura” seja armazenado em temperaturas inferiores a 12°C e ao abrigo da luz. Nessas condições, a diminuição na atividade antimicrobiana é mínima após 12 meses de armazenamento, sendo que os extratos

alcoólicos possuem estabilidade a um tempo ainda maior (KRELL, 1996). Através de pesquisa de produtos disponíveis no mercado, verifica-se que os fabricantes recomendam que o extrato alcoólico de própolis deve ser armazenado ao abrigo da luz direta, umidade e calor, com prazo de validade médio de 2 anos. No entanto, não há relatos na literatura sobre a estabilidade dos extratos de própolis preparados com outros solventes.

3.1.1. Importância Econômica

Atualmente, a própolis é usada, principalmente, pelas indústrias de cosméticos e farmacêutica. Apesar de o Brasil produzir cerca de 15% do total mundial, cerca de 75% da própolis produzida é exportada, sendo o Japão o maior comprador. Segundo dados de 2002, a produção anual de própolis no Brasil era de cerca de 150 toneladas por ano, incluindo o país entre os oito maiores produtores. A produção mundial era de cerca de 10 mil toneladas anuais. A própolis brasileira é considerada uma das melhores do mundo devido às suas características sensoriais e ao menor teor de metais pesados e demais poluentes ambientais (PRODUÇÃO DE MEL, 2002; PORTAL DA CIDADANIA, 2002; ADELMANN, 2005). China, Coréia do Sul, Japão e Espanha foram os maiores compradores da própolis brasileira em 2009. A própolis dos estados de São Paulo e de Minas Gerais são as mais aceitas pelo mercado externo (SEBRAE, 2010). De acordo com Park et al. (2000) a própolis da região Sudeste brasileira apresenta maior atividade antimicrobiana e antiinflamatória. Devido à alta informalidade e segregação do setor apícola nacional, a obtenção de dados estatísticos mais recentes e precisos é bastante difícil. Além disso, as principais análises feitas têm como foco o mel produzido pelas abelhas, que ainda é o principal produto do setor.

No entanto, sabe-se que cada colméia pode produzir anualmente 20 quilos de mel, 1,2 quilo de própolis e 4 quilos de cera (CEPA, 2009; GRUPO COLMÉIAS, 2009, LIMA et al., 2006). Assim, analisando-se o volume de mel produzido, pode-se obter uma estimativa da possibilidade de produção de própolis. A Tabela 3.1 mostra a produção de mel dos principais estados produtores brasileiros. O desenvolvimento de um produto com alto

valor agregado, com grande potencial de utilização e exportação, através da aplicação de um processamento de fácil implantação e de baixo custo pode ser uma boa forma de impulsionar o aproveitamento da própolis pelos estados que já tem notável participação no setor apícola brasileiro, aumentando substancialmente a renda destes produtores.

Tabela 3.1. Produção de mel nos cinco maiores estados produtores nacionais

Estado	Produção (ton)
Rio Grande do Sul	7.155
Paraná	4.831
Ceará	4.734
Santa Catarina	4.514
Piauí	4.278

Fonte: SEBRAE(2011) citando IBGE (2009)

Em 2010, segundo dados da SECEX (Secretaria de Comércio Exterior), disponíveis no relatório do SEBRAE (2012) o valor das exportações da própolis foi da ordem de US\$ 600 mil, sendo que do total comercializado, 84% foi destinado ao Japão e 15% à China que são os dois maiores importadores da própolis brasileira. A liderança na exportação foi de São Paulo e Minas Gerais, sendo que a própolis foi comercializada a um preço médio de US\$ 86,95/kg, sinalizando um aumento no valor mundial da própolis já que, em igual período de 2008, o valor médio da venda para exportação foi próximo de US\$ 67,15/kg.

3.1.2. Atividades Biológicas da Própolis

Vários ensaios biológicos destacam as propriedades da própolis como anti-inflamatória, bactericida, fungicida, antioxidante, hepatoprotetora, cicatrizante, antiúlcera, anti-cárie e anestésica, além de sua toxicidade contra células cancerígenas. O uso da própolis pode aumentar a resistência natural a infecções e diminuir a pressão arterial e nível de colesterol (LOTFY, 2006).

Além de suas propriedades terapêuticas, existe grande interesse na aplicação da própolis nas indústrias farmacêutica e alimentícia, na forma de alimentos funcionais. Além do interesse crescente em alimentos funcionais com origem natural, a própolis ainda atua como preservativo do alimento, graças as suas atividades anti-microbiana e anti-oxidante (GÓMEZ-CARAVACA et al., 2006). A própolis tem sido usada como um remédio popular e está disponível na forma de cápsulas, como um extrato (hidroalcoólico ou glicólico), como enxaguatório bucal, na forma de pó, entre outras e também empregada em cosméticos e na indústria alimentícia na forma de alimentos funcionais (ALENCAR et al., 2007; SFORCIN et al., 2000). Realizando-se uma busca na internet foi constatado a existência de diversos produtos a base de própolis como cápsulas, condicionador, xampu, sabonete, batom, bala, chá, protetor solar, gel pós barba, creme, etc, disponíveis no mercado brasileiro.

Muitas pesquisas foram feitas para se avaliar a atividade antimicrobiana da própolis e verificou-se que as bactérias mais sensíveis a ela foram as dos grupos gram positivos e ácido tolerante (DIAS, PEREIRA e ESTEVINHO, 2012; KACÁNIOVA et al., 2012; SIRIPATRAWAN, VITCHAYAKITTI e SANGUANDEEKUL, 2012). Além disso, o extrato de própolis pode potencializar o efeito de alguns antibióticos, como por exemplo em combinação com a furangina contra *Escherichia coli* (KOO, 1996).

Bonvehí et al. (1993, citado por MOURA, 2000) estudaram os diversos compostos da própolis isoladamente para verificar quais apresentariam atividade bacteriostática, mas concluíram que o seu potencial biológico é potencializado devido ao sinergismo que ocorre entre os seus componentes, como os flavonóides e os compostos fenólicos. Ao estudar a própolis proveniente de várias regiões do Brasil, Silva et al. (2006) concluíram que a presença de flavonóides é um fator importante para a existência de atividade antimicrobiana, mas essa relação sofre interferência da disponibilidade de outros compostos fenólicos no extrato.

Vários estudos foram realizados para se verificar as propriedades anti-oxidantes da própolis de diferentes regiões. Kumazawa et al. (2004) compararam as atividades de própolis de vários países e constataram baixa atividade na própolis brasileira. Contudo,

ressaltam que já foram isolados na própolis brasileira muitos compostos com atividade anti-oxidante. Há uma grande variação na composição em função da região de produção, dessa forma, a própolis brasileira foi classificada em 12 grupos diferentes, de acordo com a região de coleta. Além disso, foi observada grande variação da composição química da própolis entre os grupos, resultando em variação nas suas atividades biológicas. A amostra proveniente do estado de São Paulo apresentou grande quantidade de substâncias solúveis, atividade anti-microbiana para *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus mutans* e atividade anti-inflamatória elevada em relação às amostras de outras regiões (PARK et al., 2002).

Park et al. (1998) estudaram as atividades anti-microbiana e anti-oxidante para extratos de própolis preparados com diferentes proporções de solvente e constataram que essas atividades foram maiores para extratos produzidos através do uso de uma solução hidroalcoólica contendo etanol a 70 ou 80% como solvente do que para extratos preparados com concentrações menores de etanol em água ou o extrato aquoso livre de etanol.

Em outra pesquisa, a própolis preparada utilizando como solvente tanto o etanol quanto o propilenoglicol apresentou boa atividade antifúngica mesmo em grandes diluições, onde a inibição das leveduras estudadas foi proporcional à concentração de própolis utilizada nos testes inibitórios (LONGHINI et al., 2007).

Além dessas propriedades, a própolis em solução aquosa mostrou-se bastante eficaz na redução de tamanho de tumores provocados em ratos, além de diminuir também o número total de células infectadas (ORSOLIC et al., 2005). Testes feitos com Artepelin C, importante composto fenólico isolado da própolis, mostraram-se eficazes na prevenção de tumores por prevenir danos oxidativos provocados pelo tumor, fazendo da própolis um importante composto funcional com atividades anti-carcinogências (KIMOTO et al., 2000).

3.1.3. Composição Química

A composição química da própolis é muito variada e complexa, não podendo ser definida de uma maneira geral, já que está relacionada à vegetação de cada região de

coleta das abelhas. Mais de 200 compostos químicos já foram identificados na própolis, sendo em sua maioria compostos fenólicos. Como principais compostos ativos podem-se citar flavonóides, ácidos aromáticos, terpenóides, aldeídos, álcoois, ácidos alifáticos e ésteres, aminoácidos, esteróides, açúcares, etc. (ADELMANN, 2005). Os constituintes solúveis da própolis utilizando-se solventes orgânicos dividem-se em materiais cerosos (em média 30%), bálsamos, óleos essenciais e derivados fenólicos (em média 60%) (MARCUCCI, 1996).

Os principais grupos químicos encontrados na própolis são os compostos fenólicos, cuja estrutura química é formada pelo anel benzênico com grupos hidroxilas associadas diretamente à estrutura cíclica (Figura 3.3). Na própolis, estas substâncias encontram-se principalmente na forma agliconas, ácidos fenólicos e ésteres fenólicos, os quais são responsáveis pela bioatividade contra vários microorganismos patogênicos (BURDOCK, 1998, BANKOVA, 2005).

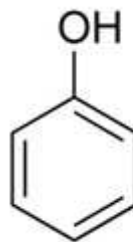


Figura 3.3. Estrutura básica de um fenol.

A presença destes diversos compostos fenólicos, principalmente os flavonóides, são a principal explicação para a grande variedade de propriedades terapêuticas relatadas por diversos pesquisadores, como antioxidante, antimicrobiana, anti-câncer e anti-viral, entre outras. A aplicabilidade da própolis na área médica e farmacêutica aumentou o interesse na sua composição química e na sua origem. Os flavonóides são compostos constituídos por 15 carbonos, distribuídos por dois anéis fenólicos conectados a uma unidade de três carbonos, conforme representado na Figura 3.4 (LOTIFY, 2006; SFORCIN e BANKOVA, 2011). Alguns destes compostos estão ilustrados na Figura 3.4:

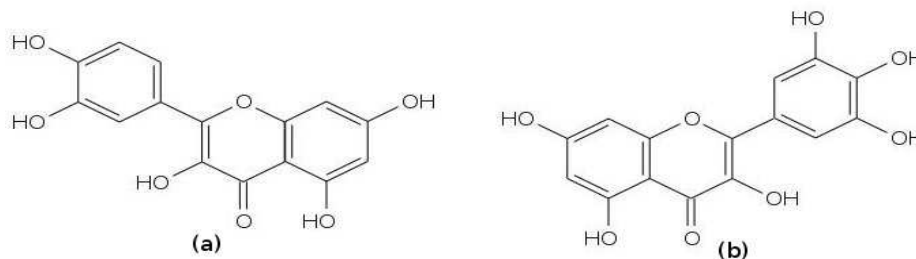


Figura 3.4. Alguns compostos presentes na própolis.
(a) quercetina, (b) miricetina

Como a própolis é um produto natural, extraído de plantas, está sujeito a várias diferenças em relação a sua composição química, causando variação das suas propriedades biológicas e farmacológicas (PEREIRA et al., 2002). Este fator dificulta o uso da própolis em fitoterapia, já que sua composição química varia com a flora da região (brotos, cascas, galhos, exsudados resinosos) e época da colheita; e com a espécie da abelha. Vários trabalhos na literatura focam-se exatamente na variabilidade da própolis de acordo com a região de colheita, relacionando suas propriedades com os componentes encontrados na flora da região (MORENO et al., 2000; MOREIRA et al., 2008; KUMAZAWA et al., 2004; AHN et al., 2007; PARK et al., 2002).

A própolis brasileira é classificada em 12 grupos conforme sua composição físico-química, que é diretamente relacionada com a planta utilizada pelas abelhas, ou seja, com a região de coleta. Na região Sudeste do país, é produzida a própolis de grupo 12, enquanto na região Sul produzem-se as própolis dos grupos 1 ao 5, por exemplo (PARK et al., 2000). A Tabela 3.2 representa os 12 tipos de própolis brasileira e suas principais características. Alguns autores sugerem que a principal fonte vegetal para a própolis brasileira é a *Baccharis spp.* (KUMAZAWA et al., 2003; PARK et al. 1998, BASTOS et al. 2000, NASCIMENTO et al., 2008). Os tipos de compostos aromáticos e terpênicos encontrados na própolis permitem a determinação das espécies vegetais visitadas pelas abelhas (MARCUCCI, 1996).

Tabela 3.2. Produção de mel nos cinco maiores estados produtores nacionais

Adaptado de Park et al. (2010)

Extrato Etanólico de Própolis					
Grupos	Origem da própolis	Cor	Substâncias Solúveis (%)	Zona de Inibição (mm) <i>Staphylococcus aureus</i>	Atividade antiinflamatória % Inibição da Hialuronidase
1	Região Sul	Amarelo	63,0	Negativo	16,1
2	"	Castanho claro	57,5	Traço	11,8
3	"	Castanho escuro	65,0	Traço	37,9
4	"	Castanho claro	54,5	2,0	17,1
5	"	Marrom esverdeado	58,7	1,0	36,4
6	Região Nordeste	Marrom avermelhado	45,9	3,0	40,8
7	"	Marrom esverdeado	43,8	6,0	48,6
8	"	Castanho escuro	41,3	6,0	40,8
9	"	Amarelo	46,7	2,0	10,6
10	"	Amarelo escuro	24,1	Traço	20,1
11	"	Amarelo	23,1	1,0	2,4
12	Região Sudeste	Verde ou Marrom esverdeado	61	3,0	38,3

No Brasil, ocorre a coleta durante todo o ano, promovendo uma maior variação sazonal na sua composição. Nas regiões de clima temperado geralmente ocorre uma menor variação na composição química da própolis. Na Europa, por exemplo, os principais compostos bioativos da própolis são os flavonóides (flavonas, flavonóis e flavanonas). Nestas regiões, as abelhas coletam a própolis apenas no verão (incluindo final da primavera e começo do outono - cerca de quatro meses) e por isso as variações sazonais na

composição da própolis são praticamente insignificantes quando comparadas às variações da própolis brasileira. A principal fonte botânica das zonas temperadas são os brotos de espécies de *Populus* (poplar) e seus híbridos (BANKOVA et al., 1992; BANKOVA et al., 1998; PEREIRA et al., 2002).

Alguns flavonóides comumente encontrados em própolis são o kampferol, a quercetina, a isorramnetina, a miricetina e a galangina que pertencem à classe dos flavonóis; a apigenina, a luteolina, a crisina e a tectocrisina são exemplos de flavonas; a pinocembrina é uma flavanona e a pinobancsina é um diidroflavonol (MARCUCCI et al., 1998).

Outro grupo de compostos encontrados na própolis são os ácidos fenólicos que apresentam um grupo carboxílico ligado a um anel benzênico e a presença de um ou mais grupos hidroxila. Estes ácidos são divididos em ácidos benzóicos, ácidos cinâmicos e seus derivados (SOARES, 2002). Alguns exemplos de compostos fenólicos comuns nos produtos apícolas são o ácido gálico, p-cumárico, caféico, ferúlico e siríngico. Os compostos (a) e (b) da Figura 3.5 são exemplos destes compostos.

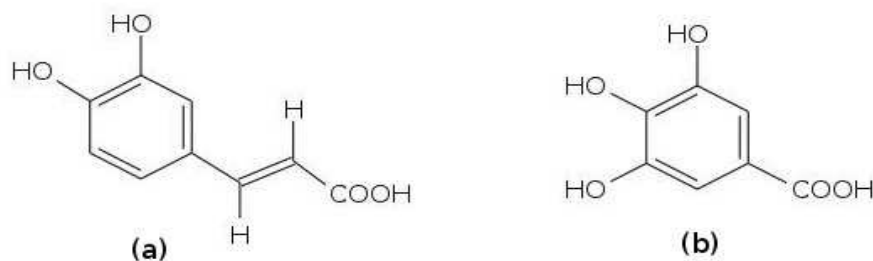


Figura 3.5. Alguns compostos presentes na própolis.
(a) ácido caféico, (b) ácido gálico

De acordo com Longhini et al. (2007), as substâncias presentes na própolis possuem caráter ácido, considerando-se que elas provocam uma diminuição no pH dos solventes usados na extração, como comprovado em testes realizados com etanol e com propilenoglicol. Entretanto, ainda não há estudos que relacionam o aumento da extração de compostos fenólicos e flavonóides em diferentes pHs do meio de extração. O efeito do pH

do solvente durante a extração de flavonóides e polifenóis tem sido estudado por vários autores trabalhando com diferentes espécies vegetais como o chá verde (KIM, et al. 1999), chá preto (LIANG e XU, 2001), *Eleusine coracana* (CHETAN e MALLESHI, 2007) e *Filipendula ulmaria* (HARBOURNE et al. 2009). Nestes casos, verificou-se que a alteração de pH pode ter um impacto positivo ou um efeito negativo, dependendo da interação dos polifenóis com os outros componentes de cada planta. Portanto, uma mudança no pH durante a extração da própolis pode também representar alterações no produto final.

Existem diversas metodologias para quantificação dos flavonóides e compostos fenólicos presentes em extratos vegetais. Os métodos espectrofotométricos são os mais rápidos e baratos mas muitas vezes apresentam valores inferiores aos reais, já que geralmente ocorrem variações de absorção na região de comprimento de onda escolhido, de acordo com a classe do fenol (BURIOL et al., 2009). Assim, costuma-se usar o método de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) para uma análise mais precisa dos compostos, sendo possível a identificação e quantificação dos compostos.

3.1.4. Atividade Antioxidante

O crescente interesse por alimentos naturais tem sua explicação no fato de muitos ingredientes vegetais serem também antioxidantes naturais, ou seja, são produtos capazes de prevenir ou retardar os processos oxidativos. Os antioxidantes naturais na indústria de alimentos são importantes não apenas devido a sua utilidade como método de prevenção da oxidação do produto, mas também devido a seus efeitos benéficos na saúde humana que são fatores importantes na agregação de valor aos produtos alimentícios (GÜLÇİN, 2012).

Muitos autores relatam que o alto conteúdo de flavonóides e polifenóis presentes na própolis são responsáveis por sua característica de agente antioxidante (MORENO et al., 2000; NAGAI et al., 2003; THIRUGNANASAMPANDAN, RAVEENDRAN e JAYAKUMAR, 2012; MAVRI et al., 2012). Essa característica da

própolis é importante, pois os processos oxidativos produzem radicais livres que causam muitos problemas para a saúde humana como câncer, doenças degenerativas do coração e são relatados como causadores de envelhecimento, diabetes, cataratas, rugas, fragilidade óssea, falha nos rins devido à formação de ligações cruzadas no DNA e nas proteínas essenciais (SCHELLER et al., 1994).

Uma das alternativas contra esses processos degenerativos seria evitar radicais livres, no entanto isso é inviável, uma vez que a fonte de radicais livres pode ser muito grande, como raios solares, radiação, pesticidas em alimentos, frituras, etc. A segunda alternativa seria suprir o organismo com antioxidantes que atuam prevenindo os danos causados por radicais livres. Alguns exemplos de compostos com atividade antioxidante são o ácido ascórbico (vitamina C), tocoferol (vitamina E) e β -caroteno (vitamina A).

As propriedades biológicas dos compostos fenólicos estão relacionadas com a atividade que cada fenol exerce sobre determinado meio. Assim, a atividade antioxidante depende da estrutura química dos polifenóis, podendo ser determinada pela ação da molécula como agente redutor através de alguns fatores como a sua reatividade como agente doador de H e elétrons, estabilidade do radical flavanoil formado, reatividade frente a outros antioxidantes e capacidade de quelar metais de transição. Em geral, quanto maior o número de hidroxilas, maior a atividade como agente doador de H e de elétrons. Assim, o comportamento antioxidante dos compostos fenólicos está relacionado com sua capacidade para quelar metais, inibir a ação da enzima lipoxigenase e captar radicais livres. De modo geral, os polifenóis, em particular os flavonoides, possuem estrutura ideal para o sequestro de radicais, sendo antioxidantes mais efetivos que as vitaminas C e E. A dissociação do grupo hidroxila dos polifenóis é um indicador de atividade antioxidante já que o átomo de hidrogênio é doado aos radicais livres, neutralizando o seu efeito (BARREIROS, DAVID e DAVID, 2006; RICE-EVANS et al., 1995; NANTASENAMAT et al., 2008).

A importância dos compostos antioxidantes na prevenção de certas doenças têm levado ao desenvolvimento de um grande número de métodos para a determinação de sua atividade. Estes métodos podem ser baseados na captura do radical peroxila (ORAC, TRAP), do radical hidroxila (método de desoxirribose) e do radical orgânico (ABTS,

DPPH), no poder de redução de um metal (FRAP, CUPRAC), na quantificação de produtos formados durante a peroxidação de lipídeos (oxidação do LDL, co-oxidação do b-caroteno, FTC), entre outros (FRANKEL e MEYER, 2000; SÁNCHEZ-MORENO, 2002).

O método DPPH (atividade sequestrante de radicais DPPH) tem sido bastante utilizado na avaliação da atividade antioxidante em frutas e se baseia na reação de um composto antioxidante com um radical estável, DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil), em solução alcoólica. A solução do radical DPPH apresenta uma cor violeta escuro, que tende a clarear durante a reação com o composto antioxidante, monitorada através da leitura da absorbância da solução a 515 nm (comprimento de onda em que o radical DPPH apresenta absorbância máxima). A vantagem do método DPPH é que o radical livre é estável e está disponível comercialmente (BRAND-WILLIAMS, CUVELIER e BERSET, 1995).

O método FRAP mede a capacidade de redução de um íon férrico. Neste método a substância oxidante é um sal férrico ($\text{Fe(III)(TPTZ)}_2\text{Cl}_3$) de coloração laranja, produzido pela mistura de TPTZ (2,4,6-tripiridyl-s-triazine) com cloreto férrico e tampão acetato. A redução do ferro produz a mudança na cor do oxidante de laranja claro para azul intenso. A intensidade de cor é comparada com aquela produzida por soluções de concentração conhecida de sulfato ferroso (HUANG et al., 2005).

O método do tiocianato férrico (FTC) mede o efeito antioxidante dos extratos sobre a inibição da peroxidação do ácido linoléico. Este método é usado para medir o nível de peróxido formado nos estágios iniciais da oxidação lipídica. Peróxidos são formados durante a oxidação do ácido linoleico reagindo com Fe^{2+} e formando Fe^{3+} . A análise resulta numa solução de coloração avermelhada, que tende a escurecer com a oxidação lipídica, assim, valores baixos de absorbância indicam alta atividade antioxidante. Na presença de antioxidantes, a oxidação será mais lenta e, conseqüentemente, a variação da coloração também será mais lenta (ZIN, ABDUL-HAMID e OSMAN, 2002; EBRAHIMZADEH et al., 2010; GÜLÇİN, 2012).

Banskota et al. (1998) estudaram a própolis de origem brasileira quanto à sua atividade antioxidante e indicaram alguns compostos como por exemplo, os derivados do ácido cafeico, flavonóides, Artepillin C como responsáveis pela sua atividade antioxidante.

Park et al. (1998) determinaram que os extratos etanólicos de própolis preparados com 70 e 80 % de etanol apresentam maior atividade antioxidante em relação aos extratos obtidos com menor concentração de etanol. A atividade foi decrescente conforme diminuiu-se a concentração de álcool como solvente, que também ocasionou menor extração de flavonóides.

3.1.5. Atividade Antimicrobiana

Os flavonóides, um dos maiores grupos de compostos presentes na própolis, são encontrados em todas as partes do reino vegetal, os quais, junto com os ácidos carboxílicos modificados, são responsáveis pela bioatividade da própolis contra vários microorganismos patogênicos (BURDOCK, 1998). No entanto, segundo Bankova et al. (1998) a própolis de origem brasileira possui baixa concentração de flavonóides e ésteres de ácidos fenólicos, mas possui altas concentrações de ácido dihidroxicinâmico, acetofenonas preniladas e alguns terpenóides específicos. O efeito sinérgico dos componentes da própolis brasileira proporciona maior atividade antimicrobiana quando comparada com os compostos isolados (MARCUCCI, 1996; BANKOVA et al., 1998; KONISHI et al, 2004). Além disso, os compostos prenilados são os maiores constituintes da própolis brasileira e trabalhos relatam que a atividade antibacteriana destes compostos pode ser aumentada com o aumento do número de grupos prenil (AGA et al., 1994; MARCUCCI et al., 2001).

Sforcin et al. (2000) estudaram o efeito da estação do ano na atividade antimicrobiana da própolis brasileira e verificaram que cepas de *Staphylococcus aureus* foram susceptíveis à própolis mesmo em baixas concentrações, enquanto as bactérias Gram negativas necessitaram de altas concentrações de extrato alcoólico para serem inibidas. No entanto, não notaram diferenças significativas no efeito bacteriostático da própolis de diferentes estações do ano. Este fato deve ser uma consequência provável do efeito compensador dos diferentes componentes presentes na própolis, ou seja, quando ocorre a diminuição de alguns componentes biologicamente ativos, como os fenólicos, ocorre o

aumento de outros, por exemplo, ácidos diterpênicos. Deste modo pode-se esperar que as atividades biológicas, relacionadas a estes compostos, sejam similares em diferentes estações do ano (BANKOVA et al., 1998). Além disso, ocorre grande variação na composição de acordo com a região de coleta. Orsi et al. (2005) relataram que a própolis brasileira do Nordeste é mais eficaz contra a *Salmonella* que a própolis proveniente do Sul do país.

No caso de extratos alcoólicos de própolis provenientes de outras regiões do mundo, Kalogeropoulos et al. (2009) verificaram que a própolis de origem grega foi mais eficaz que o antibiótico nisina, apresentando atividade inibitória às bactérias gram positivas e fungos, mas não teve efeito em bactérias lácticas, sendo assim indicada para uso como antibiótico natural, especialmente para produtos fermentados. Choi et al. (2006) relataram atividade antimicrobiana da própolis coreana contra *S. aureus*, *B. subtilis*, *S. typhimurium* e *C. albicans* e a atividade foi maior nos extratos com maior concentração de polifenóis totais. Já a própolis de origem portuguesa (SILVA et al., 2012) apresentou atividade contra as bactérias gram positivas, gram negativas e fungos, sendo que as gram negativas foram mais sensíveis ao extrato. Estes trabalhos reforçam o caráter antimicrobiano da própolis, mas deixam evidente que as variações regionais alteram as propriedades biológicas do extrato.

3.2. Processos de concentração por membranas : Nanofiltração

Os processos de filtração por membranas permitem a separação de solutos dissolvidos em correntes líquidas e de misturas gasosas. A maioria destes processos usa o escoamento tangencial (“cross flow”), uma particularidade que os distingue da filtração convencional, onde se promove a separação de partículas sólidas em suspensão de correntes líquidas ou gasosas em escoamento frontal. No escoamento tangencial, a solução ou suspensão escoam paralelamente à superfície da membrana enquanto o permeado é transportado transversalmente a mesma. Neste caso, o escoamento paralelo à membrana

limita o acúmulo do material retido sobre a mesma, tornando possível uma operação do sistema em condições de regime estabelecido de transferência de massa (HABERT et al., 2006), conforme ilustrado na Figura 3.6.

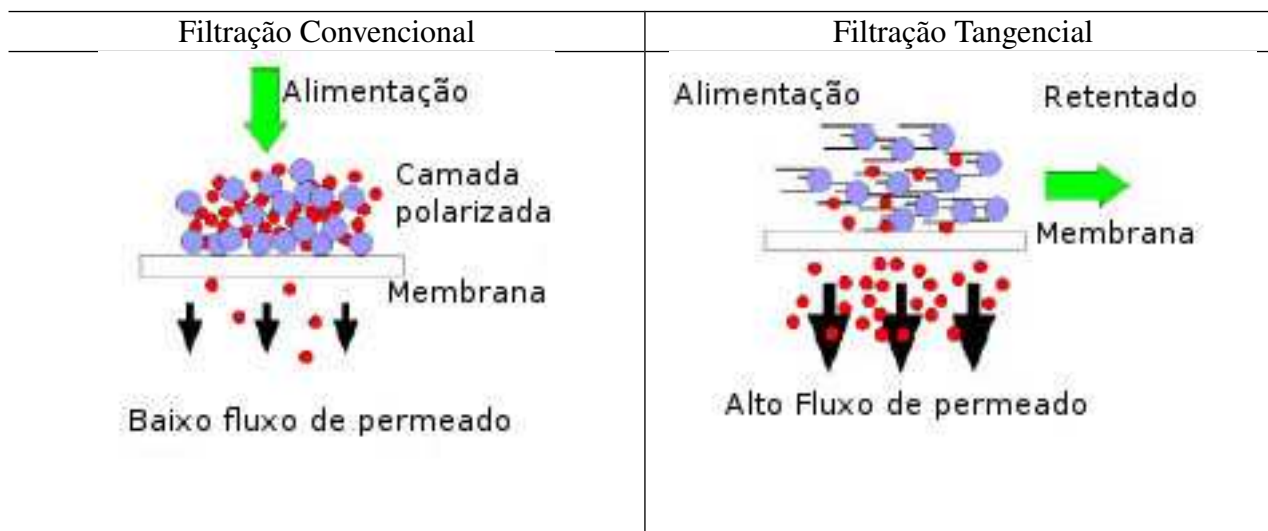


Figura 3.6. Esquema de escoamento durante filtração convencional (perpendicular) e tangencial.

Adaptado de Habert et al., 2006.

A Tabela 3.3 apresenta as características mais importantes dos processos de separação com membranas que utilizam o gradiente de pressão como força motriz, bem como seus mecanismos de ação e alguns exemplos de aplicação. A microfiltração é adequada para separar partículas, como bactérias e glóbulos vermelhos, cujo tamanho varia entre 0,05 a 2,0 μm . Partículas cujos tamanhos variam de 0,00005 a 0,05 μm são removidas com processos de osmose inversa, nanofiltração ou ultrafiltração (HABERT et al, 2006).

Tabela 3.3. Principais características dos processos de separação por membranas

Processo	Força Motriz	Mecanismo de Ação	Material Retido	Aplicações
Microfiltração (MF)	Gradiente de Pressão (0,1 – 1,0 bar)	Exclusão	Material em suspensão (0,1 - 10 μ m)	Clarificação de vinho e cerveja; Esterilização bacteriana
Ultrafiltração (UF)	Gradiente de Pressão (0,5 – 5 bar)	Exclusão	Colóides, macromoléculas MM>5000 g/mol	Concentração de proteínas; Recuperação de pigmentos e óleos
Nanofiltração (NF)	Gradiente de Pressão (1,5 – 40 bar)	Exclusão / difusão	Moléculas de massa molar médio (100<MM<2000 g/mol)	Purificação de proteínas; separação de compostos orgânicos e sais divalentes
Osmose Inversa (OI)	Gradiente de Pressão (20 – 100 bar)	Difusão	Todo material solúvel ou em suspensão	Dessalinização e desmineralização de águas; Concentração de sumos

A nanofiltração é uma operação unitária de separação por membrana que permite uma grande variedade de usos: recuperação dos solventes da filtragem de óleos, separação e reuso de catalisadores na indústria farmacêutica, troca de solventes na indústria química (GEENS et al., 2006), concentração e purificação de extrato etanólico de xantofila que apresenta grande importância para a indústria farmacêutica e alimentícia (TSUI et al., 2007) e concentração de vinhos (BANVOLGYI et al., 2006) e sucos (VINCZE et al., 2006)

na indústria de alimentos. Algumas aplicações típicas de nanofiltração são a separação de sais de soluções e a separação de ácidos de soluções de açúcares, resultando em produtos mais puros e com maiores concentrações (RIJN, 2005). Alguns estudos têm sido realizados para viabilizar a nanofiltração de extratos de própolis (MELLO et al., 2010a; TYLKOWSKI et al., 2010). Normalmente, é caracterizada pelas separações de sais divalentes e solutos orgânicos de massa molar entre 500 e 2000 g/mol, sendo considerado um processo intermediário entre a ultrafiltração e a osmose inversa. Os sistemas de nanofiltração, de modo geral, requerem pressões de operação entre 1,5 e 40 bar, ou seja, muito menores que àquelas solicitadas na osmose inversa. Por esta razão, processos onde se utiliza nanofiltração podem ser considerados economicamente favorecidos, se comparados à osmose inversa (SCHÄFER et al., 2005; HABERT et al., 2006). Este processo oferece, como principais vantagens, a operação em baixas pressões, fluxo elevado, considerável retenção de sais aniônicos multivalentes e moléculas orgânicas, investimento relativamente baixo e baixo custo de operação e manutenção (HILAL et al., 2004).

A osmose é um processo no qual um solvente é transportado através de uma membrana, como resultado de uma diferença na concentração trans-membrana. Se o sistema não sofrer influência externa como uma remoção do excesso de solvente, então a diferença de pressão hidrostática será estabilizada até o ponto em que o transporte de material chegar a zero. Esta condição é conhecida como equilíbrio osmótico e a correspondente diferença de pressão é chamada de pressão osmótica. O equilíbrio osmótico é um equilíbrio hidrodinâmico: o solvente continua passando através da membrana, mas o fluxo é o mesmo em ambas as direções. Se for aplicada uma diferença de pressão trans-membrana maior que a correspondente ao equilíbrio osmótico, o fluxo de solvente pode ser revertido, ou seja, a solução com maior concentração será ainda mais concentrada (RAUTENBACH, 1989). Este processo de concentração ocorre nos processos de filtração por membranas que utilizam a pressão como força motriz. A força motriz que provoca o escoamento através da membrana é a diferença de pressão efetiva entre o lado da retenção e o lado do permeado. A pressão efetiva é a diferença entre a pressão hidrostática (P) e a pressão osmótica (π) (HILAL et al., 2004).

A taxa de solução que passa através da membrana depende das propriedades da membrana, da temperatura da solução, da diferença entre a pressão aplicada e a pressão osmótica na solução concentrada e a diluída. A pressão osmótica é proporcional à concentração da solução e depende das espécies iônicas presentes (AMJAD, 1993, CHERYAN, 1998).

A descoberta de membranas assimétricas e a fabricação de membranas seletivas feitas a partir de uma variedade de materiais são as duas principais razões do sucesso do processo de filtração e concentração por membranas e do aumento da quantidade de processos industriais que puderam ser desenvolvidos com essa tecnologia (RIJN, 2005).

Os parâmetros mais importantes que afetam os custos de investimento e operação em nanofiltração são a taxa de recuperação e a membrana utilizada. A taxa de recuperação expressa a eficiência da membrana em remover sais e outros componentes da solução e afeta diretamente o tamanho, custo e potência dos equipamentos usados no processo (PILIPOVIK e RIVEROL, 2005).

As membranas para um sistema de nanofiltração são feitas para concentrar componentes com massa molar maior que 300 g/mol e são mais seletivas que as membranas de osmose reversa. As primeiras retêm as moléculas dissolvidas e íons polivalentes, mas deixam permear os íons monovalentes. Dessa forma, o processo de nanofiltração requer pressões menores de operação que a osmose reversa, sendo então mais econômico (MAROULIS et al., 2003).

A eficiência do processo de nanofiltração pode ser identificada como sendo uma soma dos efeitos estéricos (convecção e difusão) e eletrostáticos (efeito de cargas) na superfície da membrana. Segundo Hilal et al. (2004), membranas que apresentam menor rejeição a componentes dissolvidos e elevada permeabilidade à água representam uma grande melhora para os processos de separação tecnológicos que utilizam a nanofiltração.

Estudos sobre a morfologia da superfície da membrana podem explicar os processos de separação nessas membranas pelas características da estrutura do poro (diâmetro, densidade e distribuição de tamanho do poro) e determinar suas propriedades filtrantes. A microscopia de força atômica permite a obtenção de imagens topográficas da

superfície da membrana em uma resolução de nível atômico, o que torna a técnica atrativa aos pesquisadores interessados nas propriedades superficiais da membrana nanofiltrante (HILAL et al., 2004).

3.2.1. Fenômenos envolvidos no processo

A curva típica do fluxo de permeação através da membrana pelo tempo pode ser descrita em três estágios diferentes: o primeiro estágio é caracterizado por uma queda brusca do fluxo nos primeiros minutos devido à ocorrência da polarização por concentração na superfície da membrana; no segundo estágio, inicia-se a precipitação dos solutos acumulados, ocasionando o bloqueio dos poros da membrana, a formação da camada polarizada e da incrustação; e o terceiro estágio é definido como a consolidação do processo, ocorrendo uma queda no fluxo lenta, mas contínua (HABERT et al, 2006). A Figura 3.7 apresenta a curva típica de fluxo de permeado.

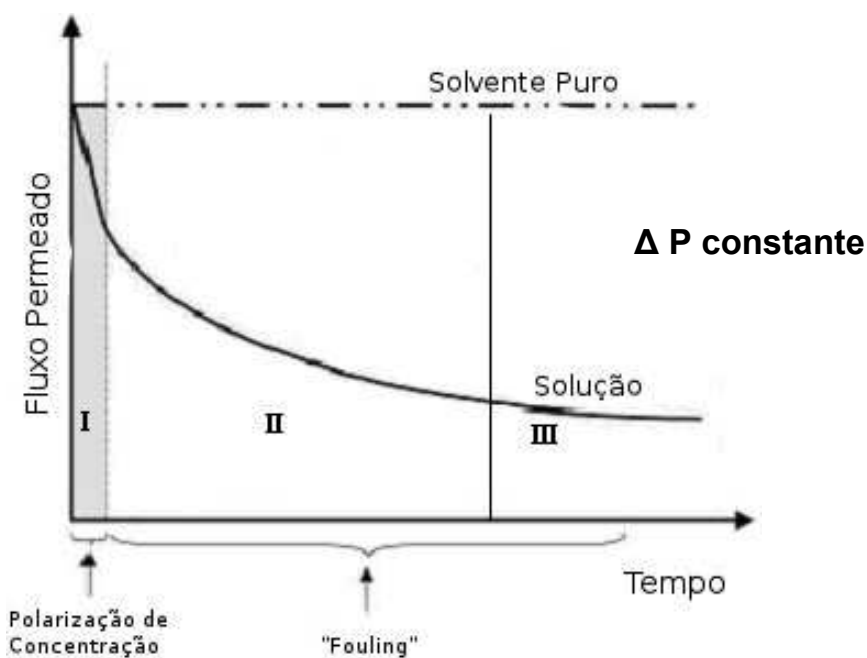


Figura 3.7. Variação esquemática no fluxo permeado com o tempo de operação ocasionada por Polarização de Concentração e Incrustação (Adaptado de HABERT et al (2006)).

Durante a operação dos processamentos com membranas, observa-se um declínio no fluxo de permeado ao longo do tempo devido a uma série de fenômenos que criam condições favoráveis ao entupimento da membrana. Uma vez que a membrana é seletiva, isto é, permite a passagem apenas de alguns solutos, haverá acúmulo dos solutos que são largamente rejeitados pela membrana. Como consequência, forma-se uma camada concentrada na interface da mesma que oferecerá uma resistência adicional à transferência de massa. Este fenômeno conhecido por polarização da concentração resulta na formação de uma camada gel polarizada quando a concentração de partículas junto à membrana torna-se constante. A polarização é mais acentuada nos processos de ultrafiltração e microfiltração, devido aos altos fluxos e baixos coeficientes de transferência de massa como no caso da ultrafiltração de hidrocolóides, macromoléculas e outros solutos de elevada massa molar. As condições do processo, tais como as interações entre os solutos e a membrana, o pH do meio, o tamanho e a morfologia da própria membrana, contribuem para o aparecimento de resistências adicionais devido à formação da camada gel, do entupimento dos poros e da adsorção de solutos na superfície da membrana (PETRUS, 1997, RODRIGUES, 2002, MIRANDA, 2005). O entupimento dos poros (*fouling*), relaciona-se ao tipo de membrana, concentração de solutos presentes na solução, temperatura, pH e tempo de operação. Este entupimento só pode ser eliminado nas operações de limpeza, com substâncias detergentes, soluções alcalinas ou ácidas e agentes oxidantes (PETRUS, 1997, RODRIGUES, 2002).

A formação das zona de polarização e da camada gel podem ser minimizadas através do aumento da velocidade de escoamento tangencial, devido ao aumento da turbulência. O efeito de mistura, nas proximidades da superfície da membrana, arrasta uma parte significativa dos solutos acumulados, na maioria das vezes por adsorção, reduzindo a espessura da camada gel e aumentando a velocidade de permeação. O “fouling” (incrustação) também pode ser controlado através de outros procedimentos como a aplicação de gradientes de pressão reduzidos e através da alteração da composição química das membranas de forma a alterar as interações entre os solutos e a superfície da membrana (PORTER, 1990, CHERYAN, 1998).

3.2.2. Parâmetros Operacionais

Os efeitos da polarização da concentração, formação da camada de gel e do *fouling* devem ser controlados pelo ajuste dos parâmetros operacionais do sistema, visando a viabilidade econômica do processo. As principais variáveis que afetam o fluxo de permeado são a pressão transmembrana, temperatura, concentração da alimentação e velocidade tangencial (CHERYAN, 1998).

O fluxo de permeado tende a diminuir conforme a concentração do retentado aumenta devido ao aumento na sua viscosidade e densidade, provocando uma diminuição na difusividade do soluto. Pelos efeitos provocados também na densidade e na viscosidade do retentado, o aumento da temperatura melhora o fluxo de permeado da membrana, até o limite da estabilidade do fluido e da tolerância da membrana à temperatura. O aumento da pressão atua de forma diretamente proporcional ao fluxo de permeado para soluções que não contém muitos componentes causadores de incrustação, pois maior será a força motriz. Porém, nos casos em que ocorre facilmente a formação da camada polarizada e da incrustação, o aumento na pressão gera maior compactação das partículas sobre a superfície da membrana, diminuindo o fluxo. Assim, utilizando valores mais baixos de pressão, tem-se um fluxo inicial mais baixo, mas que é mantido por um tempo mais longo (PORTER, 1990; CHERYAN 1998),

Alguns dos parâmetros normalmente utilizados na análise de desempenho e eficiência do processamento são o fluxo de permeado, índice de retenção da membrana e o fator de concentração:

Fluxo de Permeado (J) – Representa o volume (litros) de produto permeado que atravessa a área da membrana (m²) em um determinado tempo (horas), de acordo com a equação 3.1:

$$J = \frac{V_p}{t \cdot A_p} \quad (3.1)$$

onde: V_p = volume do permeado (L)

t = tempo (h)

A_p = área da membrana (m^2)

Índice de Retenção – Este índice fornece a capacidade da membrana em reter um determinado componente, sob condições de operação pré-estabelecidas. Dessa forma, permite uma avaliação da seletividade da membrana. É definido pela equação 3.2:

$$R = 1 - \frac{C_p}{C_r} \quad (3.2)$$

onde C_p = concentração do componente no permeado (mg/mL)

C_r = concentração do retentado (mg/mL)

Fator de Concentração – Determina a relação entre a concentração do retentado e da alimentação, e determina a extensão do processo de nanofiltração, conforme equação 3.3:

$$F = \frac{V_a}{V_r} \quad (3.3)$$

onde: V_a = volume da alimentação (L)

V_r = volume do retentado (L)

A definição desses parâmetros possibilita a avaliação do desempenho e comparação com outros processos já estabelecidos, auxiliando na conclusão da viabilidade de uso do processo de concentração por membranas.

3.2.3. Modelos de Transporte

Os processos de separação com membranas necessitam do desenvolvimento de modelos quantitativos, que relacionam as propriedades dos materiais às performances de

separação, para o sucesso do projeto. Dentre os fatores que controlam a performance dos processos de separação que utilizam a diferença de pressão como força motriz, o fluxo de permeado é um dos parâmetros de processo mais estudado e de fácil obtenção. Assim, diversos modelos matemáticos foram propostos para se tentar descrever o fluxo de permeado através da membrana, sendo a maior parte deles semi empíricos, geralmente com uma forma exponencial, considerando a forma das curvas de fluxo (BITTER, 1991; CHERYAN, 1998). O estudo dos principais fatores responsáveis pelo declínio do fluxo de permeado é importante para possibilitar a otimização dos processos de separação por membranas.

3.2.3.1 Modelo das Resistências

Em um processo de concentração por membranas, várias resistências são embutidas no processo, decorrentes dos fatores intrínsecos ao sistema (membrana) e de fatores de processo. As principais resistências são a da membrana (R_m), resistência devido à incrustação (R_f) e resistência devido à polarização da concentração (R_p). A resistência por incrustação costuma englobar dois tipos de resistência, por adsorção (R_a) e bloqueio físico dos poros (R_b). Assim, o escoamento do permeado é inversamente proporcional à resistência total intrínseca ao sistema. A cinética relativamente lenta de alguns dos fenômenos que provocam a incrustação justifica a demora para se atingir um possível estado estacionário no processo (HABERT et al., 2006).

A Figura 3.8 apresenta o esquema de uma membrana porosa, onde as resistências do processo estão ilustradas. SILVA e SHEER (2011) estudaram a microfiltração de soluções aquosas de pectina em membranas cerâmicas e verificaram que as maiores resistências ao fluxo de permeado do processo foram a incrustação e a polarização, sendo que a última foi maior com o aumento da temperatura e da concentração da alimentação. Além disso, relataram que o aumento da pressão também favoreceu esses dois tipos de resistências devido à maior força de passagem pelo poro e à maior

compactação das moléculas depositadas na superfície. USHIKUBO et al. (2007) trabalharam com a microfiltração de suco de umbu e verificaram que a maior resistência da membrana ocorreu devido à incrustação já que os poros grandes facilitam a adsorção de partículas pequenas pela membrana. Em membranas de poros menores, a tendência é que as partículas se depositem sobre a membrana, aumentando a resistência por polarização.

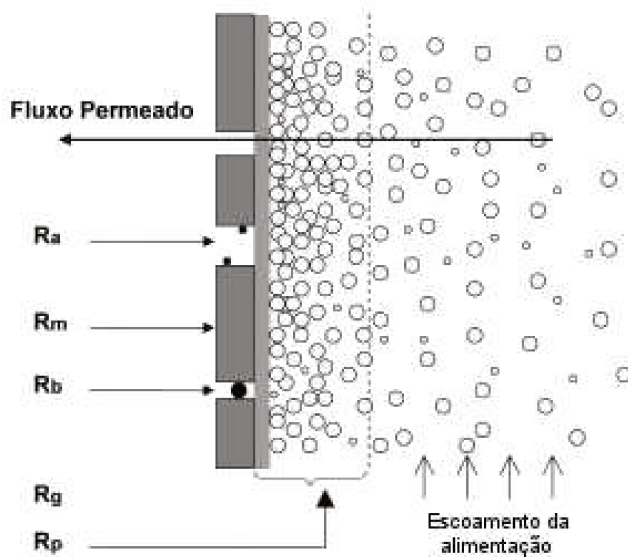


Figura 3.8. Resistências à transferência de massa em membranas porosas.
(Extraído de HABERT et al., 2006)

A relação entre fluxo permeado e a diferença de pressão aplicada entre os dois lados da membrana é expressa pela equação 3.4:

$$J = \frac{\Delta P}{\eta \cdot (R_m + R_a + R_b + R_g + R_{pc})} \quad (3.4)$$

onde:

J = Fluxo do permeado (L/h.m²)

ΔP = gradiente de pressão (Kg/m.s²)

η = viscosidade da solução permeante (Kg/m.s)

R_m = Resistência ao transporte através da membrana (m⁻¹)

R_a = Resistência devido ao fenômeno da adsorção (m⁻¹)

R_f = Resistência devido ao bloqueio físico dos poros (m⁻¹)

R_g = Resistência devido à formação de uma camada gel sobre a membrana (m⁻¹)

R_p = Resistência devido ao fenômeno da polarização de concentração (m⁻¹)

3.2.3.2 Modelos de Hermia

São modelos muito empregados para análise do fluxo de permeado, capazes de descrever o declínio do fluxo permeado durante o processo de filtração tangencial à pressão constante. O primeiro modelo empírico baseado em um processo de separação por membrana considerando-se pressão constante foi desenvolvido por Hermia (1982), conforme descrito pela equação 3.5, e posteriormente modificado por diversos autores afim de adequar-se às diferentes condições de processo.

$$\frac{d^2 J}{dV^2} = k \left(\frac{dt}{dV} \right)^n \quad (3.5)$$

Onde:

J = fluxo de permeado (L/h.m²)

V = Volume de permeado (L)

k = constante do processo

t = tempo de filtração (s)

n = constante que varia de acordo com o modelo de obstrução da membrana,

A partir da equação 3.5, diferentes equações foram formuladas levando em consideração as particularidades de cada processo e o tipo de obstrução ocorrida na membrana, interferindo no fluxo de permeado (FIELD et al., 1995; VELA et al., 2009; DIAZ-REINOSO et al., 2011). Consideraram-se as obstruções por bloqueio completo dos poros, bloqueio parcial dos poros, formação de camada polarizada ou bloqueio interno dos poros. Diaz-Reinoso et al. (2011) avaliaram o processo de ultrafiltração de extratos de folhas de *Castanea sativa* e verificaram através dos modelos matemáticos que a influência da formação da camada polarizada foi maior em membranas com massa molar de corte de 5kDa enquanto para membranas de 10 kDa o bloqueio interno dos poros foi o fator predominante de decaimento do fluxo.

A Figura 3.9 representa os tipos de bloqueio de poro que o soluto pode proporcionar na membrana.

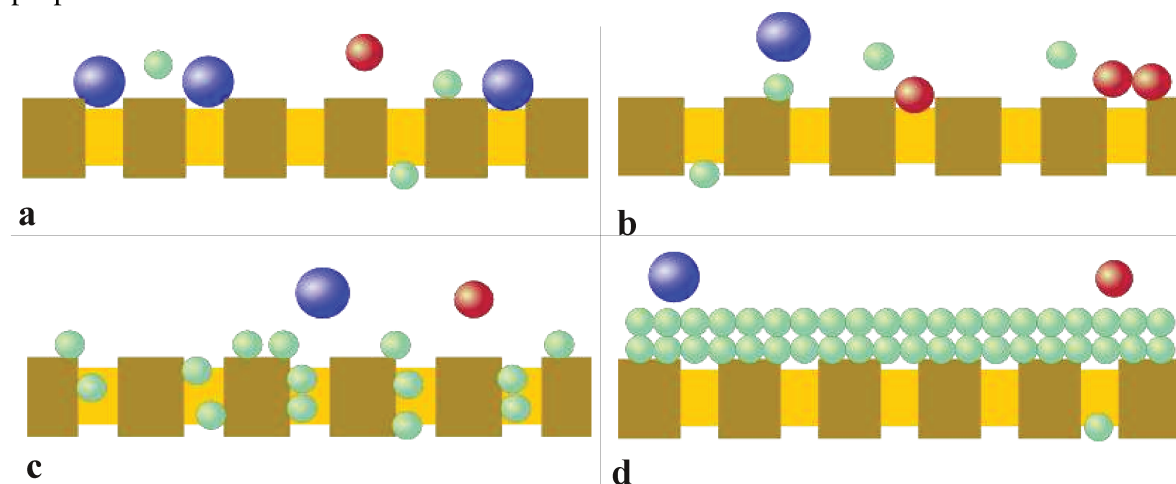


Figura 3.9. Mecanismos de bloqueio das membranas.

(a) bloqueio completo de poro; (b) bloqueio parcial de poro; (c) bloqueio interno de poro; (d) formação de camada polarizada.

Chang et al. (2011) estudaram os mecanismos de incrustação em membranas de nanofiltração no tratamento de água, comparando o modelo das resistências em série e o modelo de Hermia modificado por Vela et al. (2009) para os resultados experimentais. A formação de camada gel polarizada apresentou a maior resistência ao fluxo, enquanto os

mecanismos de bloqueio completo, parcial e também a de camada polarizada apresentaram as maiores correlações (R^2) com os dados experimentais. Jarusutthirak et al. (2007) estudaram os fatores que afetam o fluxo de permeado durante a nanofiltração de matéria orgânica natural e concluíram que o aumento da concentração da solução de alimentação provoca uma mudança nos mecanismos principais de bloqueio, indo de bloqueio total dos poros à formação de camada polarizada conforme o aumento da concentração.

3.2.3.3 . Modelo da renovação de superfície

Este modelo avalia a mudança de comportamento do fluxo ao longo do tempo de operação, desde a formação da camada de polarização até a estabilização desta e a ação hidrodinâmica do escoamento tangencial, obtendo o equilíbrio do processo e, conseqüentemente, o fluxo estacionário. O modelo é descrito pela equação 3.6 na qual J_0 e J_F são, respectivamente, os fluxos inicial e final de permeado, λ é a taxa de declínio do fluxo e t é o tempo.

$$J = J_F + (J_0 - J_F)e^{(-\lambda \cdot t)} \quad (3.6)$$

Esse modelo apresentou um bom ajuste aos dados experimentais de fluxo em ultrafiltração de suco de maçã (CONSTENLA e LOZANO, 1997), abacaxi (BARROS et al., 2004), tamarindo (USHIKUBO; WATANABE; VIOTTO, 2006), caju (BARATO, 2008) e mamão (SILVA, 2010).

3.2.3.4 . Modelo do Filme

A teoria do filme foi um dos modelos iniciais desenvolvidos para membranas porosas (microfiltração, ultrafiltração, nanofiltração e osmose reversa). Este modelo admite que a região de escoamento da solução a ser filtrada pode ser dividida em duas: a região próxima à superfície da membrana de espessura d , constituída por um filme estagnado

(camada polarizada) e outra de escoamento livre, conforme a Figura 3.10 (CONSTENLA e LOZANO, 1997; ALVES, 2006).

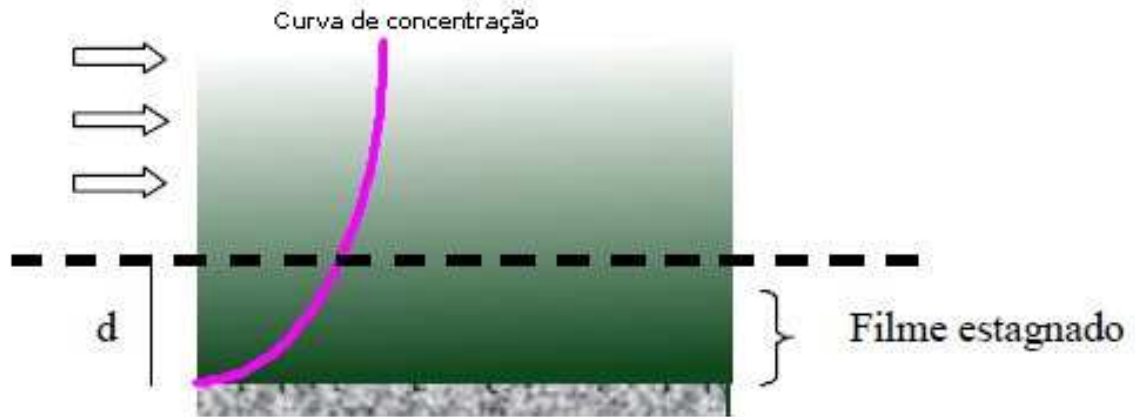


Figura 3.10. Representação do modelo de filme.

Para se chegar ao modelo, é preciso fazer o balanço de massa, nas condições de regime estabelecido de transferência de massa, ao longo da espessura do filme estagnado. Tal condição é alcançada quando o transporte convectivo do soluto para a membrana é igual à soma do fluxo permeado com o fluxo retro difusivo. Integrando-se a equação do balanço de massa, chega-se ao modelo dado pela equação 3.7:

$$J = K \ln \left[\frac{(C_m - C_p)}{(C_0 - C_p)} \right], \quad (3.7)$$

Onde:

J = fluxo permeado;

K = coeficiente de transferência de massa no filme estagnado

C_m = concentração de soluto no interior do filme, na interface membrana solução;

C_0 = concentração de soluto no seio da solução;

C_p = concentração de soluto no permeado

3.3. Concentração de extratos vegetais

O emprego da tecnologia de membranas no processamento de sucos de frutas tem ampla utilização na clarificação e concentração dos sucos. Para essas finalidades, os processos de separação mais empregados são a microfiltração, a ultrafiltração e a osmose inversa.

Atualmente, devido ao grande apelo dos produtos naturais, a tecnologia de membranas têm sido amplamente utilizada para concentração de extratos vegetais devido à grande concentração de compostos com das propriedades funcionais desses produtos. Díaz-Reinoso et al. (2011) estudaram a concentração por membranas de extratos aquosos de *Castanea sativa* e obtiveram 40% de retenção dos compostos (proteínas e fenólicos) originando um concentrado rico com alta capacidade antioxidante. Conidi, Cassano e Drioli (2012) utilizaram nanofiltração para recuperação de compostos fenólicos de liccores produzidos a partir de casca de laranja atingindo 70% de retenção dos flavonóides e 89% das antocianinas. No caso da concentração dos compostos bioativos da polpa de caju (ARAGÃO, 2010) houve retenção de cerca de 100% dos carotenóides e até 54% dos taninos.

Além das frutas, o processo de extração aliado à concentração por membranas tornou viável a produção de extratos a partir de resíduos de outros processos, aproveitando compostos com propriedades funcionais que estavam sendo subaproveitados. Prudêncio et al. (2012) produziu um extrato com alta capacidade antioxidante a partir do extrato do resíduo de colheita de mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) concentrado por nanofiltração a um FC de 4 e 6. Molnár et al. (2011) concentraram por nanofiltração o extrato do resíduo de framboesa, obtendo um produto rico em polifenóis, flavonóides e antocianinas.

No caso dos extratos de própolis, Tylkowski et al. (2011) estudaram a concentração do extrato etanólico em módulo de bancada chegando a uma retenção de aproximadamente 95% dos flavonóides e compostos fenólicos, com ocorrência de baixa sedimentação de partículas na superfície da membrana. Mello (2008) estudou a concentração por ultrafiltração, nanofiltração e osmose reversa dos extratos etanólico e

aquoso da própolis, concluindo que a membrana de nanofiltração (NF90) foi a melhor em concentrar os compostos fenólicos e flavonóides dos extratos. Além disso, quando os extratos foram submetidos ao processamento com a membrana selecionada em equipamento de fluxo tangencial a 20°C e 5,0 bar, foi obtida retenção de até 99% dos flavonóides e 84% dos compostos fenólicos dos extratos, sendo que os melhores resultados foram obtidos para o extrato aquoso. Esta tese visou aprofundar os trabalhos anteriores da literatura, avaliando uma maior faixa de variáveis do processo de nanofiltração do extrato aquoso de própolis aliado à alteração de pH durante a extração, analisando-se os principais fatores responsáveis pela queda de fluxo de permeado durante o processamento, atividade antioxidante e antimicrobiana e a estabilidade em relação ao tempo e temperatura dos produtos obtidos.

4. Material e Métodos

4.1. *Própolis*

Foi utilizada própolis verde bruta da região Sudeste do país adquirida dos Apiários Lambertucci (Rio Claro, SP), proveniente de colméias de abelhas da espécie *Apis mellifera*.

Esta própolis é oriunda da espécie vegetal *B. dracunculifolia* e é a que possui maior valor para o mercado externo, devido à presença dos compostos fenólicos ácido cumárico, ácido ferrúlico, kanferol, apigenina e kanferide, sendo que esse último composto costuma apresentar concentrações muito superiores às própolis das outras regiões do país.

Toda a própolis utilizada neste trabalho foi adquirida de um mesmo lote, para minimizar a influência da variabilidade quanto ao clima e flora utilizada na sua produção. Foi acondicionada sob refrigeração a 4°C até ser posteriormente triturada e homogeneizada para a realização da extração.

4.2. *Preparo dos extratos*

A solução aquosa de própolis foi preparada pela mistura da própolis bruta triturada em liquidificador convencional (Marca Walita, 500 W), homogeneizada e pesada utilizando-se balança semi-analítica (Marte AM 5500, São Paulo, Brasil), com água deionizada na proporção de 15 mL de solvente/g de própolis bruta (MORENO et al., 2000; PARK, ALENCAR e AGUIAR, 2002). A essa mistura inicial foi adicionado NaOH 1 M para modificar o pH do meio de extração para 4,3 (amostra controle – sem alteração de pH), 5,0, 6,0, 7,0 e 8,0 sendo que a medição foi feita utilizando-se pHmetro digital (modelo pH 300 - Analyser Com. e Ind. Ltda., Brasil) a 25°C. A mistura foi mantida em temperatura ambiente, sofrendo agitações periódicas e correção do pH durante todos os dias ao longo do tempo de extração.

A variação do pH em extratos aquosos de própolis é um processo novo, e por isso não foi possível considerar o mesmo tempo de extração usado em processos convencionais (7 dias), uma vez que a adição da base pode alterar o tempo ótimo de extração. Assim, tornou-se necessário conhecer o melhor tempo de extração dos extratos de própolis preparados com alteração de pH. Para tanto, foi feita uma avaliação da influência do tempo na extração dos compostos de interesse da própolis, quando é feita alteração do pH do meio durante o período. Fixou-se um período de 10 dias de preparação, sendo que a cada 24 horas o pH das soluções foi corrigido e foram retiradas alíquotas do extrato, em cada um dos dias de extração, para avaliação da concentração de flavonóides e compostos fenólicos. Em seguida, foi feita uma curva de variação percentual do pH ao longo do tempo para avaliação do consumo da base durante a extração.

Para a escolha do tempo de extração ótimo considerou-se o tempo mínimo em que ocorreu a maior extração dos compostos funcionais de interesse, e avaliou-se a curva de consumo de base ao longo do período de extração para verificar se a alteração na composição do extrato é proporcional ao consumo de base do sistema.

Após o período de extração, o líquido foi centrifugado (centrífuga Beckman-Allegria 25-R) a 8800g por 20 minutos a 20°C. O sobrenadante foi separado e mantido sob refrigeração a 4°C até a sua utilização. O extrato foi analisado segundo os teores de flavonóides, fenólicos totais e atividade antioxidante, de acordo com os itens 4.3.2, 4.3.3 e 4.3.4 respectivamente, para verificação da influência do pH na extração dos compostos da própolis.

Para o cálculo do rendimento de extração, amostras de 5 mL de cada extrato foram transferidas para cápsula de porcelana seca e submetidas à temperatura de 105°C em estufa por 2 horas e levadas à dessecador até o momento da pesagem. A análise foi realizada em triplicata e o rendimento calculado pela razão entre massa do resíduo e a massa inicial de própolis bruta (FUNARI e FERRO, 2006).

Os extratos com diferentes pHs que apresentaram os melhores resultados para extração de flavonóides, compostos fenólicos e para atividade antioxidante foram submetidos ao processo de concentração por nanofiltração.

A faixa de pH foi escolhida com base no trabalho de Mello (2008) que verificou que o pH do extrato aquoso de própolis é fracamente ácido (entre 4,0 e 5,0) e que ocorreu uma maior concentração de flavonóides e compostos fenólicos no produto obtido em meio de extração com pHs mais básicos (entre 6,0 e 8,0).

O extrato alcoólico utilizado como padrão de comparação para os extratos obtidos no processo foi adquirido do Apiários Lambertucci (Limeira, SP). O laudo do fornecedor, com as principais características da própolis adquirida, encontra-se no anexo A.

4.3. Caracterização físico-química dos extratos iniciais

4.3.1. Determinação da viscosidade e densidade das soluções

Para determinação da viscosidade dos extratos iniciais, concentrados e permeados do processo de concentração por membranas, foi utilizado viscosímetro de tubo do tipo Canon Fenske, ilustrado na Figura 4.1, por se tratar do instrumento mais adequado para medir a viscosidade de fluidos newtonianos que operam sob gravidade.

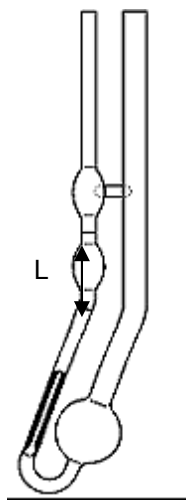


Figura 4.1. Viscosímetro Canon-Fenske.

Para o cálculo da viscosidade utilizou-se a seguinte equação:

$$\frac{\mu}{\rho} = K \cdot t \quad (4.1)$$

Onde

μ = viscosidade do fluido (Pa.s)

ρ = densidade do fluido (kg/m³)

K = constante do viscosímetro (m²/s²)

t = tempo de escoamento (s) através do espaço pré-definido L.

A determinação da densidade das soluções foi feita utilizando-se picnômetro de 25 mL, previamente calibrado com água destilada a 25°C. Foram medidas as massas dos picnômetros vazios e posteriormente, com água destilada. A densidade da água a 25°C foi considerada 997,08 kg/m³ (PERRY e CHILTON, 1980) e o volume foi calculado pela relação $V=m/\rho$, onde m representa a massa de água destilada no picnômetro e ρ sua densidade. Com os dados do volume do picnômetro, foi medida a massa do picnômetro tendo-se seu volume completado com as soluções em estudo e então, foi feito o cálculo da densidade.

4.3.2. Determinação de flavonóides totais

Essa determinação baseia-se na formação de um complexo flavonóide-alumínio, estável, que promove um desvio do espectro de absorção dos flavonóides (efeito batocrômico). Assim é possível a determinação da quantidade de flavonóides, sem a interferência de outras substâncias fenólicas, especialmente os ácidos fenólicos (MARCUCCI et al., 1998, PARK et al., 1998, FUNARI et al., 2006, WOISKY et al., 1996). A quantificação é feita tomando como base uma curva padrão de quercetina hidratada, usada como substância de referência, já que a quercetina é um dos flavonóides comumente encontrados em plantas. A Figura 4.2 exemplifica a reação de formação do complexo flavonóide-alumínio.

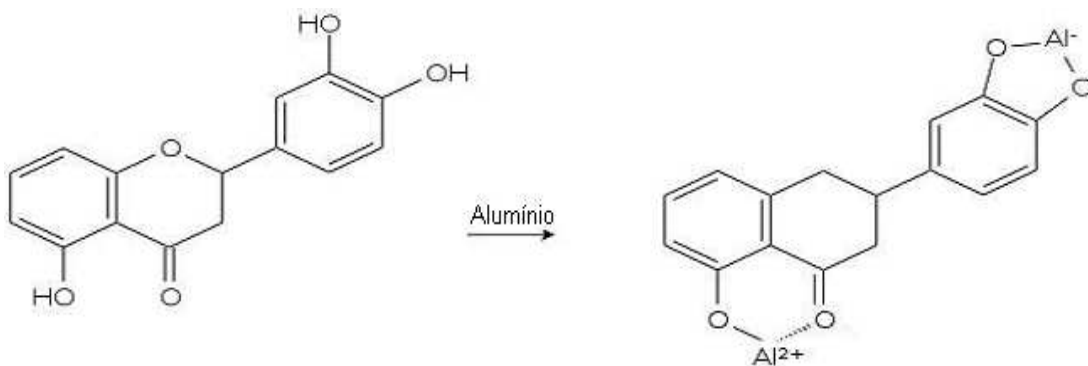


Figura 4.2. Formação do complexo flavonóide-alumínio
(Adaptado de MARCUCCI, 1998)

A metodologia utilizada foi descrita por Park et al. (1995). Em tubos de ensaio contendo 0,5 mL do extrato de própolis previamente diluídos na proporção de 1:10 foram adicionados uma solução de 0,1 mL de nitrato de alumínio 10%, 0,1 mL de acetato de potássio 1mol/L e 4,3 mL de álcool etílico 80%. As amostras foram então homogeneizadas e após 40 minutos foi feita a leitura em espectrofotômetro (modelo SQ-2800 UV/VIS, marca UNICO, United Products & Instruments Inc., Nova Jersey, Estados Unidos) a 415 nm. Para o tubo controle foi utilizado 0,1 mL de água destilada no lugar do nitrato de alumínio. Para o branco foi utilizada uma solução aquosa de nitrato de alumínio. Para a construção da curva padrão utilizou-se solução de quercetina em concentrações de 1 a 100 $\mu\text{g/mL}$ e os valores de flavonóides totais nas amostras foram expressos em equivalentes de quercetina (μg de quercetina/mL de extrato). A curva padrão preparada com quercetina encontra-se no Anexo B.

Apesar do método colorimétrico para a determinação de flavonóides totais, através do nitrato de alumínio, ser rápido e prático, não é um método extremamente preciso, já que o efeito batocrômico da absorção causado pelo complexo com alumínio não é uniforme para todos os flavonóides. Isto porque, a formação de quelatos entre o alumínio e os flavonóides ocorre de forma diferente, dependendo do composto (MARCUCI et al.,

1998, OLDONI, 2007, KOO, 1996). Desta forma, dependendo da composição de flavonóides os resultados podem ser sub ou super estimados.

4.3.3. Determinação de substâncias fenólicas totais

A determinação de polifenóis no extrato de própolis foi feita pelo método colorimétrico de Folin-Ciocalteu (ALENCAR et al., 2007), que se baseia no princípio da reação de redução dos ácidos fosfotúngstico e fosfomolibdico em meio alcalino a óxidos de tungstênio e molibdênio pelos compostos fenólicos, formando um complexo de cor azul, com absorção máxima em 740 nm.

Em tubos de ensaio foram misturados 0,5 mL da solução de própolis diluída em 1:10 com 2,5 mL do reagente de Folin-Ciocalteu (1:10). Após 5 minutos, foi adicionado 2,0 mL de carbonato de sódio (Na_2CO_3) a 4%. As amostras foram homogeneizadas e mantidas em temperatura ambiente, sob o abrigo da luz por 2 horas para posterior leitura em espectrofotômetro (modelo SQ-2800 UV/VIS, marca UNICO, United Products & Instruments Inc., Nova Jersey, Estados Unidos) a 740 nm. Para elaboração da curva padrão, utilizou-se solução de ácido gálico dissolvido em água destilada na concentração de 1 a 100 $\mu\text{g/mL}$. Os valores de compostos fenólicos totais nas amostras foram expressos como equivalentes de ácido gálico ($\mu\text{g/mL}$ de extrato). A curva padrão preparada com ácido gálico encontra-se no Anexo B.

4.3.4. Avaliação da atividade antioxidante

4.3.4.1 Avaliação da atividade sequestrante de radical DPPH

A atividade anti-oxidante das soluções inicial, concentrada e permeada foi analisada utilizando-se a metodologia descrita por Nagai et al. (2003) e Alencar et al.

(2007). A medida da atividade sequestrante de radicais livres dos extratos de própolis foi determinada utilizando-se 1,1-difenil-2-picrilidrazil (DPPH). O DPPH é um radical livre estável que aceita um elétron ou um radical hidrogênio para tornar-se uma molécula diamagnética e desta forma, ser reduzida na presença de um antioxidante. Para a avaliação da atividade sequestrante de radicais livres, os extratos da própolis reagiram com o radical estável de DPPH em uma solução de etanol P.A. Merck (99%). Na forma de radical, o DPPH possui uma absorção característica a 517 nm, a qual desaparece após a redução pelo hidrogênio retirado de um composto antioxidante. Para a análise, adicionou-se 0,3 mL dos extratos de própolis diluídos na proporção de 1:10 em tubos contendo 0,3 mL da solução do radical DPPH (0,5 mmol/L) e 2,4 mL de etanol 99%. Foi feita uma solução de referência na qual a amostra de própolis foi substituída por etanol e um tubo branco, sem a adição de DPPH. A redução do radical de DPPH foi medida através do monitoramento contínuo do declínio da absorbância a 517 nm, ao abrigo da luz, até valores estáveis de absorção. A atividade anti-radical foi determinada em termos de porcentagem de inibição (PI), a qual é calculada através da taxa de declínio da absorção da solução de DPPH com o extrato de própolis, com a absorção da solução controle, de acordo com a equação 4.2.

$$PI (inibição) = \left[\frac{A(0) - A(t)}{A(0)} \right] \cdot 100 \quad (4.2)$$

Onde:

A(0) = Absorbância da solução referência de DPPH-etanol (96%).

A(t) = Absorbância da solução DPPH-Extrato de própolis após o tempo t em minutos.

4.3.4.2. Ensaio FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power)

Os reagentes foram preparados de acordo com o método de Benzie e Strain (1996). O preparo do reagente FRAP foi feito através da mistura de 25mL de tampão

acetato 300mM (pH 3,6) com 2,5mL de solução de TPTZ (2,4,6-tri(2-piridil)-1,3,5-triazina) 10 mM e 2,5mL de 20mM de solução de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (BENZIE e STRAINS, 1996).

Os extratos de própolis foram redissolvidos separadamente em etanol (95%) a proporção de 1:10. Alíquotas (100 μL) de cada extrato diluído foram misturadas com 3mL de reagente FRAP recém preparado. Os valores do FRAP são obtidos mediante a comparação da mudança na absorbância do complexo azul do complexo Fe^{2+} -TPTZ a 593nm em extratos diluídos de própolis contendo concentrações de íons de ferro conhecidos (BENZIE e STRAINS, 1996). Soluções aquosas de diferentes concentrações de sulfato de ferro (100-1000 μM) foram usados para construir a curva padrão e uma solução de Trolox 1000 $\mu\text{g/mL}$ foi utilizada para comparação dos resultados.

4.3.4.3. Método Tiocianato Férrico (FTC)

As análises antioxidantes dos diferentes extratos foram realizadas segundo o sistema do ácido linoléico descrito por Kizukaki e Nakatani (1993). O método monitora a habilidade de espécies antioxidantes de interferir na reação de radicais livres gerados por AAPH [2,2'-azobis (2-amidinopropano) dihidrocloreto].

Para a análise do nível de oxidação foi preparada uma mistura com 1mL de extrato de própolis diluído na proporção de 1:10, 2mL de solução 2,5% (m/v) de ácido linoléico em etanol; 4 mL de solução tampão fosfato de sódio 0,05M (pH=7,0); e 2mL de água destilada para o extrato aquoso, e etanol (99,5 %) para o etanólico.

A oxidação foi iniciada pela adição de 0,417mL de AAPH 0,1M, e então a solução foi mantida a 37°C ao abrigo da luz por 200min.

Após esse período, retirou-se uma alíquota (0,1mL) da solução a qual foi adicionada a 9,7mL de etanol 75% (v/v) e 0,1mL de tiocianato de amônio 30% (m/v). Decorrido 5 minutos, misturou-se também 0,1mL de cloreto ferroso a 0,02M em ácido clorídrico 3,5 % (v/v).

A seguir, mediu-se a absorbância da mistura no primeiro minuto, e após 25, 50, 75 e 100 minutos a 500 nm em espectrofotômetro modelo SQ-2800 UV/VIS (marca UNICO, United Products & Instruments Inc., Nova Jersey, Estados Unidos). A atividade antioxidante pode ser analisada através da comparação das absorbâncias com o tempo de análise, onde valores mais baixos indicam melhor atividade pois ocorre uma melhor proteção do radical AAPH.

4.4. Análise estatística

Os resultados das análises foram submetidos a um teste de diferença de médias (Teste de Duncan), utilizando-se o software Statistica 8.0 (Statsoft, Tulsa, EUA), para um nível de confiança de 95% ($p \leq 0,05$).

Para analisar a correlação existente entre os compostos fenólicos, flavonóides e a atividade antioxidante foi calculado o coeficiente de correlação de Pearson (r), para um nível de confiança de 95% ($p \leq 0,05$), usando teste de t de Student. O diagrama de fluxo exposto na Figura 4.3 detalha as etapas de preparo e avaliação dos extratos iniciais.

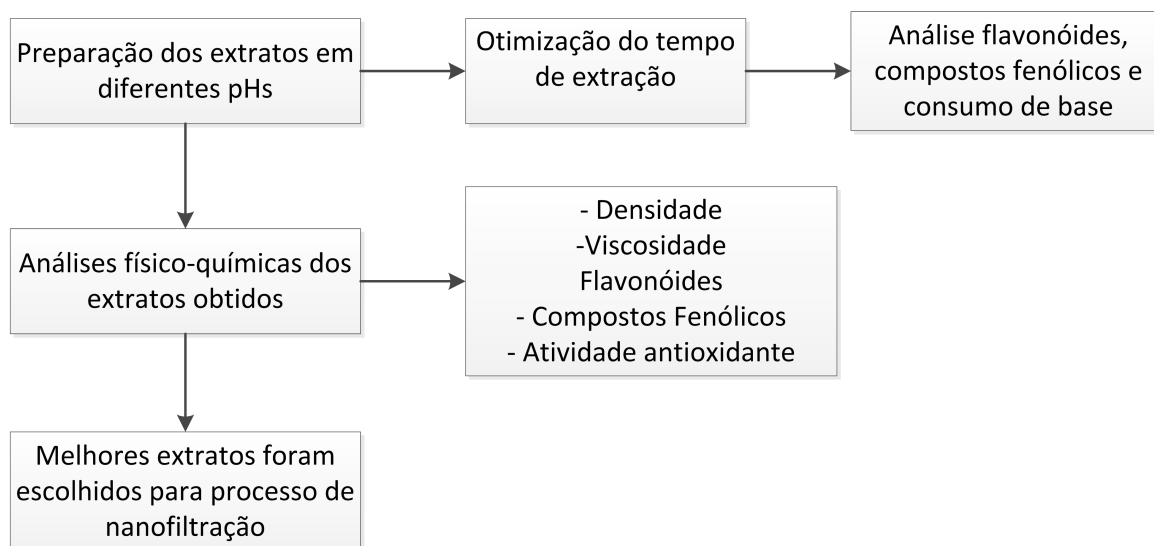


Figura 4.3. Diagrama de fluxo das etapas de preparação e avaliação dos extratos iniciais de própolis

4.5. **Processo de concentração por nanofiltração dos extratos de própolis**

4.5.1. **Membrana e equipamento de filtração**

A membrana utilizada no processo foi a de nanofiltração, já que este tipo de membrana mostrou-se eficaz no processo de concentração da própolis realizado em experimentos anteriores, proporcionando a concentração do extrato, sem a necessidade de pressões tão altas quanto as membranas de osmose reversa (Mello et al., 2010b). As membranas de ultrafiltração, que necessitam de pressões ainda mais baixas, apresentam poros muito grandes, acarretando grande perda de compostos da própolis para o permeado. Os experimentos foram realizados em unidade de filtração tangencial, sob diferentes condições operacionais, seguindo planejamento experimental descrito no item 4.5.2.

Foi utilizado o equipamento modelo EZ2-375-ECN (GE Osmonics, Minnetonka, EUA). A unidade é composta por um tanque de aço inoxidável encamisado com capacidade para 5 litros, uma bomba centrífuga, um manômetro e válvulas nas linhas de permeado e retentado. O esquema de funcionamento, e a foto do equipamento estão apresentados nas Figuras 4.4 e 4.5, respectivamente.

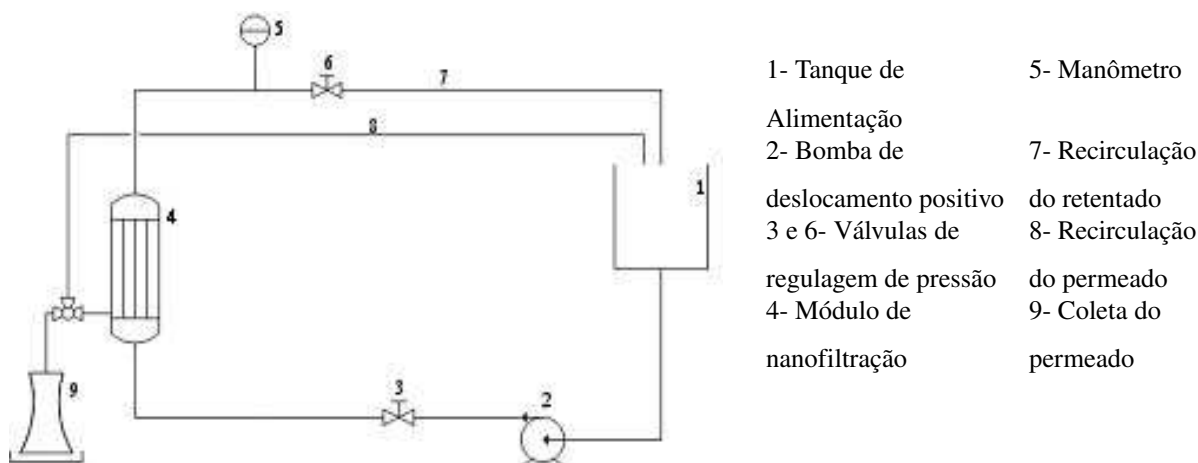


Figura 4.4. Diagrama esquemático da unidade de filtração por membranas

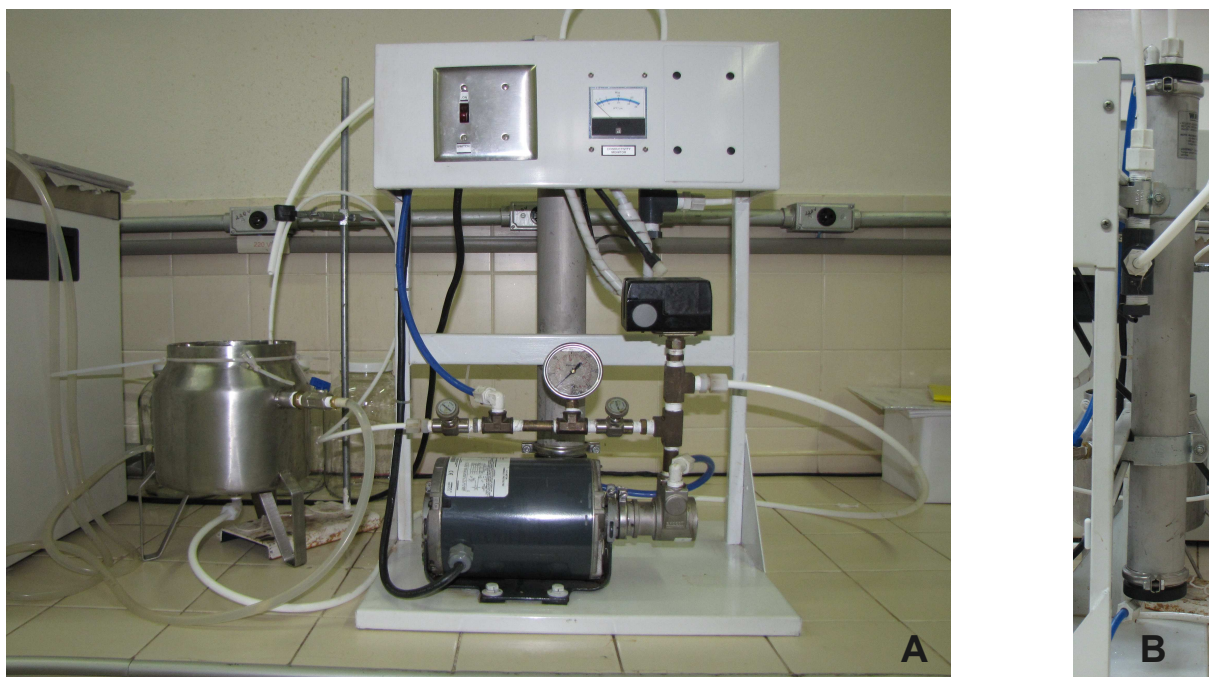


Figura 4.5. Equipamento de filtração tangencial
(A). Detalhe da membrana utilizada (B).

Para a realização do processo de nanofiltração dos extratos de própolis, foi utilizada uma membrana em módulo espiral modelo HL2521TF (GE Osmonics, Minnetonka, EUA) cujas principais características estão descritas na Tabela 4.1:

Tabela 4.1. Principais características e parâmetros de operação da membrana

Modelo	HL-2521TF
Material	Poliamida e Polissulfona
Área	1,2 m ²
Massa molar de corte	150 – 300 g/mol
Pressão máxima de operação	30 bar
Pressão típica de operação	7 bar
Temperatura máxima	50°C

Faixa de pH durante a operação	3,0 – 9,0
Faixa de pH para limpeza	1,0 – 10,0
Fluxo típico de operação	12 – 20 L/(h.m ²)
% de retenção de MgSO ₄ partindo-se de solução padrão de MgSO ₄ 2,0 mg/L com pH 7,5 operando a 7,0 bar, 25°C	98%

O processo de filtração tangencial foi realizado em condições de temperatura variando de 23 a 57°C, pressão variando de 5,3 a 8,7 bar e o pH do extrato usado na alimentação do sistema variou de 4,3 a 7,7. A combinação das condições foi realizada de acordo com planejamento experimental descrito no item 4.5.2, avaliando-se em cada ensaio o teor de flavonóides e compostos fenólicos retidos pela membrana e o fluxo de permeado obtido.

O fluxo de permeado é uma importante medida no processo de filtração por membranas, já que fluxos muito baixos nas condições de processo escolhidas, inviabilizam o método. As soluções de própolis foram colocadas no tanque encamisado e processadas em sistema fechado (tanto o produto permeado quanto o concentrado voltam para o tanque de alimentação) por 60 minutos. Amostras do produto permeado foram colhidas em intervalos de tempo específicos (1, 5, 10, 15, 20, 40, 50 e 60 minutos do início do processo) e o seu volume foi medido para o cálculo do fluxo de permeado, de acordo com a equação 3.1. Cada amostra foi posteriormente analisada segundo teor de flavonóides e compostos fenólicos, para verificar a influência do tempo de processamento no teor de compostos retidos. O tempo de processamento foi estabelecido de acordo com testes prévios do processo de concentração do extrato de própolis (Mello, 2008).

Para a obtenção do produto concentrado final, as soluções foram processadas em sistema aberto (retirada do permeado durante todo o processamento e recirculação da solução concentrada) até que se atingisse um fator de concentração do extrato igual a 4,0. O produto concentrado final e o permeado foram caracterizados de acordo com seu teor de flavonóides e compostos fenólicos. O diagrama de fluxo apresentado na Figura 4.6 mostra

como foi realizado o experimento de filtração tangencial.

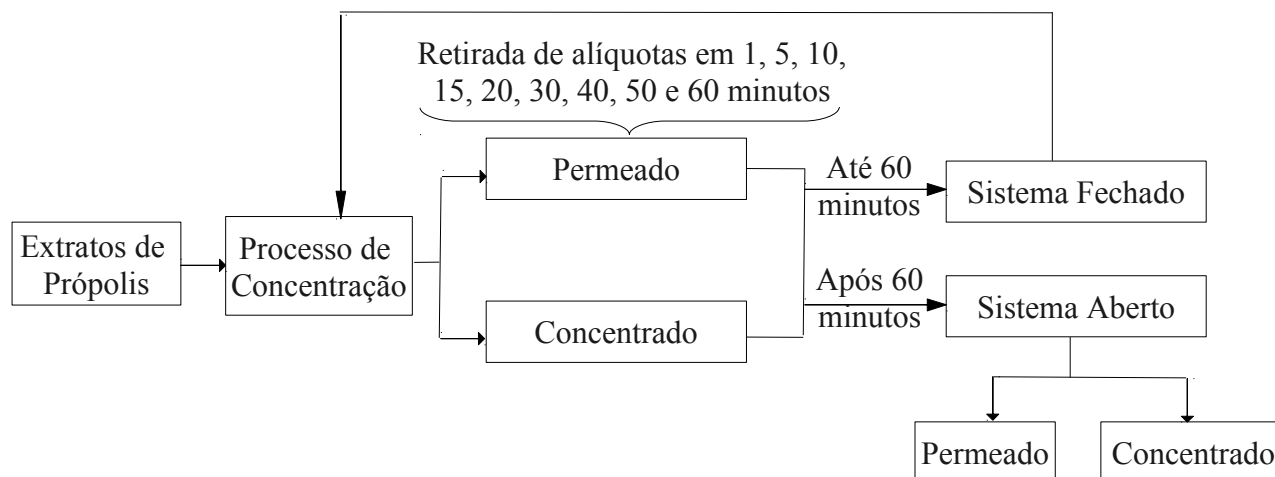


Figura 4.6. Diagrama de Fluxo do processo de filtração tangencial.

4.5.2. Planejamento Experimental

O planejamento experimental foi utilizado para estudar os efeitos das variáveis temperatura, pressão e pH sobre as respostas teor de flavonóides, compostos fenólicos e fluxo de permeado. Foi realizado um planejamento fatorial completo 2^3 , compostos por 8 pontos fatoriais, 6 axiais (níveis $\pm \alpha$) e 3 repetições do ponto central (nível 0), totalizando 17 ensaios, conforme Tabelas 4.2 e 4.3.

Tabela 4.2. Variáveis independentes e valores codificados e reais dos níveis utilizados no planejamento experimental fatorial 2^3 .

Variáveis Independentes	Níveis				
	-1,68	-1	0	+1	+1,68
Temperatura (°C)	23	30	40	50	57
Pressão (bar)	5,3	6,0	7,0	8,0	8,7
pH	4,3	5,0	6,0	7,0	7,7

A otimização do processo de concentração foi realizada através de Metodologia de Superfície de Resposta (RSM), que permite a predição de modelos. Os modelos foram avaliados pela Análise de Variância (ANOVA) e pelo conceito de p-valor ao nível de significância de 10%, através do software Statistica 8.0., de modo a obter os maiores valores de retenção de flavonóides e compostos fenólicos, aliados à otimização do fluxo de permeado do processo. O p-valor foi fixado em 10% devido à variabilidade intrínseca às amostras de origem vegetal.

Tabela 4.3. Ensaios para o planejamento experimental, variando os parâmetros temperatura (T), pressão (P) e pH.

Ensaio	Variáveis Independentes					
	Real			Codificado		
	T (°C)	P (bar)	pH(*)	T (°C)	P (bar)	pH
1	30	6,0	5,0	-1	-1	-1
2	50	6,0	5,0	1	-1	-1
3	30	8,0	5,0	-1	1	-1
4	50	8,0	5,0	1	1	-1
5	30	6,0	7,0	-1	-1	1
6	50	6,0	7,0	1	-1	1
7	30	8,0	7,0	-1	1	1
8	50	8,0	7,0	1	1	1
9	23	7,0	6,0	-1,68	0	0
10	57	7,0	6,0	1,68	0	0
11	40	5,3	6,0	0	-1,68	0
12	40	8,7	6,0	0	1,68	0
13	40	7,0	4,3	0	0	-1,68
14	40	7,0	7,7	0	0	1,68
15	40	7,0	6,0	0	0	0
16	40	7,0	6,0	0	0	0
17	40	7,0	6,0	0	0	0

Após a análise dos resultados do planejamento experimental, e construção dos modelos para as variáveis estudadas, foi realizado um experimento de validação do processo nas condições em que se obteve um produto concentrado com maior teor de flavonóides e compostos fenólicos.

4.5.3. Caracterização dos produtos do processo de concentração

Os concentrados e permeados obtidos após cada ensaio do processo de concentração por nanofiltração foram caracterizados em relação a densidade e viscosidade, seguindo os mesmos procedimentos descritos no item 4.3.1.

A retenção de compostos no produto concentrado e a perda dos mesmos para o permeado do processo foram avaliados por análise espectrofotométrica de flavonóides e compostos fenólicos realizadas com os métodos descritos no item 4.3.2 e 4.3.3 Os valores obtidos foram comparados com a composição dos extratos iniciais para a verificação da qualidade do produto.

4.5.4. Validação do Planejamento Experimental

Foram preparados novos extratos atendendo às condições encontradas na região de otimização do planejamento experimental para realização da validação do delineamento composto central rotacional 2³. Os produtos do processo foram analisados quanto a flavonóides e compostos fenólicos e atividade antioxidante descritas nos itens 4.3.2, 4.3.3 e 4.3.4 respectivamente, além das análises por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), espectrofotometria na região UV, cor, atividade antimicrobiana e distribuição do tamanho das partículas conforme metodologias descritas nos itens 4.5.5 a 4.5.9.

4.5.5. Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)

As análises por HPLC foram realizadas de acordo com o método descrito por Alencar (2002) e Park et al. (2004). Os extratos foram diluídos a 10 µL em 1 mL de metanol e foram injetados em um cromatógrafo líquido (Dionex Ultimate 3000 - Sunnyvale, CA, EUA), constituído de uma bomba quaternária, amostrador automático (Ultimate 3000,

WPS- 3000 TSL), módulo de aquecimento de coluna (Ultimate 3000, TCC- 3000 SD) e um detector de arranjo de fotodiodos (Ultimate 3000, DAD- 3000) a 260 nm e uma coluna de fase reversa C18 (250 x 4,6 mm) com tamanho de partícula de 5µm (Dionex, Acclaim® 120, 5 µm, 120 Å, EUA). A fase móvel utilizada é composta de água/ácido acético (19:1, v/v) (solvente A) e metanol (solvente B), com vazão constante de 1 mL/min. O gradiente inicia-se com 30% do solvente B, passando a 60% em 45 minutos, 75% em 85 minutos, 90% em 95 minutos, voltando a 30% em 105 minutos. A coluna foi mantida a uma temperatura constante de 30°C e os cromatogramas foram processados utilizando o software Cromeleon® 6.8. Foram utilizados os padrões de crisina, ácido caféico, ácido cumárico, ácido ferúlico, campferol, rutina, apigenina, ácido trans-cinâmico, acacetina, quercetina, rutina, ácido gálico (Sigma Chemicals, St. Louis, EUA) e artepilin-C (Wako Pure Chemicals Industries - Osaka, Japan) para comparação das amostras.

Nesta análise foi adicionada uma amostra denominada “extrato basificado” que consiste no extrato aquoso em pH 4,3 no qual foi adicionado base até chegar a pH 7,7 após o processo de extração, ou seja, após a centrifugação do extrato. Esta análise teve como objetivo verificar se a adição da base no extrato pronto provoca um efeito de hidrólise nos compostos bioativos da própolis que poderia ser responsável pelo aumento na quantidade de flavonóides e compostos fenólicos nos extratos alcalinos.

4.5.6. Espectrofotometria na região ultravioleta-visível

A espectrofotometria na região ultravioleta-visível é um dos métodos analíticos mais usados nas determinações analíticas em diversas áreas. É aplicada para determinações de compostos orgânicos e inorgânicos, uma vez que cada família de compostos apresenta um espectro característico dentro de uma faixa específica de comprimento de onda. A absorção da região visível e ultravioleta depende de diversos fatores como o número e arranjo dos elétrons nas moléculas ou íons absorventes. Assim, o pico de absorção pode ser correlacionado com o tipo de ligação que existe na espécie que está sendo estudada

(SILVERSTEIN, 2006).

O espectro de máxima absorção dos extratos aquosos iniciais e concentrados foi determinado conforme descrito por Park et al.(1998), na faixa de 200 a 600 nm utilizando-se espectrofotômetro modelo SQ-2800 UV/VIS, marca UNICO, United Products & Instruments Inc., Nova Jersey, Estados Unidos. Nesta metodologia, alíquotas de 25 ml de cada extrato, foram diluídas em 30 ml de etanol 95% e os seus espectros de absorção na região ultravioleta-visível foram determinados na faixa de comprimento de onda determinado.

4.5.7. Cor

A cor dos produtos obtidos no processo (alimentação, concentrado e permeado) foi analisada por reflectância, através de colorímetro Ultra Scan Vis 1043 (Hunter Lab, Reston, EUA), em escala CIELab (L^* , a^* , b^*), na temperatura de 25 °C, utilizando-se cubeta de vidro com dimensões externas de 12,5mm x 45,0mm, iluminante D65, ângulo de observação de 10° como sistema de referência, padrão de calibração branco (White) e preto (Light trap) do próprio equipamento e as medições foram efetuadas sobre anteparo negro. As medidas foram expressas em termos dos parâmetros: luminosidade L^* ($L^*=0$ preto e $L^*=100$ branco), cromaticidade a^* ($+a^*$ =vermelho e $-a^*$ =verde) e b^* , ($+b^*$ =amarelo e $-b^*$ =azul). Com esses parâmetros, foram avaliadas as coordenadas cilíndricas C^* e H^* , onde C^* define o croma e H^* o tom (ou ângulo Hue), a partir das equações 4.3 e 4.4.

$$C^* = \sqrt{a^{*2} + b^{*2}} \quad (4.3)$$

$$H^* = \arctan\left(\frac{b^*}{a^*}\right) \quad (4.4)$$

O sistema CIELab é baseado na percepção apenas das diferenças de cor observáveis nas coordenadas cilíndricas do sistema. Assim, através do software GIMP© 2.6.11 e dos valores de L*, a* e b* obtidos no colorímetro, foram feitos padrões que representam a coloração composta pela média dos valores lidos na amostra com caráter apenas ilustrativo. O Apêndice D apresenta os padrões de coloração das amostras.

4.5.8. Determinação da atividade antimicrobiana (Antibiograma) para extratos de própolis

A avaliação da atividade antimicrobiana das amostras de própolis foi realizada frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Salmonella choleraesuis* ATCC 10708, *Aspergillus flavus*, *Bacillus cereus* ATCC 14579, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442 e *Candida tropicalis* de acordo com o método descrito por Benson (1975) e Morgan (1990). As análises foram realizadas no LABTERMO – Fundação André Tosello, em Campinas – SP. Cada cultura foi inoculada em toda a superfície de uma placa de ágar nutriente com swabs estéreis. Em seguida, discos de papel impregnados com extratos de própolis foram colocados na superfície do meio de cultura e as placas foram incubadas por uma noite a 37°C. Para a preparação dos discos de papel, amostras de 10 µL de extratos de própolis foram aplicados em discos (5 x 1 mm) de papel Whatman nº 3, e em seguida os discos foram secos a vácuo, à temperatura ambiente, durante toda a noite e depois incubados a 60° C por 4 horas.

Os discos foram colocados sobre placas de ágar nutriente que sofreram prévia inoculação por espalhamento das culturas microbianas selecionadas. As placas foram então inoculadas e incubadas a 37°C por 24 horas e foi feita a medida da atividade antibacteriana pela formação do halo inibitório ao redor dos discos contendo o extrato de própolis.

4.5.9. Determinação do tamanho de partículas

A determinação do tamanho de partícula foi realizada nos produtos do processo de concentração, além do extrato aquoso sem alteração de pH, extrato alcoólico comercial e no “extrato basificado”, utilizando a técnica de espalhamento de luz, através de um Laser Scattering Spectrometer Mastersizer 2000 (Malvern Instruments Ltd, Malvern, Reino Unido). As medidas foram realizadas a 25°C, logo após a homogeneização, utilizando-se água destilada como dispersante para os extratos alcoólicos e etanol 99,5% para o extrato etanólico. Esse método parte do princípio de que o ângulo de difração do laser é inversamente proporcional ao tamanho da partícula por ele incidida, assim, o tamanho de partícula pode ser calculado com base na intensidade de luz recebida pelo detector. Essa técnica é rápida, tem boa reprodutibilidade e permite a re-circulação da amostra em frente ao feixe do laser (RAWLE, 2004). Para o cálculo foi empregada a aproximação de Fraunhofer, que assume que todos os tamanhos de partícula espalham a luz com a mesma eficiência e que as partículas analisadas são opacas, não transmitindo assim a luz incidida (RAWLE, 2004; AZEMA, 2006).

Para esta análise também foi incluída a amostra “extrato basificado”, pois caso ocorresse o processo de hidrólise do extrato, haveria a formação de partículas menores decorrentes desse processo, causando variabilidade em relação ao extrato em pH 4,3.

4.5.10. Modelagem matemática

Foi realizada a modelagem matemática com base nos modelos das resistências (item 3.2.3.1) e de Hermia (item 3.2.3.2), já que levam em consideração os diferentes tipos de mecanismos que influenciam a queda no fluxo de permeado durante o processamento, podendo-se avaliar a influência da incrustação e formação de camada polarizada.

Para o cálculo das resistências do processo, foram utilizados os valores experimentais obtidos durante a validação do processamento. O fluxo de permeado foi

calculado conforme a equação 3.1, obtendo-se o valor da resistência total do processo. Após o processo de concentração, foi feito um enxague do sistema para remoção parcial das partículas depositadas na membrana. Então foi medido o fluxo com água pura (J'_w) da membrana suja, que define a resistência por incrustação e da camada adsorvida nas mesmas condições da corrida, conforme a Equação 4.5.

$$J'_w = \frac{\Delta P}{\eta_w \cdot (R_m + R_f)} \quad (4.5)$$

A resistência da membrana limpa (R_m) foi calculada através do fluxo de permeado com água pura (J_w) nas condições experimentais de cada corrida, segundo a Equação 4.6, onde η_w representa a viscosidade da água pura.

$$J_w = \frac{\Delta P}{\eta_w \cdot (R_m)} \quad (4.6)$$

A resistência gerada pela formação da camada polarizada foi calculada através da diferença entre a resistência total e as resistências calculadas.

Após o conhecimento das resistências predominantes no processo de nanofiltração dos extratos aquosos de própolis, foi utilizada a equação 3.5 para ajustar os pontos experimentais às condições estabelecidas pelo modelo de Hermia (1982). A equação do modelo pode ser ajustada de acordo com os mecanismos principais responsáveis pela queda do fluxo de permeado em processos de concentração por membranas (DÍAZ-REINOSO et al., 2011). Nos itens 4.5.10.1 a 4.5.10.4 a seguir, os mecanismos responsáveis pela alteração no fluxo de permeado estão descritos com detalhes. A curva da equação que permite um melhor ajuste aos dados experimentais representa o fator predominante no decaimento do fluxo de permeado.

4.5.10.1 Modelo do bloqueio completo do poro (n=2)

Neste modelo, considera-se que cada partícula em contato com a membrana participa do seu bloqueio por meio do entupimento dos poros. Neste caso, considera-se $n=2$ para a Equação 3.5 chegando-se na Equação 4.7.

$$J = J_0 e^{-k_t t} \quad (4.7)$$

onde J_0 é o fluxo inicial ($t=0$) do permeado e k_t é a constante do modelo.

4.5.10.2 Modelo do bloqueio parcial de poros (n=1)

Neste caso, nem todas as partículas da solução participam do bloqueio dos poros. Assim, neste modelo, leva-se em consideração a probabilidade de deposição das partículas na superfície da membrana, assumindo-se $n=1$. Com esta suposição, a Equação 3.5 é resolvida para a Equação 4.8.

$$J = J_0 \left(1 + \frac{1}{2} \cdot K_s (A \cdot J_0)^{0,5} \cdot t \right)^{-2} \quad (4.8)$$

onde J_0 é o fluxo inicial ($t=0$) do permeado e k_s é a constante do modelo e A é a área de permeação da membrana.

4.5.10.3 Modelo da camada polarizada (n=0)

No modelo da camada polarizada, leva-se em conta a resistência proporcionada pela própria membrana adicionada da resistência resultante da formação da torta de filtração (camada polarizada). Assim, chega-se na Equação 4.9.

$$J = J_0 \cdot (1 + K_i \cdot A \cdot J_0 \cdot t)^{-1} \quad (4.9)$$

onde J_0 é o fluxo inicial ($t=0$) do permeado e k_i é a constante do modelo e A é a área de permeação da membrana.

4.5.10.4 Modelo de bloqueio interno de poros ($n=3/2$)

Para este modelo assume-se que a adsorção de partículas na parede do poro ocasiona um decréscimo no volume efetivo da membrana, ocasionando um bloqueio interno da membrana, podendo-se chegar ao limite de $J_f = 0$. Resolvendo a equação 3.5 para $n = 3/2$, encontra-se a Equação 4.10.

$$J = J_0 \cdot (1 + 2K_c \cdot (A \cdot J_0)^2 \cdot t)^{\left(\frac{-1}{2}\right)} \quad (4.10)$$

onde J_0 é o fluxo inicial ($t=0$) do permeado e k_c é a constante do modelo e A é a área de permeação da membrana.

4.5.11. Limpeza da Membrana

Após cada etapa do processamento, foi feito um processo de limpeza CIP (Clean in Place) na membrana de nanofiltração, seguindo instruções recomendadas pelo fabricante (GE Osmonics, Minnetonka, EUA) ajustadas ao processo. Após a retirada de todo o produto do tanque de alimentação, a limpeza foi realizada seguindo as seguintes etapas:

1. Lavagem manual do tanque de alimentação, sem circulação de água pela membrana, apenas com a finalidade de remoção do excesso de produto no tanque de alimentação;
2. Lavagem da membrana através da utilização de cerca de 15 litros de água para a remoção da camada polarizada da membrana;
3. Recirculação de 3 litros de água, a temperatura ambiente, através da

membrana utilizando a mesma pressão do processamento anterior, por 5 minutos, para remoção dos compostos aderidos à membrana;

4. Logo em seguida, foi passada através da membrana uma solução de água e NaOH 0,2% a 30°C por 10 minutos, de acordo com a recomendação do fabricante.
5. Novo enxágue do sistema, com água destilada, com descarte do permeado até a neutralização do pH da água, ou seja, até que não haja mais resquícios da solução de limpeza.

Após todo este procedimento, foi medida a permeabilidade hidráulica da membrana. A eficiência da limpeza pode ser comprovada através da restauração do fluxo de permeado inicial, ou seja, antes do processamento dos extratos.

A permeabilidade da membrana à água pura é denominada permeabilidade hidráulica, medida fundamental na caracterização de uma membrana. Entretanto, o comportamento da membrana com a circulação de água pura não tem relação com os resultados obtidos ao se utilizar soluções complexas, com diferentes solutos e macromoléculas presentes. O fluxo de permeado com uma solução real pode chegar a menos que 5% de fluxo com água pura. Apesar disso, a permeabilidade hidráulica representa o inverso da resistência da membrana utilizada e é o parâmetro de referência da integridade e eficiência do processo de limpeza da membrana, garantindo a reprodutibilidade dos resultados (MULDER, 1991).

O valor da permeabilidade da membrana usada no processamento dos extratos de própolis foi determinado através da recirculação de água deionizada no equipamento de filtração tangencial, medindo-se o fluxo de água permeada, em pressões variando de 3,0 a 8,0 bar e temperatura constante (30°C). Em seguida, foi construído um gráfico do fluxo de água permeada em relação à pressão que foi utilizada como referência de comparação para os dados obtidos após os processos de concentração e limpeza da membrana. Estipulou-se que o valor da permeabilidade hidráulica deveria ser recuperado em pelo menos 90% do valor inicial para a garantia da eficiência de concentração da membrana.

Os dados referentes à regeneração da membrana após os procedimentos de limpeza encontram-se no Anexo C.

5. Resultados e Discussão

5.1. Avaliação do tempo de extração em amostras com alteração de pH

A primeira parte do trabalho consistiu na determinação do tempo ótimo de extração da própolis submetida a diferentes pHs. A variação de pH durante a preparação dos extratos aquosos de própolis foi monitorada por 10 dias (240 horas) e então foi medido o percentual de sua variação em relação ao pH inicial (4,3). Os resultados estão expressos na Figura 5.1.

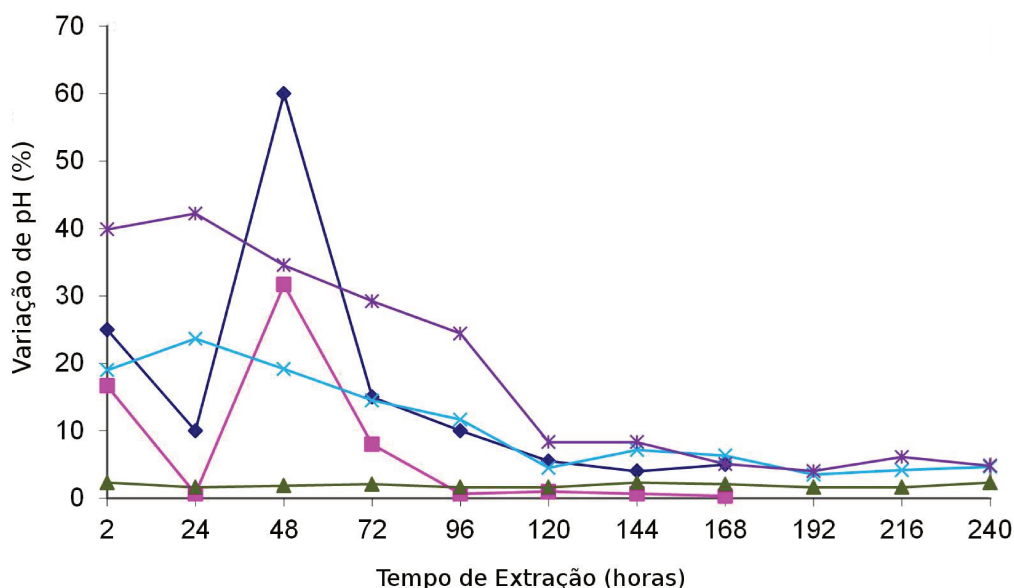


Figura 5.1. Variação percentual do pH dos extratos em função do tempo de extração (—●—) pH 4,3, (—◆—) pH 5,0, (—×—) pH 6,0, (—■—) pH 7,0 e (—*—) pH 8,0

O extrato aquoso preparado sem modificação do meio (pH 4,3), apresentou pH constante ao longo de todos os dias de extração, enquanto nas amostras preparadas com pH básico foi necessária a adição de base durante todos os dias de forma a restabelecer o pH inicial, sendo que a maior variação de pH foi observada após 48 horas de extração para todas as amostras.

Para avaliar o efeito da variação do pH com os compostos extraídos ao longo dos dias, foi feita análise de flavonóides e compostos fenólicos em alíquotas dos extratos retiradas em cada dia da extração. Os resultados estão expressos nas Figuras 5.2 e 5.3 para flavonóides e compostos fenólicos, respectivamente.

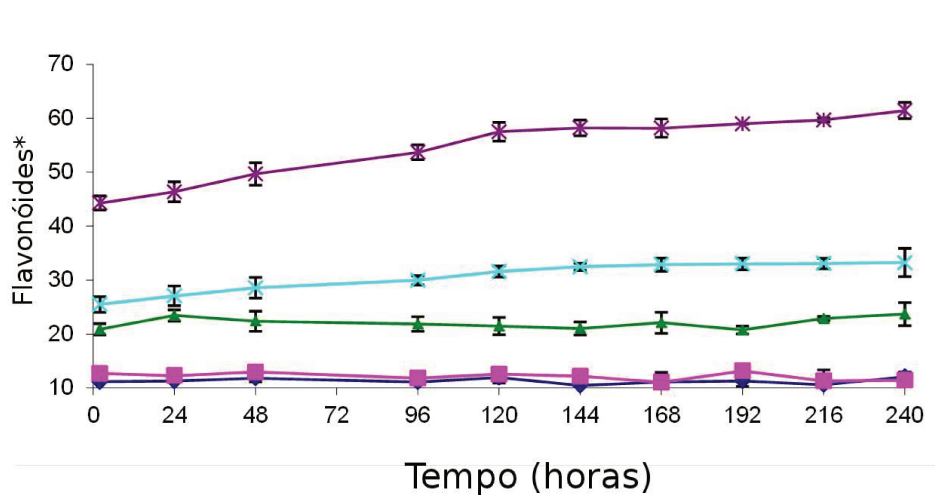


Figura 5.2. Conteúdo de flavonóides (*µg /mL extrato) ao longo do tempo de extração da própolis.

(—▲—) pH 4,3 (—◆—) pH 5,0, (—×—) pH 6,0, (—■—) pH 7,0 e (—*—) pH 8,0

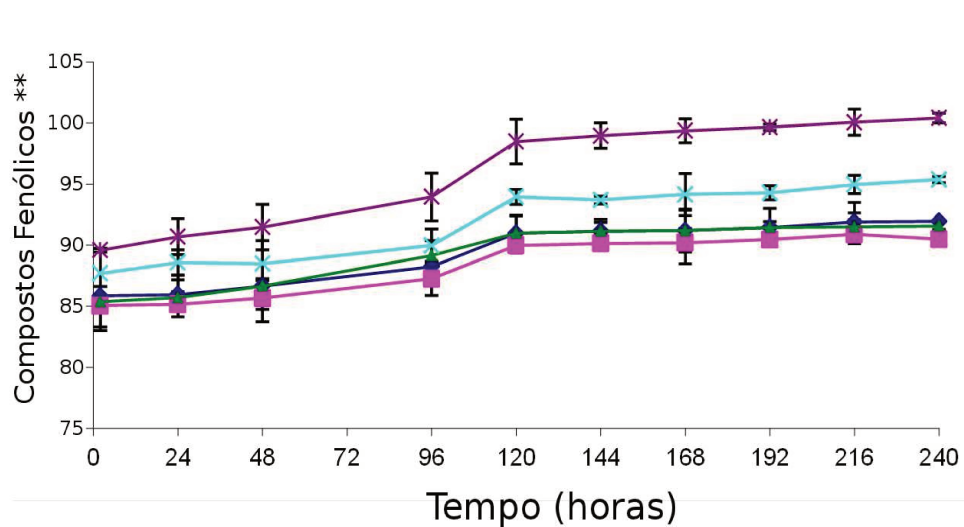


Figura 5.3. Conteúdo de compostos fenólicos (**µg /mL extrato) ao longo do tempo de extração da própolis.

(—▲—) pH 4,3 (—◆—) pH 5,0, (—×—) pH 6,0, (—■—) pH 7,0 e (—*—) pH 8,0

O conteúdo de flavonóides e compostos fenólicos apresentou aumento ao longo do tempo de extração principalmente até 120 horas (5 dias). Após este período, foi observada uma tendência à estabilização na extração destes compostos. Relacionando estes dados com aqueles observados na Figura 5.1, pode-se observar que enquanto os compostos são extraídos da própolis bruta, eles consomem a base presente na solução, causando um decaimento do pH ao longo dos dias. Quando a extração tende ao seu máximo, há menor necessidade de ajuste do pH, ocorrendo estabilização na curva de variação de pH. Esta estabilização aconteceu por volta do quinto dia de extração.

Segundo Krell (1996) a extração da própolis pode ser feita entre 3 a 14 dias, dependendo da concentração de etanol e temperatura do processo. Cvek et al. (2007) estudaram alguns binômios de tempo e concentração de etanol para realizar a extração de própolis e concluíram que o uso de altas temperaturas e tempo prolongado de extração não necessariamente resultam em um aumento da quantidade de compostos extraídos. Eles obtiveram como a melhor combinação de parâmetros, entre as condições estudadas, a extração feita por uma hora, a 25° C, com 80% de etanol como solvente.

Assim, analisando-se os resultados anteriores, fixou-se o período de 5 dias (120 horas), sob agitação manual diária e com correção do pH ao longo dos dias de extração como as condições ótimas para se fazer a extração da própolis em diferentes pHs.

5.2. Caracterização dos extratos iniciais em diferentes pHs

Os extratos preparados com pH 4,3 (extrato sem alteração do pH), 5,0; 6,0; 7,0 e 8,0 foram submetidos às análises de densidade, viscosidade, conteúdo de flavonóides e compostos fenólicos e atividade antioxidante para avaliação do efeito da alteração de pH nessas características dos extratos. Os dados foram analisados estatisticamente por Teste de Duncan, sendo que as amostras que apresentaram diferença estatística entre si estão representadas com letras diferentes em cada coluna.

Tabela 5.1. Densidade e viscosidade dos extratos obtidos em diferentes pHs

	Densidade (kg/m ³)	Viscosidade (kg/m.s)
pH 4,3	1002,3 ± 0,6 (a)	(10,15 ± 0,06)10 ⁻⁴ (a)
pH 5,0	1001,8 ± 0,5 (a)	(10,07 ± 0,02)10 ⁻⁴ (a)
pH 6,0	1000,9 ± 0,4 (a)	(10,07 ± 0,02)10 ⁻⁴ (a)
pH 7,0	1017,5 ± 1,9 (b)	(13,05 ± 0,02)10 ⁻⁴ (b)
pH 8,0	1047,9 ± 1,3 (c)	(28,19 ± 0,11)10 ⁻⁴ (c)
Extrato alcoólico	882,1 ± 0,8 (d)	(22,71 ± 0,01)10 ⁻⁴ (d)

Valores representam média ± desvio padrão (n=3)

Letras diferentes na mesma coluna significam diferença significativa considerando 95% de confiança

A Tabela 5.1 mostra os resultados obtidos para a densidade e a viscosidade dos extratos, onde se pode ver que a densidade e viscosidade dos extratos obtidos em diferentes pHs decrescem ao se aumentar o pH da extração até 6,0, porém sem ocorrer diferença significativa entre as amostras. A partir do pH 7,0 os valores obtidos para densidade e viscosidade começam a aumentar, podendo ser uma evidência da maior extração de compostos fenólicos e flavonóides. Estes compostos possuem maior massa molar que o solvente, ocasionando um aumento na densidade da solução. Além disso, em valores elevados de pH, pode ocorrer também a extração de ceras, como ocorre no extrato alcoólico. No entanto, até o pH 7,0 os valores de viscosidade não são muito elevados a ponto de influir no processamento com membranas. Já para pHs mais alcalinos (pH 8,0), a viscosidade aumenta consideravelmente, cerca de 180% em relação ao extrato sem alteração.

Após esta análise, os extratos foram submetidos à avaliação do teor de flavonóides e compostos fenólicos. Para estas análises foi necessária a construção de curvas-padrão de quercetina e de ácido gálico, representadas no Anexo B.

Os resultados obtidos para teor de flavonóides e compostos fenólicos representados na Tabela 5.2 apresentaram comportamento semelhante aos dados obtidos anteriormente, relacionados à densidade e viscosidade. As amostras com pH acima de 7,0 apresentaram diferença significativa em relação às amostras de pH mais baixo, enquanto as amostras com pH 4,3, 5,0 e 6,0 não apresentaram diferença entre si em relação à extração

dos compostos de interesse. O extrato com pH 8,0 apresentou um aumento de cerca de 40% na concentração de compostos fenólicos enquanto a extração de flavonóides foi ainda maior em pH alcalino, chegando a um aumento de cerca de seis vezes em relação ao extrato padrão, sem alteração de pH.

Tabela 5.2. Teor de flavonóides e compostos fenólicos dos extratos obtidos para extratos aquosos em diferentes pHs

	Rendimento extração (%)	Teor flavonóides *	Teor polifenóis**
pH 4,3	18,42 ± 1,27% (a)	20,93 ± 1,26 (a)	102,37 ± 1,75 (a)
pH 5,0	22,44 ± 1,35% (a)	21,52 ± 0,37 (a)	102,70 ± 0,11 (a)
pH 6,0	24,64 ± 2,01% (a,b)	25,87 ± 0,69 (a)	103,32 ± 2,09 (a)
pH 7,0	29,10 ± 1,07% (b)	60,99 ± 3,98 (b)	120,94 ± 1,46 (b)
pH 8,0	37,29 ± 1,12% (b)	89,14 ± 0,81 (c)	138,45 ± 2,37 (c)
Extrato alcoólico	41,37 ± 1,11% (c)	89,35 ± 0,38 (d)	148,37 ± 0,98 (d)

Valores representam média ± desvio padrão (n=3)

Letras diferentes na mesma coluna significam diferença significativa considerando 95% de confiança

* Expressos em equivalentes de quercetina (µg/mL extrato)

**Expressos em equivalentes de ácido gálico (µg/mL extrato))

Estes resultados mostram que no caso da própolis, um solvente com pH mais alcalino extrai mais flavonóides e compostos fenólicos do que sem variação do pH, possivelmente devido a um aumento da hidrofiliabilidade dos flavonóides após a reação com o grupo hidroxila da base (TANIGUSHI e GUENGERICH, 2012). Harbourne et al. (2009) estudaram o efeito do pH na extração de fenóis totais de ulmária (*Ulmaria filipendula* L.) utilizando água como solvente e verificaram que o aumento do pH de 3,9 a 6,4 possibilitou uma extração de fenóis 33% superior. Por outro lado, Yoshida et al. (1999) estudaram a eficiência da extração do catequinas de chá verde, um composto da família dos polifenóis, e observaram uma diminuição na eficiência de extração quando o pH foi aumentado, atingindo uma extração 30% menor em pH 6,0 e 15% menor em pH 7,6 quando comparada à extração sem alteração do pH. Observa-se a partir da comparação com os dados da literatura que o efeito do pH na extração dos compostos fenólicos em materiais vegetais não

segue uma mesma tendência, ou seja, depende da interação destes compostos com os outros componentes da matéria-prima.

5.2.1. Atividade antioxidante

A atividade antioxidante dos extratos foi testada pelo método FRAP, DPPH e FTC. Os testes também foram realizados para o extrato alcoólico comercial para comparação dos resultados. Os valores de atividade anti-oxidante pelo método FRAP estão listadas na Tabela 5.3.

Tabela 5.3. Atividade antioxidante de extratos de própolis

<i>pH</i>	<i>FRAP*</i>
4,3	180,95 ± 7,41 (a)
5,0	304,76 ± 27,41 (b)
6,0	385,71 ± 22,22 (b)
7,0	504,76 ± 60,63 (c)
8,0	1038,09 ± 51,85 (d)
4,3 alcoólico	2078,57 ± 14,56 (e)
<i>Trolox 1000 µg/mL</i>	2068,78 ± 97,11 (e)

Valores representam média ± desvio padrão (n=3)

Letras diferentes na mesma coluna significam diferença significativa considerando 95% de confiança

* Expressos em equivalentes de sulfato ferroso (µmol/mL extrato)

Os dados obtidos demonstraram que o extrato alcoólico possui a maior atividade antioxidante dentre as amostras analisadas, sendo que não apresentaram diferença estatística em relação ao Trolox na concentração de 1000 µg/mL. Houve um aumento na atividade conforme aumentou-se o pH de extração da própolis, podendo correlacionar-se com o aumento na concentração de compostos funcionais da própolis nestes pHs. O extrato aquoso em pH 8,0 foi o que apresentou o melhor resultado dentre as amostras preparadas

com este solvente, mas ainda apresentou apenas cerca de 50% da atividade obtida para o extrato alcoólico de própolis comercial.

Foi utilizada a metodologia descrita no item 4.3.4.1 para a avaliação do extrato de própolis pelo método do DPPH, no qual a absorbância das amostras foi lida após 40 minutos de reação e comparadas com a absorbância obtida pelo controle no mesmo intervalo de tempo. Para avaliação dos resultados, foi feita a análise utilizando-se também ácido ascórbico, que é um composto de reconhecida atividade antioxidante. Os resultados estão indicados na Figura 5.4.

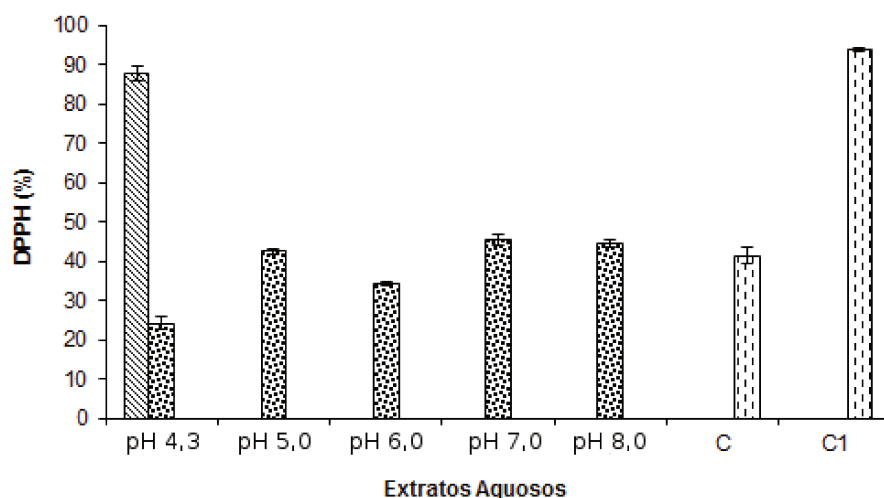


Figura 5.4. Atividade antioxidante de extratos de própolis pelo método DPPH.

(▨) extrato alcoólico, (▤) extrato aquoso e (▩) controle positivo, onde C= ácido ascórbico 0,1 mM e C1= ácido ascórbico 1,0 mM. Média representa média $\pm$ desvio padrão (n=3).

A análise por DPPH mostrou tendência similar ao método FRAP, ou seja, a atividade antioxidante dos extratos aquosos aumentou em conjunto com o aumento de pH das amostras e extrato alcoólico com maior atividade que os extratos aquosos, chegando a ser proporcional ao ácido ascórbico a 1,0 mM. As atividades dos extratos em pH 7,0 e 8,0 foram similares, demonstrando uma variação em relação à metodologia anterior. O

mecanismo de reação é diferente em cada um dos métodos, dessa forma, os compostos presentes na própolis em pH 8,0 mostraram-se mais reativos na reação de redução do íon férrico que na proteção oxidativa do radical DPPH. A atividade antioxidante medida pelo método FTC apresentou comportamento similar àqueles do método FRAP. Para esta análise, foi utilizada a metodologia descrita no item 4.3.4.3. Foi realizada a medição da absorbância das amostras com o tempo de reação, comparando-se com um padrão preparado sem a adição de amostras. A melhor atividade antioxidante ocorre com o menor crescimento da absorbância ao longo do tempo. Os resultados estão expressos na Figura 5.5.

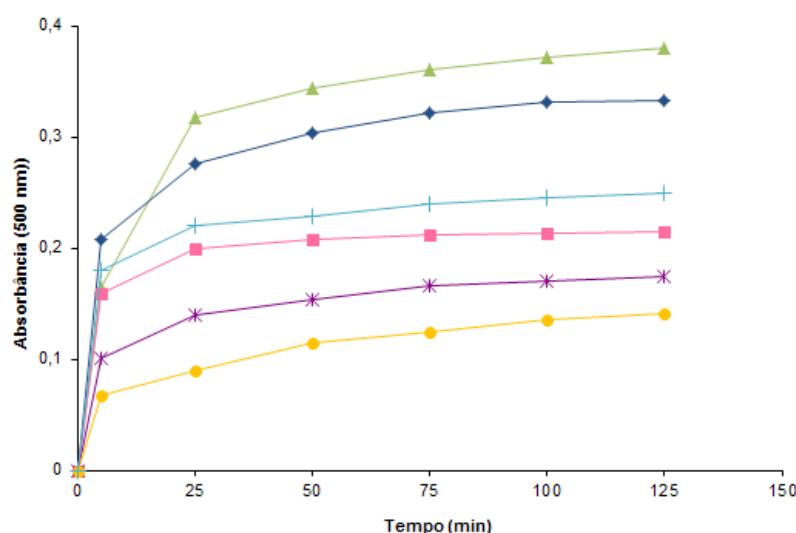


Figura 5.5. Atividade anti-oxidante de extratos de própolis pelo método FTC.
(—▲—) pH 4,3 (—◆—) pH 5,0, (—×—) pH 6,0, (—■—) pH 7,0, (—*—) pH 8,0 e (—●—) extrato alcoólico.

A atividade antioxidante dos extratos de própolis têm sido estudada, utilizando vários métodos diferentes. Mohammadzadeh et al. (2007) testaram o método FRAP no extrato etanólico de própolis iraniana colhida de diferentes regiões do país; todas as amostras apresentaram atividade antioxidante entre 236 e 1649 $\mu\text{mol/mL}$ de extrato de própolis, sendo diretamente proporcional ao conteúdo de polifenóis encontrado nos

extratos. Kalogeropoulos et al. (2009) trabalharam com extratos alcoólicos de própolis provenientes de diversas regiões da Grécia e relacionaram a atividade antioxidante medida através dos métodos DPPH e FRAP com os principais constituintes da própolis, verificando que a atividade por ambos os métodos é diretamente influenciada pelos ácidos fenólicos e flavonóides da própolis como o ácido ferúlico, e as antroquinonas. Nagai et al. (2003) estudaram os extratos aquosos de própolis, sem alteração de pH, testando sua atividade antioxidante através do método por DPPH e concluíram que o efeito da própolis é proporcional à sua concentração na amostra, chegando a uma atividade relativa de 43,5% com amostra preparada utilizando-se 100 mg de própolis para cada 1 mL de água destilada.

Neste trabalho, verificou-se que as amostras aquosas em pH 5,0, 7,0 e 8,0 e o extrato alcoólico apresentaram atividade antioxidante, medida através do método DPPH, entre a atividade equivalente de soluções padrão de ácido ascórbico nas concentrações de 0,1 e 1,0 mmol. O ácido ascórbico é um conhecido antioxidante utilizado em alimentos, que poderia ser substituído por extratos de própolis nas devidas concentrações, levando-se em consideração as diferentes características de cor, sabor residual, densidade, acidez, etc. A atividade antioxidante também se mostrou crescente com o aumento do pH utilizado durante a extração da própolis. Isso pode ser relacionado ao maior teor de flavonóides e compostos fenólicos extraídos quando a base foi adicionada durante a extração.

Com o objetivo de relacionar a atividade antioxidante medida pelos três métodos (DPPH, FRAP e FTC) com o conteúdo de flavonóides e compostos fenólicos dos extratos de própolis, foi realizada análise estatística da correlação de Pearson. Os resultados estão expressos na Tabela 5.4.

Tabela 5.4. Coeficiente de correlação de Pearson para atividade antioxidante, polifenóis e flavonóides em extrato aquoso de própolis

	Flavonóides	Polifenóis	DPPH	FRAP
Polifenóis	0,97 ^{ns}			
DPPH	0,08 ^{ns}	0,24 ^{ns}		
FRAP	0,93 ^{**}	0,97 [*]	0,44 ^{**}	
FTC	-0,75 ^{**}	-0,81 ^{**}	-0,51 ^{**}	-0,86 ^{**}

^{ns}= não significante, ^{*}= significante a $p < 0,05$ e ^{**}= significante a $p < 0,10$.

Correlação feita entre as cinco amostras com diferentes pHs para extrato aquoso.

A correlação de Pearson mostrou que existe uma influência positiva entre polifenóis e flavonóides com a atividade antioxidante. Particularmente, os compostos fenólicos e flavonóides demonstraram uma maior interação com o método FRAP, seguido pelo método do FTC (a correlação negativa entre eles indica que quanto maior o conteúdo de flavonóides, menor o valor de FTC, ou seja, maior a atividade pelo método). Entre os métodos de atividade antioxidante, o FTC e o FRAP apresentaram melhor correlação, demonstrando que predizem o mesmo comportamento de atividade para as amostras. O método do DPPH não demonstrou boa correlação com o teor de flavonóides e compostos fenólicos dos extratos de própolis. Dawidowicz, Wianowska e Olszowy (2012) relataram que o método do radical DPPH é muito sensível às variações do pH do meio e ao conteúdo de água da amostra, podendo ocasionar variações na cinética de reação do radical.

A influência dos polifenóis na atividade antioxidante tem sido relatada por diversos autores. Miguel et al. (2010) obtiveram correlação negativa entre fenóis, flavonas, flavonóis e atividade antioxidante em extratos de própolis portuguesa. Thaipong et al. (2006) obtiveram correlação positiva entre polifenóis e método FRAP em suco de goiaba. Gardner et al. (2000) relataram o mesmo comportamento em sucos de laranja, abacaxi, maçã e grapefruit. Gil et al. (2002) obtiveram alta correlação entre o teor de compostos fenólicos e atividade antioxidante medida pelos métodos DPPH (0,89) e FRAP (0,98) para nectarinas e pêssegos. Os compostos fenólicos são conhecidos por sua característica de

antioxidantes hidrofílicos, assim, a alta concentração destes compostos nos extratos de própolis estudados pode explicar a correlação existente entre eles e a atividade antioxidante obtida pelos diversos métodos. A estrutura de cada composto irá determinar o mecanismo preferencial de reação diante dos diferentes métodos de determinação da atividade antioxidante (THAIPONG et al., 2006).

5.3. Processo de concentração

5.3.1. Seleção das melhores condições operacionais

O delineamento composto central rotacional (DCCR) 2^3 , incluindo 6 pontos axiais e 3 pontos centrais, totalizando 17 ensaios teve como objetivo avaliar os efeitos das variáveis pH do extrato de alimentação, pressão e temperatura de processo sobre o fluxo de permeado e teor de compostos fenólicos e flavonóides no produto concentrado. Os coeficientes de regressão estimados representam quanto cada variável independente influencia em cada resposta estudada, sendo que um coeficiente positivo indica que o aumento no valor da variável resulta em aumento na resposta e um coeficiente negativo indica o oposto, isto é, aumentando o valor da variável, a resposta diminui. O p-valor está relacionado ao nível de significância da variável independente sobre a resposta em estudo. Para os delineamentos compostos centrais rotacionais realizados, o nível de significância foi fixado em 10%. Uma variável independente, cujo p-valor foi menor que 0,10 e cuja análise de variância apresentou $F_{\text{calculado}}$ maior que F_{tabelado} e $R^2 > 75\%$, foi considerada significativa e seu coeficiente de regressão integrou o modelo para predição da variável dependente em estudo. A Tabela 5.5 apresenta os valores das respostas obtidas segundo o delineamento composto central rotacional 2^3 descrito no item 4.5.2

Tabela 5.5. Respostas obtidas para os ensaios do delineamento composto central rotacional 2³, considerando-se os compostos presentes no produto concentrado.

Ensaio	T (°C)	P (bar)	pH	Flavonóides *	Compostos Fenólicos **	Fluxo Estabilizado (L/h.m ²)
1	30 (-1)	6,0 (-1)	5,0 (-1)	23,63 ± 2,27	90,85 ± 2,45	25,80
2	50 (+1)	6,0 (-1)	5,0 (-1)	10,59 ± 1,75	89,27 ± 1,48	49,50
3	30 (-1)	8,0 (+1)	5,0 (-1)	12,69 ± 1,19	92,17 ± 2,16	40,50
4	50 (+1)	8,0 (+1)	5,0 (-1)	7,17 ± 1,47	88,26 ± 1,56	70,50
5	30 (-1)	6,0 (-1)	7,0 (+1)	15,66 ± 1,05	127,59 ± 1,76	24,30
6	50 (+1)	6,0 (-1)	7,0 (+1)	9,54 ± 0,95	78,48 ± 1,42	43,80
7	30 (-1)	8,0 (+1)	7,0 (+1)	9,62 ± 0,92	105,10 ± 2,26	36,00
8	50 (+1)	8,0 (+1)	7,0 (+1)	2,74 ± 0,97	73,55 ± 1,17	61,20
9	23 (-1,68)	7,0 (0)	6,0 (0)	30,17 ± 4,64	89,57 ± 1,42	25,50
10	57 (+1,68)	7,0 (0)	6,0 (0)	4,16 ± 0,95	70,47 ± 0,87	66,60
11	40 (0)	5,3 (-1,68)	6,0 (0)	27,52 ± 2,85	84,85 ± 1,62	36,00
12	40 (0)	8,7 (+1,68)	6,0 (0)	6,69 ± 1,18	85,17 ± 1,26	57,90
13	40 (0)	7,0 (0)	4,3 (-1,68)	21,33 ± 1,96	72,63 ± 0,99	27,30
14	40 (0)	7,0 (0)	7,7 (+1,68)	21,91 ± 1,54	129,47 ± 2,16	32,10
15	40 (0)	7,0 (0)	6,0 (0)	11,43 ± 1,02	83,40 ± 2,24	49,20
16	40 (0)	7,0 (0)	6,0 (0)	15,18 ± 1,37	84,21 ± 3,12	48,90
17	40 (0)	7,0 (0)	6,0 (0)	16,27 ± 1,95	83,36 ± 2,10	51,30

* Expressos em equivalentes de quercetina (µg/mL extrato)

**Expressos em equivalentes de ácido gálico (µg/mL extrato)

Com os dados obtidos nos 17 ensaios do planejamento experimental, pode-se perceber a influência da temperatura e da pressão no fluxo de permeado de extratos de própolis em pH 5,0. Aumentando a temperatura de processamento em 20°C (30-50°C) foi provocado um aumento de 92% no fluxo de permeado quando submetido a pressão de 6,0 bar e aumento de 78% a 8,0 bar. Por esse mesmo tipo de análise, aumentando a pressão em

2 bar (6,0 – 8,0 bar), houve um aumento de 50% no fluxo de permeado a 30°C e 40% a 50°C.

Analisando os dados obtidos nos ensaios 15, 16 e 17, pode-se verificar uma boa reprodutibilidade do processo já que representam os resultados para o ponto central do planejamento (condição de processo: 40°C, 7,0 bar e pH 6,0).

De modo geral houve uma baixa concentração dos compostos de interesse no produto permeado do processo de concentração (para todos os ensaios os valores foram próximos de zero, por isso os mesmos não foram apresentados na tabela), sendo que as maiores concentrações de flavonóides e compostos fenólicos ocorreram nos ensaios em que se utilizou a solução de alimentação com pH 6,0, com exceção do ensaio 10 (57°C, 7,0 bar e pH 6,0). Neste ensaio, percebeu-se uma menor concentração dos compostos funcionais, já que foi utilizada a temperatura de 57°C durante o processo de concentração. Tanto o produto permeado quanto o concentrado tiveram baixa concentração dos compostos. Assim, não houve maior perda para o permeado, mas provavelmente uma degradação destes relacionada à alta temperatura de processamento. Os coeficientes de regressão para a resposta teor de flavonóides são apresentados na Tabela 5.6.

Tabela 5.6. Coeficientes de regressão e significância das variáveis temperatura, pressão e pH sobre a resposta teor de flavonóides no produto concentrado.

Variáveis	Coeficientes de Regressão	Erro Padrão	t(7)	p-valor
Média	14,77	3,69	3,99	<0,01
Temperatura (L)	-11,03	3,47	-3,17	0,01
Temperatura (Q)	-1,27	3,81	-0,33	0,75
Pressão (L)	-9,11	3,47	-2,62	0,03
Pressão (Q)	-1,31	3,81	-0,34	0,74
pH (L)	-2,27	3,47	-0,65	0,53
pH(Q)	1,87	3,81	0,49	0,63
Temperatura (L) x Pressão (L)	1,69	4,53	0,37	0,72
Temperatura (L) x pH (L)	1,39	4,53	0,30	0,76
Pressão (L) x pH (L)	0,38	4,53	0,08	0,93

Variáveis em negrito = significativo para $p < 0,05$

Observou-se que o parâmetro temperatura linear e pressão linear foram estatisticamente significativos sobre o teor de flavonóides ($p < 0,05$) presentes no extrato de própolis concentrado. Verificou-se que o aumento da temperatura e da pressão resultaram em extratos com menores concentrações de flavonóides dentre as condições estudadas. O aumento da temperatura pode degradar os compostos funcionais do extrato, enquanto o aumento da pressão pode aumentar a retenção dos compostos na superfície da membrana que não seriam detectados nos produtos do processo ou aumentar a perda desses compostos para o permeado.

Foi realizada a análise de variância ANOVA ($p < 0,05$), levando em conta apenas os parâmetros estatisticamente significativos para o teor de flavonóides, apresentada na Tabela 5.7. Os demais parâmetros foram eliminados do modelo e adicionados aos resíduos (falta de ajuste). Porém, não foi possível descrever os resultados através de superfície de resposta devido à falta de um modelo adequado, pois o coeficiente de determinação R^2 foi inferior a 75%.

Tabela 5.7. Análise de variância para a resposta teor de flavonóides no produto concentrado.

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	$F_{\text{calculado}}$	F_{tabelado}
Regressão	698,8	2	349,40	14,28	3,26
Resíduos	342,46	14	24,46		
Falta de Ajuste	329,6	12	27,46	4,26	19,4
Erro Puro	12,9	2	6,44		
Total	1041,3	16	65,08		

$$R^2 = 67\%$$

No caso do teor de compostos fenólicos presentes no extrato concentrado, verificou-se que as variáveis temperatura linear, pH linear e a interação entre temperatura e pH foram estatisticamente significativos ($p < 0,10$) a essa resposta, conforme os resultados expressos na Tabela 5.8.

Tabela 5.8. Coeficientes de regressão e significância das variáveis temperatura, pressão e pH sobre a resposta teor de compostos fenólicos no produto concentrado.

Variáveis	Coeficientes de Regressão	Erro Padrão	t(7)	p-valor
Média	83,39	6,42	12,98	<0,01
Temperatura (L)	-17,32	6,03	-2,87	0,02
Temperatura (Q)	-0,72	6,63	-0,10	0,91
Pressão (L)	-3,89	6,03	-0,64	0,53
Pressão (Q)	2,80	6,63	0,42	0,68
pH (L)	17,54	6,03	2,90	0,02
pH(Q)	14,14	6,63	2,13	0,07
Temperatura (L) x Pressão (L)	3,80	7,87	0,48	0,64
Temperatura (L) x pH (L)	-18,79	7,87	-2,38	0,05
Pressão (L) x pH (L)	-6,93	7,87	-0,87	0,41

Variáveis em negrito = significativo para $p < 0,05$

Os coeficientes de regressão foram recalculados considerando apenas os termos estatisticamente significativos. Os parâmetros não significativos foram eliminados do modelo e adicionados aos resíduos (falta de ajuste). A análise de variância ANOVA ($p < 0,05$) para a resposta teor de compostos fenólicos foi realizada e está apresentada na Tabela 5.9.

Tabela 5.9. Análise de variância para a resposta teor de compostos fenólicos no produto concentrado.

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	F _{calculado}	F _{tabelado}
Regressão	4588,99	2	2290,49	36,65	3,26
Resíduos	876,41	14	62,60		
Falta de Ajuste	868,85	12	72,40	19,15	19,4
Erro Puro	7,56	2	3,78		
Total	5465,4	16	341,58		

$$R^2 = 81\%$$

O coeficiente de determinação para o teor de compostos fenólicos foi igual a 81% e o modelo foi significativo ao nível de 95% de confiança. A falta de ajuste não foi significativa no mesmo nível de confiança ($F_{\text{calculado}}$ menor que o F_{tabelado}), mostrando que o modelo é preditivo. O modelo codificado proposto para descrever o conteúdo de polifenóis em extratos aquosos concentrados de própolis, é descrito pela Equação 5.1.

$$\text{Compostos Fenólicos} = 84,41 - 17,32 \cdot T + 17,54 \cdot pH + 13,67 \cdot pH^2 - 18,79 \cdot T \cdot pH \quad (5.1)$$

Com o modelo com bom ajuste foi possível gerar superfícies de resposta para avaliar a interação entre as variáveis independentes (pressão, temperatura e pH) sobre o teor de compostos fenólicos nos extratos, sendo que em cada uma das superfícies uma das variáveis foi fixada no ponto central, conforme mostra a Figura 5.6.

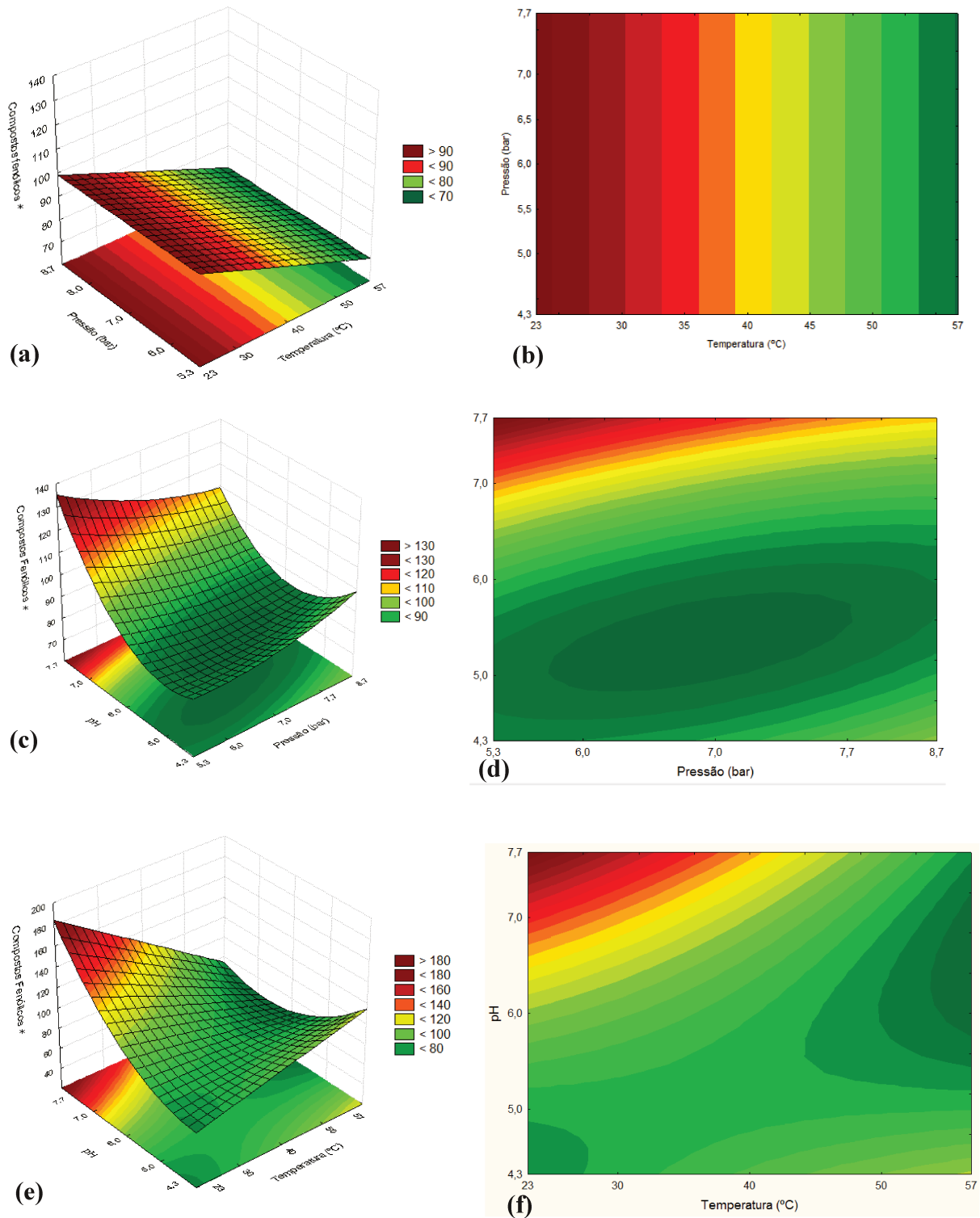


Figura 5.6. Superfícies de resposta e curvas de contorno para a resposta teor de compostos fenólicos

(a) e (b) pressão e temperatura, (c) e (d) pH e pressão, (e) e (f) pH e temperatura.

*Expressos em equivalentes de ácido gálico ($\mu\text{g/mL}$ extrato)

A Figura 5.6(a) relaciona a temperatura e a pressão com o conteúdo de compostos fenólicos no extrato aquoso de própolis. Pode-se observar que o aumento da temperatura provoca uma queda no teor de compostos fenólicos no produto concentrado, enquanto a variação de pressão não alterou a sua composição. Akowuah et al. (2009) relataram comportamento similar em relação aos polifenóis em extratos de folhas de *Gynura procumbens*, ocorrendo diminuição na concentração desses compostos quando extraídos em temperaturas na faixa dos 60°C , sugerindo a sua degradação.

O efeito do pH e da pressão sobre os compostos fenólicos está representado na Figura 5.6(c). O aumento do pH no extrato usado na alimentação do sistema propiciou um produto com maior quantidade de compostos fenólicos. Esse comportamento já era esperado uma vez que a alteração do pH na produção do extrato aquoso produziu um extrato inicial com maior teor destes compostos que são retidos pela membrana, gerando um concentrado com maior teor de compostos funcionais.

Na Figura 5.6(e) estão relacionadas as variáveis temperatura e pH com os compostos fenólicos do concentrado. Os dados mostram que a melhor condição para alta concentração de fenólicos ocorre em baixas temperaturas (entre 23 e 50°C) e pHs altos (até 7,7). Como a pressão não alterou a composição do produto final, considerou-se que as variáveis ótimas para a resposta “compostos fenólicos” foram a temperatura na faixa de 23 a 35°C , pH entre 6,5 e 7,7 em toda a faixa de pressão.

O mesmo tipo de análise foi realizado para a terceira variável dependente do planejamento experimental – fluxo de permeado. O fluxo foi calculado conforme a equação 3.1, em sistema fechado após 60 minutos de processo. A Tabela 5.10 apresenta os coeficientes de regressão para a resposta fluxo de permeado.

Tabela 5.10. Coeficientes de regressão e significância das variáveis temperatura, pressão e pH sobre a resposta fluxo de permeado.

Variáveis	Coeficientes de Regressão	Erro Padrão	t(7)	p-valor
Média	49,57	2,26	21,97	<0,01
Temperatura (L)	12,27	1,06	11,58	<0,01
Temperatura (Q)	-0,53	1,17	-0,45	0,66
Pressão (L)	7,44	1,06	7,02	<0,01
Pressão (Q)	-0,21	1,17	-0,18	0,86
pH (L)	-0,95	1,06	-0,89	0,40
pH(Q)	-6,31	1,17	-5,41	<0,01
Temperatura (L) x Pressão (L)	1,50	1,38	1,08	0,31
Temperatura (L) x pH (L)	-1,13	1,38	-0,81	0,44
Pressão (L) x pH (L)	-0,83	1,38	-0,60	0,57

Variáveis em negrito = significativo para $p < 0,05$

Os coeficientes de regressão foram recalculados considerando apenas os termos estatisticamente significativos. Os parâmetros não significativos foram eliminados do modelo e adicionados aos resíduos (falta de ajuste). A análise de variância ANOVA ($p < 0,05$) para a resposta fluxo de permeado foi realizada e está apresentada na Tabela 5.11.

Tabela 5.11. Análise de variância para a resposta fluxo de permeado.

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	F _{calculado}	F _{tabelado}
Regressão	3302,53	2	1651,26	147,87	3,26
Resíduos	156,34	14	11,17		
Falta de Ajuste	152,92	12	12,74	7,45	19,4
Erro Puro	3,42	2	1,71		
Total	3458,87	16	216,18		

$R^2 = 95\%$

O coeficiente de determinação para o fluxo de permeado foi igual a 95% e o modelo foi significativo ao nível de 95% de confiança. A falta de ajuste não foi significativa no mesmo nível de confiança ($F_{\text{calculado}}$ menor que o F_{tabelado}), mostrando que o modelo é preditivo. O modelo codificado proposto para descrever o fluxo de permeado de extratos aquosos de própolis, é descrito pela Equação 5.2.

$$\text{Fluxo de Permeado} = 48,84 + 24,53 \cdot T + 14,88 \cdot P - 12,28 \cdot pH^2 \quad (5.2)$$

Através do modelo com bom ajuste, foi possível gerar superfícies de resposta para avaliar a interação entre as variáveis independentes (pressão, temperatura e pH) sobre o fluxo de permeado do processo, sendo que em cada uma das superfícies uma das variáveis foi fixada no ponto central, conforme mostra a Figura 5.7.

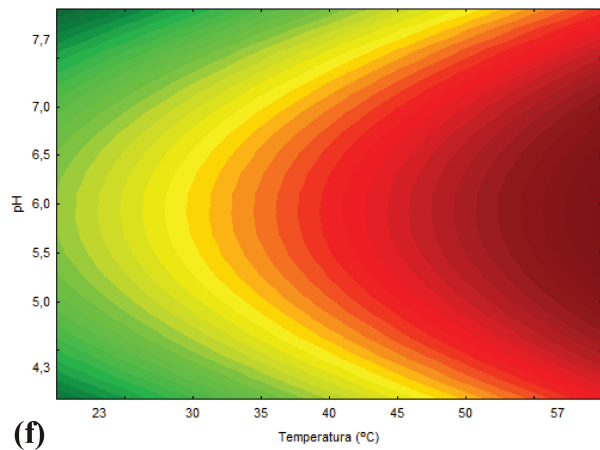
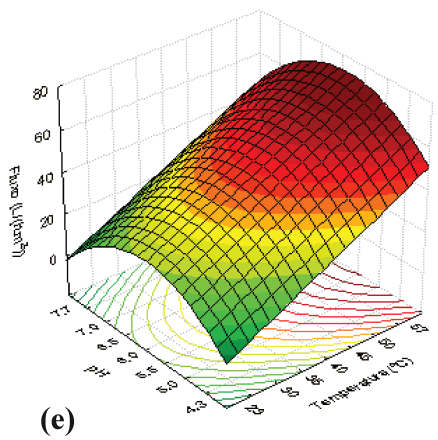
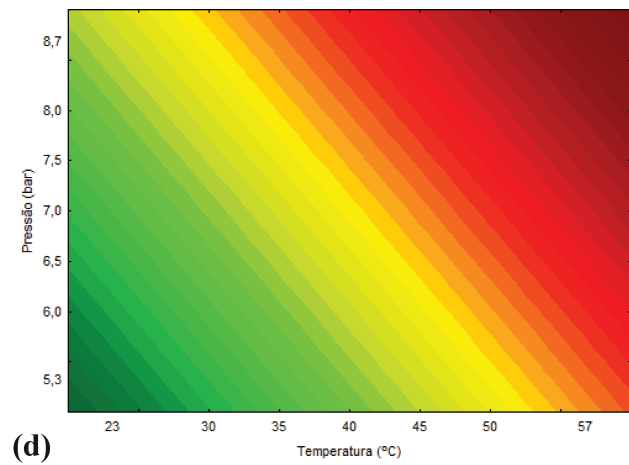
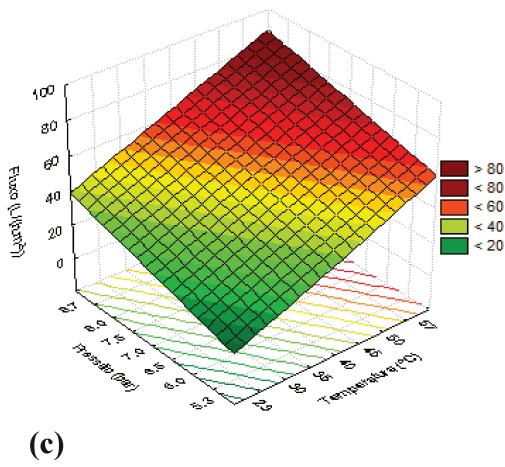
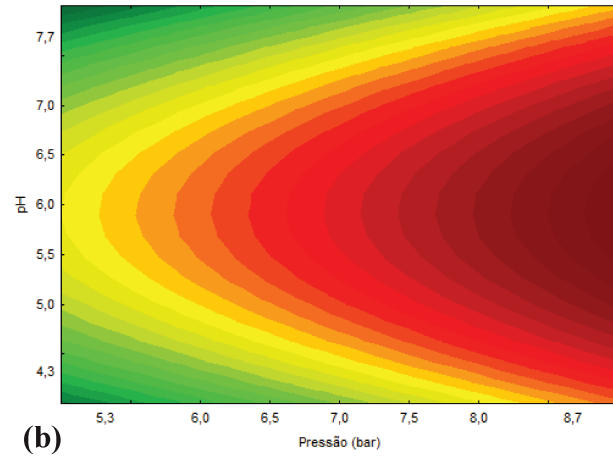
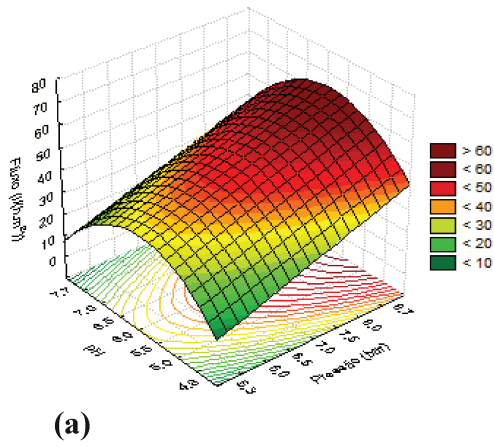


Figura 5.7. Superfícies de resposta e curvas de contorno para a resposta fluxo de permeado. (a) e (b) pressão e pH, (c) e (d) temperatura e pressão, (e) e (f) pH e temperatura.

A Figura 5.7(a) representa o valor do fluxo de permeado variando com a pressão do processo e o pH da solução de alimentação. Percebe-se que os maiores valores de fluxo acontecem com pressão mais alta e com pH entre 5,0 e 7,0. O aumento do fluxo proporcional ao aumento de pressão é uma resposta esperada, uma vez que a pressão gerada no sistema é a principal força motriz do processo, responsável pela passagem do fluido através da membrana. Os extratos na faixa de pH entre 5,0 e 7,0 foram os que apresentaram menor viscosidade (Tabela 5.1), e por isso tem a passagem facilitada através da membrana, gerando um maior fluxo de permeado.

O fluxo foi diretamente proporcional ao aumento de temperatura (Figura 5.7(c)) uma vez que esta grandeza está relacionada com a viscosidade da solução, diminuída com o aumento da temperatura, tornando mais fácil a passagem da solução pelo sistema. A Figura 5.7(e) permite a escolha das melhores faixas de processamento, considerando a resposta fluxo de permeado e que a pressão é diretamente proporcional à resposta dentro do intervalo estudado. Assim sendo, a faixa ótima de pH está entre 5,0 e 7,0 e de temperatura entre 40 e 57°C para a resposta fluxo de permeado.

5.4. Validação dos resultados do planejamento experimental

Baseando-se nos resultados obtidos nos ensaios realizados para o delineamento composto central rotacional, foi possível escolher as melhores condições de temperatura, pressão e pH da solução de alimentação para o processo de concentração do extrato aquoso de própolis considerando-se a composição do concentrado em relação a flavonóides e compostos fenólicos e ao fluxo de permeado, durante o processamento.

A escolha dessas condições foi feita avaliando-se as superfícies de resposta geradas pelo planejamento experimental (Figuras 5.6(a) a (f)) para a resposta compostos fenólicos e as Figuras 5.7(a) a (f) para a resposta fluxo de permeado, além da análise de todos os valores obtidos para as variáveis dependentes em todos os ensaios (Tabela 5.5), para que fossem consideradas as respostas para as quais não foi possível a elaboração de

modelo. A temperatura foi fixada em 30°C, para garantir que não ocorra a degradação dos compostos fenólicos, pH 7,7 que propiciou a melhor extração dos compostos funcionais da própolis bruta em meio aquoso e pressão de 8,7 bar – máxima pressão usada no trabalho, que gerou maior fluxo de permeado e não interferiu na composição do concentrado obtido em relação aos flavonóides e polifenóis.

Foi preparado um novo extrato em pH 7,7 de acordo com o item 4.2, o qual foi submetido ao processo de concentração por membrana até fator de concentração 4,0. A Figura 5.8 representa o fluxo de permeado obtido em sistema fechado.

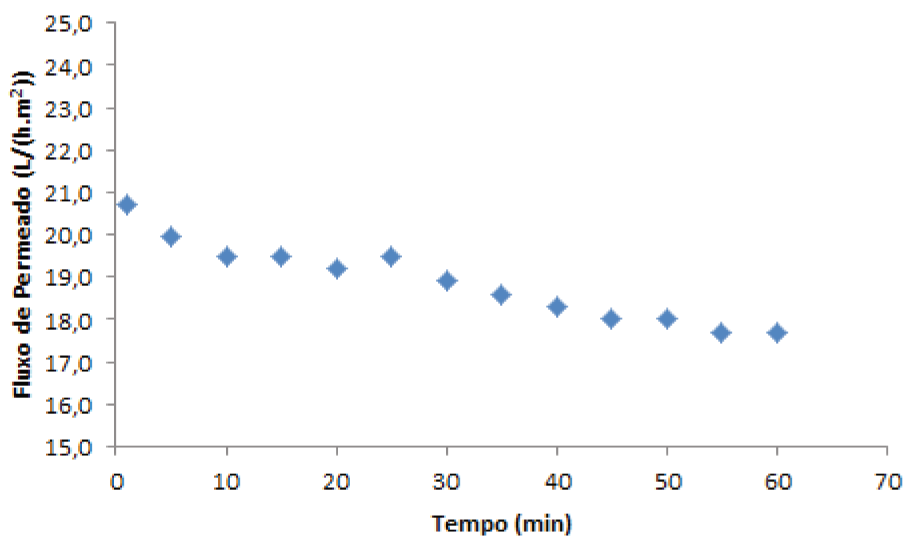


Figura 5.8. Fluxo de permeado obtido em sistema fechado para as condições selecionadas de processamento (pH 7,7; 8,7 bar e 30°C)

O valor do fluxo de permeado obtido após a estabilização do sistema foi de 17,7 L/(h.m²) e o seu comportamento foi similar às curvas típicas de fluxo de permeado, conforme modelo descrito por Habert et al. (2006). Logo após o início dos experimentos ocorreu um declínio no fluxo devido à polarização da concentração na superfície da membrana e também a incrustação (*fouling*) no interior dos poros da membrana. Finalmente houve a tendência de estabilização do fluxo até o término do processamento.

Utilizando-se a equação 5.2 que prediz o comportamento do fluxo de permeado

a partir do planejamento experimental, o valor de fluxo de permeado nas condições ótimas de processamento seria de 14,65 L/(h.m²), o que representa um desvio de cerca de 17% em relação ao valor apresentado.

A Figura 5.9 representa o fluxo de permeado obtido para o processo de concentração do extrato de própolis nas melhores condições (pH 7,7; 8,7 bar e 30°C), em sistema aberto. A queda do fluxo de permeado foi mais acentuada durante os primeiros 10 minutos de processamento, podendo ser decorrência da polarização por concentração no início do processo, ou seja, formação de uma camada polarizada estável sobre a superfície da membrana. A formação dessa camada provocou um decaimento médio de 10% no fluxo de permeado. Perfis de fluxo de permeado similares para nanofiltração foram obtidos para concentração de vinho tinto (BANVOLGYI et al., 2006) e para extratos de bagaço de uva (DÍAZ-REINOSO et al., 2009).

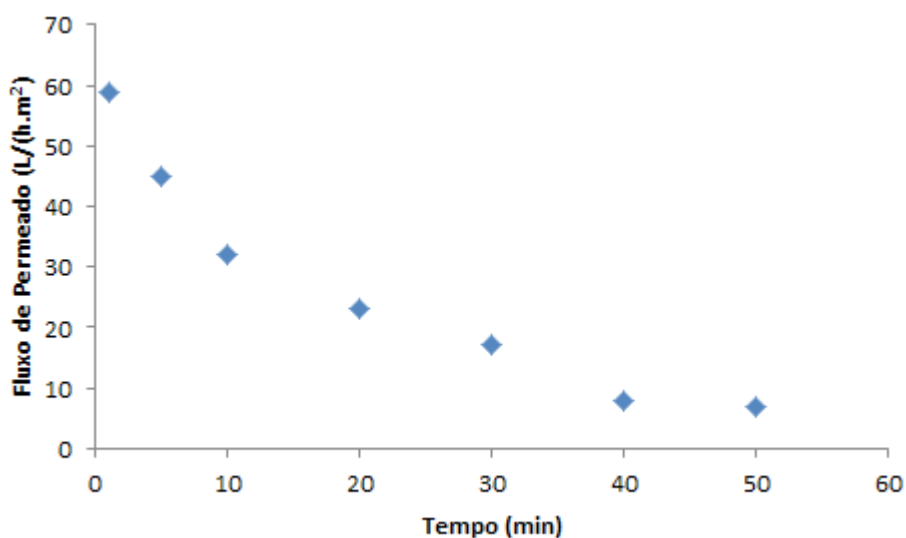


Figura 5.9. Fluxo de permeado obtido em sistema aberto para as condições selecionadas de processamento (pH 7,7; 8,7 bar e 30°C)

Tylkowski et al. (2010) estudaram a concentração por nanofiltração dos compostos biologicamente ativos de extratos de própolis em módulo de bancada, através da simulação do escoamento tangencial, e verificaram que durante o processo ocorre baixa sedimentação de compostos na superfície da membrana, não afetando o fluxo de permeado

durante o processo. Por se tratar de uma simulação do processamento em contra corrente, ou seja, o fluxo de permeado obtido não pode ser comparado com o do presente trabalho.

Tsui e Cheryan (2007) estudaram a purificação do extrato de milho alcoólico para produção de xantofila, utilizando nanofiltração. Obtiveram fluxo de aproximadamente 10,0 L/h.m², ao trabalhar com pressão de 27 bar, a 50°C. Hossain (2003) estudou o processo de concentração de antocianina (pertencente à família dos flavonóides) de resíduos de cassis em solução aquosa por ultrafiltração em diferentes tipos de membranas e obteve valores de fluxo de permeado de, no máximo, 17,3 L/h.m² a 1,4 bar e 18°C. Banvolgyi et al. (2006) estudaram o processo de concentração de vinho tinto (rico em polifenóis, álcool e açúcares) por nanofiltração em diferentes temperaturas de processamento e pressão de 20 bar e obtiveram valores de fluxo de permeado de 10,0, 15,0 e 20,0 L/h.m² para 30, 40 e 50°C respectivamente. Para os extratos de própolis foram utilizadas pressões relativamente baixas (até 8,7 bar), pois levou-se em consideração resultados anteriores obtidos por Mello (2008). No entanto, quando comparada a outros processos estudados na literatura, o uso de pressões baixas ocasionou valores de fluxo de permeado semelhantes ou mesmo superiores, evidenciando sua viabilidade já que se gasta menos energia para gerar menor pressão de processamento.

5.5. Modelos de transporte

A análise das resistências intrínsecas à membrana foi realizada para avaliação dos principais fenômenos responsáveis pelo decaimento do fluxo de permeado durante o processamento do extrato aquoso de própolis. Foram utilizados os resultados experimentais obtidos na validação do planejamento experimental (pH 7,7; 8,7 bar e 30°C) e a metodologia descrita no item 4.5.10 Os resultados dos modelos foram comparados com os resultados de fluxo de permeado obtidos durante a validação do planejamento experimental, de forma a se caracterizar os principais mecanismos envolvidos no processo de concentração dos extratos de própolis.

5.5.1. Cálculo das resistências

A Tabela 5.12 apresenta os fluxos de permeado necessários para o cálculo das resistências do processo. “J” representa o fluxo de permeado dos extratos a um fator de concentração de 4, aplicado no cálculo da resistência total (equação 3.4); o fluxo de água pura foi determinado após o enxague ao final do experimento (J'_w), utilizado para o cálculo da resistência do “fouling” (equação 4.3); e o fluxo de água pura com a membrana limpa (J_w), que serviu de base para o cálculo da resistência intrínseca da membrana (equação 4.4).

Tabela 5.12. Valores de fluxo para o cálculo das resistências.

pH	Pressão (bar)	J (L/h.m ²)	J' _w (L/h.m ²)	J _w (L/h.m ²)
4,3	7,0	27,30	40,58	70,47
5,0	6,0	37,65	42,68	59,26
	8,0	55,50	60,3	81,69
6,0	7,0	48,86	55,96	70,47
	5,3	36,00	45,25	51,40
	8,7	57,90	69,74	89,54
7,0	6,0	34,05	43,14	59,26
	8,0	48,60	61,78	81,69
7,7	7,0	32,10	47,36	70,47

A Tabela 5.13 apresenta os valores obtidos da resistência total (R_t), da membrana (R_m), incrustação (R_f) e da polarização da concentração (R_p), em função das diferentes condições operacionais. Através da análise dessa tabela, percebe-se que houve uma boa reprodutibilidade dos dados de resistência da membrana (R_m), decorrente do fato da mesma membrana ter sido utilizada em todos os experimentos, sugerindo pouca ocorrência de erro experimental.

Tabela 5.13. Valores de resistências para nanofiltração de extratos de própolis.

pH	Pressão (bar)	$R_t (10^{10} \text{ m}^{-1})$	$R_m (10^{10} \text{ m}^{-1})$	$R_f (10^{10} \text{ m}^{-1})$	$R_p (10^{10} \text{ m}^{-1})$
4,3	7,0	9,35	3,58	2,63	3,14
5	6,0	5,81	3,64	1,42	0,75
	8,0	5,26	3,53	1,25	0,48
6	7,0	5,23	3,58	0,93	0,72
	5,3	5,37	3,71	0,51	1,15
	8,7	5,48	3,5	9,93	0,99
7	6,0	6,43	3,64	1,36	1,42
	8,0	6,00	3,53	1,14	1,34
7,7	7,0	7,95	3,58	1,74	2,63

t, m, f e p indicam as resistências totais, da membrana, por incrustação e por camada polarizada, respectivamente.

Nos ensaios com pH 7,7 e em pH 4,3 a resistência total foi mais alta que nos outros ensaios pois em pHs mais altos, a camada gel torna-se mais espessa, o que faz a sua resistência aumentar. A resistência por polarização e incrustação também aumentou em pH 4,3, podendo ser uma evidência da maior afinidade da membrana pelos solutos em pHs mais baixos.

5.5.2. Modelos matemáticos

A partir das equações 4.7 a 4.10 foi possível construir curvas de fluxo de permeado baseadas no modelo matemático proposto por Hermia (1982), conforme descrito no item 4.5.10 A Figura 5.10 representa os resultados obtidos, comparados com os dados experimentais do processo para fluxo de permeado em sistema aberto.

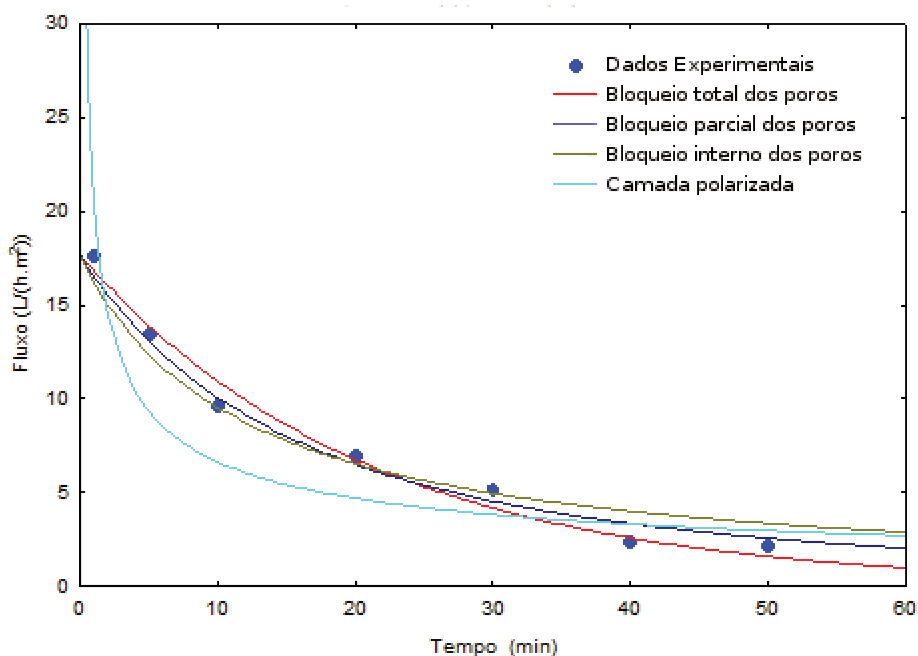


Figura 5.10. Fluxo de permeado de extrato aquoso de própolis em sistema aberto versus tempo de processamento (pH 7,7; 8,7 bar e 30°C).

Linhas representam os valores calculados pelos modelos matemáticos.

As tendências obtidas pelos modelos de bloqueio total, parcial e interno dos poros se ajustaram bem aos dados experimentais com coeficientes de determinação (R^2) de 96, 98 e 98% respectivamente. Nestes modelos, não houve uma taxa de declínio muito alta no início do processo, ou seja, não houve uma queda acentuada do fluxo de permeado no início do processo. Por outro lado, a curva obtida pelo modelo proposto para formação de camada polarizada não se ajustou bem aos dados experimentais ($R^2 = 78\%$) devido à queda acentuada do fluxo nos primeiros minutos de processamento.

Através dos dados apresentados na Tabela 5.13, pode-se perceber que houve uma baixa resistência devido à formação de camada polarizada na maioria dos ensaios, o que explica a baixa representatividade do modelo da camada polarizada. As maiores resistências do processos foram proporcionadas pela membrana (R_m) e pela incrustação (R_f), sendo que a resistência da membrana está considerada em todos os modelos e a resistência pela incrustação está diretamente relacionada com os modelos de bloqueio total,

parcial e interno dos poros, explicando o melhor ajuste deste. Assim, pode-se considerar que a modelagem matemática utilizada foi suficiente para prever o processo de concentração de extratos aquosos de própolis por nanofiltração, e que este processo é pouco influenciado pela formação de camada polarizada, provavelmente devido à composição química do extrato.

5.6. **Análise dos produtos do processo de concentração por membranas**

Os produtos do processo de concentração por nanofiltração (concentrado e permeado) obtidos nas condições ótimas de processamento foram avaliados em relação à densidade, viscosidade, compostos fenólicos, flavonóides e atividade antioxidante de acordo, com a metodologia descrita no item 4.3 Os resultados encontram-se nas tabelas 5.14 e 5.15.

Tabela 5.14. Caracterização dos produtos do processo de concentração por membranas em relação à densidade, viscosidade, compostos fenólicos e flavonóides

	Alimentação	Concentrado	Permeado
Densidade (kg/m³)	1037,5 ± 1,9	1110,5 ± 0,6	998,3 ± 1,0
Viscosidade (kg/(m.s))	(17,06 ± 0,02)10 ⁻³	(29,19 ± 0,18) 10 ⁻³	(9,87 ± 0,05) 10 ⁻³
Flavonóides *	19,57 ± 4,02	35,57 ± 5,86	3,16 ± 0,45
Compostos Fenólicos**	116,93 ± 2,02	180,51 ± 0,45	77,23 ± 1,39

Valores representam média ± desvio padrão (n=3)

* Expressos em equivalentes de quercetina (µg/mL extrato)

**Expressos em equivalentes de ácido gálico (µg/mL extrato)

Os valores obtidos para o produto permeado indicam que a densidade e viscosidade foram muito similares quando comparados com as mesmas grandezas da água pura a 25°C (997 kg/m³ e 8,9. 10⁻⁴ kg/(m.s) respectivamente). Esta similaridade da

densidade e da viscosidade do permeado em relação à água pura pode ser uma indicação da baixa presença de compostos de maior peso molecular dissolvidos. Em relação ao produto concentrado, houve aumento da densidade e da viscosidade em relação ao extratos iniciais (alimentação), com um aumento de 7,0% na densidade e de 71,14% para a viscosidade.

O concentrado do processo de concentração apresentou cerca de 82% mais flavonóides que a alimentação, enquanto os compostos fenólicos apresentaram um aumento de aproximadamente 50%. Esses valores demonstram que a membrana de nanofiltração utilizada foi mais eficiente na retenção dos flavonóides do que dos compostos fenólicos, provavelmente devido ao fato de que os flavonóides tem uma massa molar superior (entre 250 e 300 g/mol) que os ácidos fenólicos (entre 100 e 250 g/mol) sendo retidos pela membrana com maior facilidade, uma vez que a membrana possui massa molar de corte de 300 g/mol. A eficiência do processo de retenção dos flavonóides também pode estar relacionada à formação de camada polarizada na superfície da membrana, que atua como uma barreira secundária ao processo de separação. Alguns ácidos fenólicos possuem massa molar muito baixa (em torno de 150 g/mol), podendo ser permeável pela membrana e consequentemente diluir-se no produto permeado, gerando a perda no concentrado.

A atividade antioxidante dos produtos do processamento nas condições de validação do mesmo (pH 7,7; 8,7 bar e 30°C), apresentaram resultados condizentes com o aumento de compostos funcionais no concentrado e diminuição destes no permeado, ou seja, o produto concentrado apresentou aumento na atividade antioxidante em relação à alimentação enquanto o permeado apresentou baixos valores de atividade.

Tabela 5.15. Caracterização dos produtos do processo de concentração por membranas em relação à atividade antioxidante

	Alimentação	Concentrado	Permeado
DPPH (%)	47,46 ± 2,41	73,43 ± 1,25	(***)
FRAP*	954,63 ± 36,85	1278,39 ± 58,21	154,72 ± 17,49
FTC **	0,167 ± 0,012	0,107 ± 0,006	0,364 ± 0,028

Valores representam média ± desvio padrão (n=3)

* Expressos em equivalentes de sulfato ferroso (μmol/mL extrato)

** Absorbância medida em 125 minutos a 500 nm.

*** Os valores encontrados foram inferiores ao controle.

5.6.1. Cor

O permeado de todos os experimentos apresentou-se com coloração praticamente incolor, similar à água, enquanto o retentado pareceu escurecido em relação ao extrato inicial. A Figura 5.11 mostra os resultados obtidos para a concentração feita a pH 7,7; 8,7 bar e 30°C (validação do planejamento experimental).



Figura 5.11. Produtos obtidos no processo de nanofiltração (pH 7,7; 8,7 bar e 30°C). Da esquerda para direita: Permeado, Extrato Inicial e Concentrado, respectivamente

Os parâmetros de cor das amostras dos produtos do processo de concentração,

bem como do extrato sem alteração de pH e do alcoólico comercial foram obtidos através da metodologia descrita no item 4.5.7 e estão expressos na Tabela 5.16. Os dados apresentados correspondem a uma média de três determinações, com seus respectivos desvios padrão.

Tabela 5.16. Análise instrumental de cor pelo sistema CIELab para as amostras de permeado, alimentação, concentrado, alcoólica e em pH 4,3.

Parâmetro Cromático	Alimentação	Concentrado	Permeado	4,3	Alcoólico
L*	9,88±0,06	8,70±0,06	90,52±0,48	11,76±0,61	1,94±0,26
a*	1,11±0,02	0,86±0,02	-0,49±0,08	1,19±0,18	0,76±0,07
b*	3,20±0,04	1,39±0,14	-2,2±0,18	6,35±0,14	0,46±0,04
C* (croma)	3,39±0,04	1,63±0,10	2,26±0,19	6,46±0,17	0,89±0,05
H* (ângulo Hue)	70,94±0,28	58,07±3,44	257,64±1,27	79,42±1,41	31,30±3,94

O permeado apresentou a maior luminosidade dentre todas as amostras (L* 90,52) pelo fato de ser praticamente incolor. O extrato alcoólico apresentou o menor valor de L* (1,94) e estes valores foram crescentes para concentrado, alimentação e amostra sem alteração de pH. Este fato pode ser uma indicação de que quanto maior a quantidade de compostos funcionais extraídos da própolis bruta, menor a luminosidade da amostra.

As amostras com menor quantidade de compostos fenólicos e flavonóides (alimentação e pH 4,3) apresentaram coloração mais avermelhada (a* entre 1,11 e 1,19) que as amostras com maior quantidade de compostos (alcoólico e concentrado). Para o parâmetro b*, o permeado apresentou o menor valor (-2,2) devido à sua coloração praticamente incolor, seguido do produto concentrado e do extrato etanólico comercial, devido à alta concentração de compostos.

Com os parâmetros apresentados (a* e b*), as coordenadas cilíndricas C*

(croma) e H^* (ângulo hue) foram calculadas. O ângulo Hue é o atributo que normalmente se identifica com o nome da cor como vermelho (0°), amarelo (90°), verde (180°) e azul (270°). O croma é a intensidade e a pureza da cor, independente do quão clara ou escura é a cor. Uma cor com alto valor de croma parece luminosa ou concentrada, enquanto uma cor de baixo croma parece pálida, acinzentada ou diluída (BRAINARD, 2003). A Figura 5.12 representa a mudança do ângulo Hue nas diferentes amostras analisadas.

O Anexo D apresenta os padrões de coloração das amostras obtidas no processo de concentração, além das amostras sem alteração de pH e alcoólico comercial. Os padrões, feitos no software GIMP© 2.6.11 através dos valores de L^* , a^* e b^* obtidos no colorímetro, representam a coloração composta pela média dos valores lidos na amostra e têm caráter apenas ilustrativo.

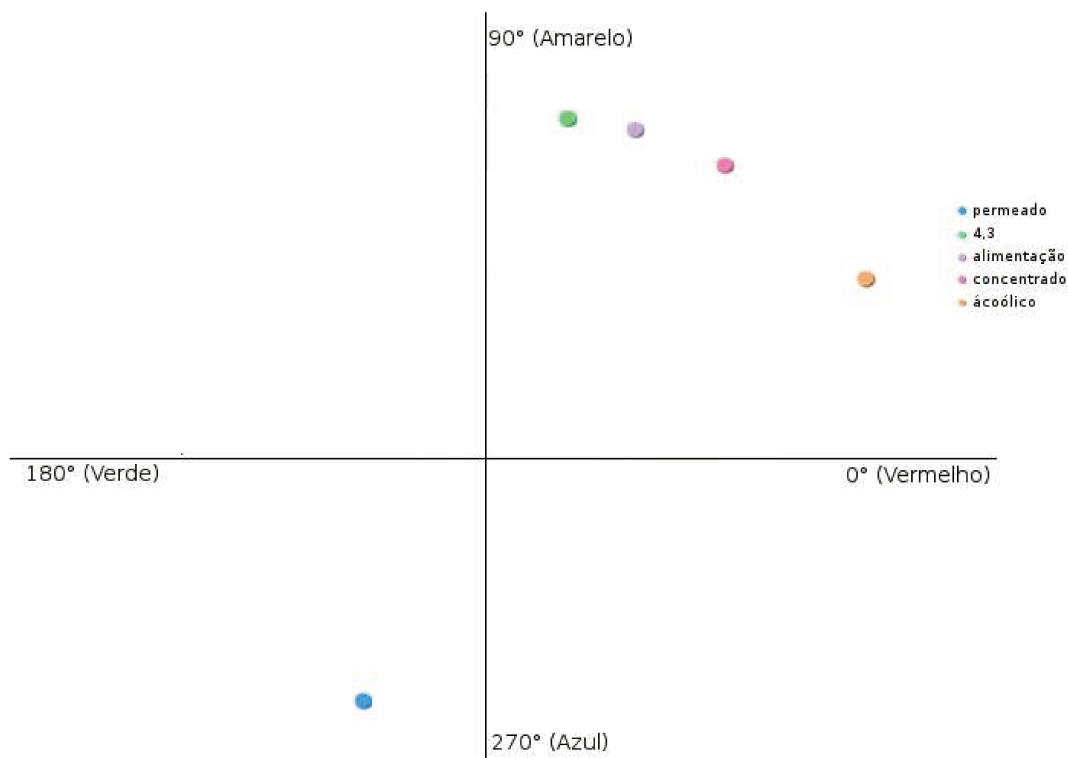


Figura 5.12. Representação do ângulo Hue dos diferentes produtos obtidos no processo de concentração, extrato alcoólico e aquoso sem alteração de pH.

O produto concentrado e o extrato alcoólico comercial (com ângulo Hue de 58,07° e 31,30°, respectivamente) apresentaram-se mais vermelhos que a alimentação (70,94°), que o extrato sem mudança de pH (79,42°) e que o produto permeado (257,64), concordando com o aumento da concentração de compostos fenólicos e flavonóides no concentrado e no extrato alcoólico. Dessa forma, pode-se concluir que uma diminuição no conteúdo de flavonóides e compostos fenólicos na solução deixa-a mais amarela e mais esverdeada do que as amostras com maior concentração dos mesmos (que tendem para o avermelhado e azulado).

Outros autores que trabalharam com concentração por membranas, também verificaram aumento da luminosidade do produto permeado em relação à alimentação e o concentrado (USHIKUBO, 2006, SILVA, 2010 e LAORKO et al., 2010), evidenciando que o permeado sempre tem a tendência de ser mais límpida do que os outros produtos do processo.

5.6.2. Cromatografia líquida de alta eficiência

As amostras de extrato aquoso sem alteração de pH, o extrato aquoso em pH 7,7 (alimentação do processo de nanofiltração), o concentrado e o permeado obtidos no processo de concentração por membranas foram analisados por cromatografia líquida de alta eficiência, conforme descrito no item 4.5.5 O extrato aquoso “basificado” e o extrato alcoólico comercial também foram avaliados pelo método para comparação dos resultados obtidos.

As Figuras 5.13 a 5.18 representam os cromatogramas obtidos para a amostra em pH 4,3 (sem alteração do meio), alimentação, concentrado, permeado, extrato aquoso “basificado” e alcoólica comercial, respectivamente, e as concentrações de cada composto identificado nos cromatogramas encontram-se na Tabela 5.17.

Tabela 5.17. Concentração dos compostos identificados por HPLC.

	Concentração (µg/mL)				
	Permeado	4,3	Alimentação	Concentrado	Álcoolico
Ácido Cafeico	0,07	0,12	2,51	11,22	-
Ácido Cumárico	3,06	78,85	4,49	25,74	641,29
Ácido Ferúlico	-	7,19	0,12	2,76	48,54
Rutina	-	-	-	22,49	132,07
Kaempferol	-	-	-	-	444,9
Crisina	-	-	3,15	11,5	235,4

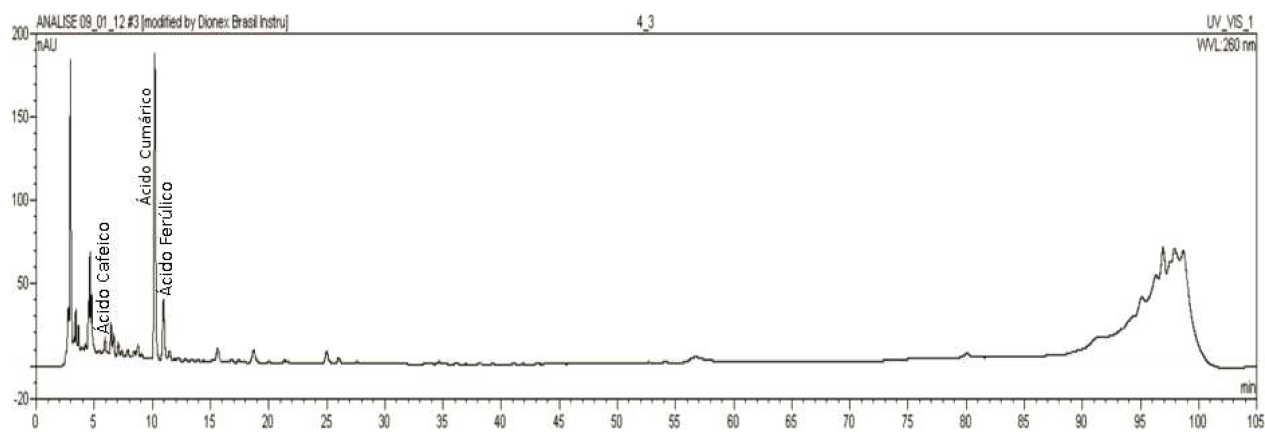


Figura 5.13. Cromatograma do extrato aquoso sem alteração de pH.

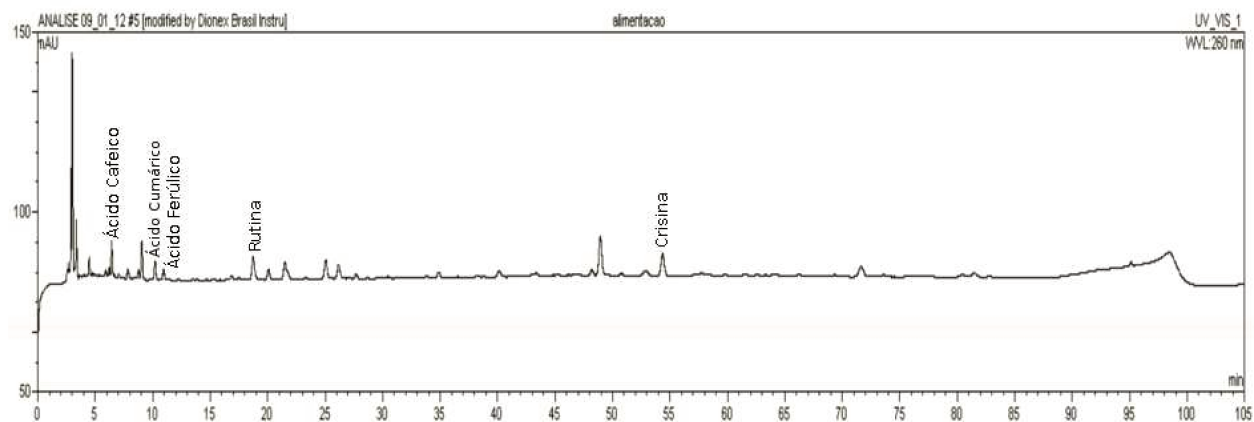


Figura 5.14. Cromatograma do extrato aquoso em pH 7,7 (alimentação).

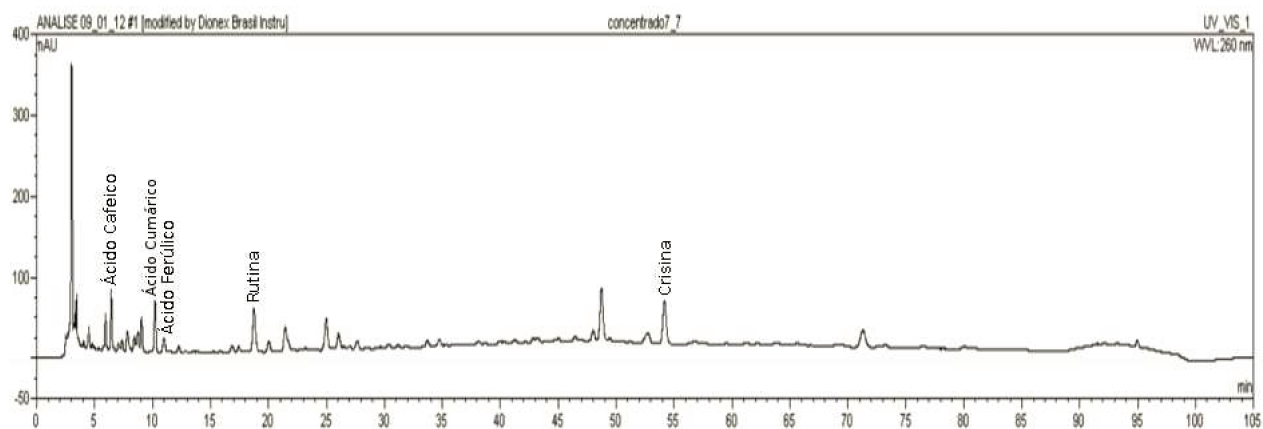


Figura 5.15. Cromatograma do extrato aquoso concentrado.

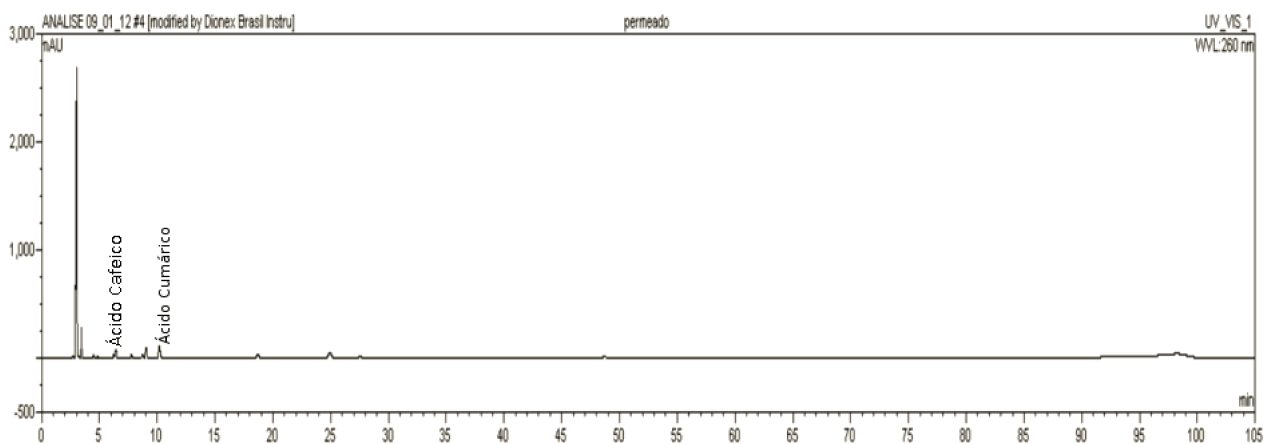


Figura 5.16. Cromatograma do extrato aquoso permeado.

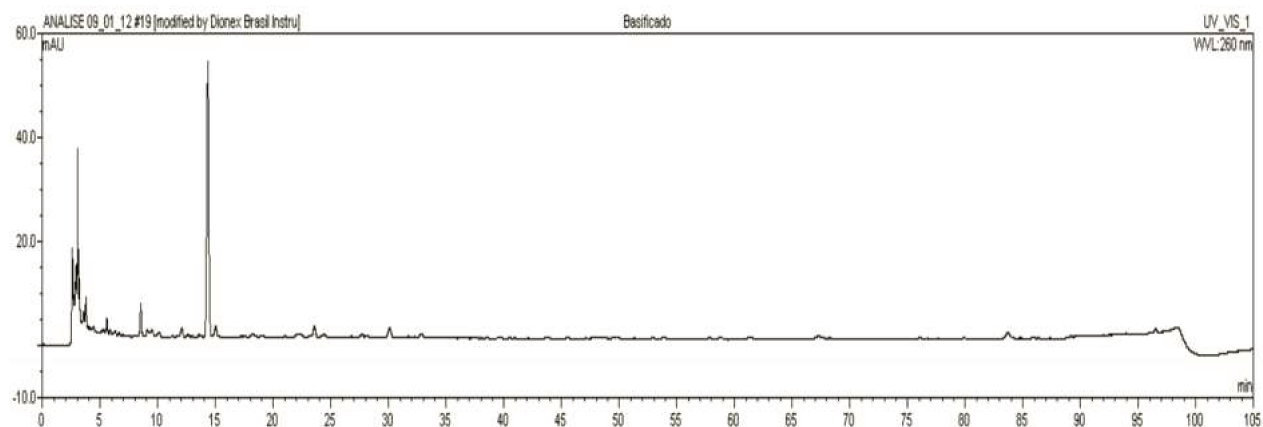


Figura 5.17. Cromatograma do extrato aquoso basicificado a pH 7,7 após a centrifugação do extrato.

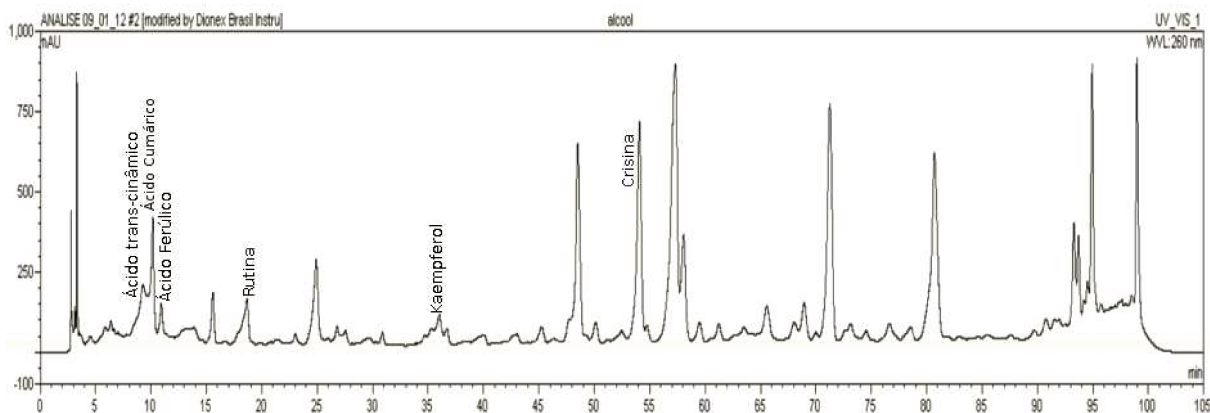


Figura 5.18. Cromatograma do extrato alcoólico comercial.

No extrato aquoso sem alteração de pH (Figura 5.13) ocorreu a extração apenas de compostos polares, separados no cromatograma em tempos curtos de retenção. De modo geral, houve a presença de poucos picos, entre eles os que representam o ácido caféico, o ácido cumárico e o ácido ferúlico. Caracterizam-se por serem ácidos fenólicos de baixo peso molecular e solúveis em água, por isso, foram identificados na amostra de extrato aquoso sem alteração de pH. Além disso, a concentração de ácido cumárico nesse extrato foi o maior dentre os produtos aquosos, evidenciando uma maior hidrofiliabilidade deste composto.

A Figura 5.14 representa o cromatograma obtido para a amostra utilizada como alimentação do processo de nanofiltração, ou seja, extrato de própolis aquoso em pH 7,7. Pode-se verificar uma maior extração de compostos mais apolares, como a crisina, em relação à amostra em pH 4,3, decorrente da menor polaridade do solvente de extração, como pode ser visto nos picos mais à direita do cromatograma. No entanto, alguns compostos polares – ácido cumárico e ácido ferúlico – foram extraídos em menor quantidade neste pH do que aquele sem alteração, podendo ser uma evidência de hidrólise desses compostos em pHs elevados.

O extrato aquoso concentrado (Figura 5.15) apresentou os mesmos compostos da alimentação do sistema, mas em concentrações mais altas. Apenas pequena parcela de ácido caféico e de ácido cumárico foram perdidas para o permeado do processo (Figura

5.16). Estes compostos são mais susceptíveis à perda no processo de nanofiltração devido ao seu baixo peso molecular, inferior à massa molar de corte da membrana utilizada para concentração.

Comparando-se o cromatograma do extrato sem alteração do pH (figura 5.13) com aquele obtido pela análise do mesmo extrato, mas com alteração do pH após a extração (Figura 5.17) observa-se que não ocorreram picos após 35 minutos de retenção, ou seja, picos equivalentes a compostos mais polares. Assim, a alteração de pH não é responsável pelo aparecimento de compostos polares que poderiam ser formados pela hidrólise dos compostos existentes, devido à adição da base. O pico representado em cerca de 15 minutos de retenção pode ser decorrente de um processo de hidrólise de um composto apolar. Como o mesmo não foi identificado pelos padrões utilizados no trabalho, não se pode fazer uma afirmação segura a respeito do processo de hidrólise.

No cromatograma do extrato alcoólico (Figura 5.18) foram identificadas as maiores quantidades de compostos em relação às amostras testadas, o que corrobora com o fato de ser considerado o melhor solvente para extratos da própolis. O ácido cumárico não foi identificado, possivelmente porque este composto co-eluiu com outros compostos de estrutura similar. Houve a extração de grande quantidade de compostos apolares, em altas concentrações, mas que não foram identificados dentre os padrões adotados no trabalho.

Através da comparação da concentração dos compostos presentes no permeado e no concentrado do processo, apresentados na Tabela 5.17, pode-se perceber que todos os produtos identificados no concentrado tiveram índice de retenção (R) de quase 100%, com exceção do ácido cumárico que foi retido pela membrana a aproximadamente 90%. Este índice indica que a membrana foi eficaz em separar os compostos funcionais da própolis, já que pouca quantidade foi eluída com o permeado. Apesar do alto índice de retenção e do aumento na concentração dos compostos fenólicos em relação à alimentação, o produto concentrado apresentou concentrações menores que o extrato alcoólico comercial em relação aos padrões identificados nas amostras.

Devido à própolis possuir uma composição muito complexa e variada, é muito difícil prever os compostos que serão encontrados, por isso, nem todos os padrões foram

encontrados nas amostras. O Artepilin-C, por exemplo, famoso por ser um importante composto da própolis verde brasileira, não foi identificado em nenhuma das amostras, podendo ter saído co-eluído com outro composto no extrato alcoólico, já que se trata de um composto apolar de tempo de retenção elevado (cerca de 80 minutos). A lista dos padrões utilizados, com seus respectivos tempos de retenção encontram-se no Anexo E.

5.6.3. Padrão espectrofotométrico na região U.V.-visível dos extratos de própolis

Os extratos de própolis obtidos após o processamento com membranas, o extrato alcoólico comercial e o extrato aquoso sem alteração de pH foram analisados através da espectrofotometria na região U.V.-visível, na faixa de comprimento de onda entre 200 e 600 nm, conforme descrito no item 4.5.6. Na Figura 5.19 encontram-se os espectros de absorção das amostras, bastante diferentes entre as amostras aquosas e alcoólicas, e similares dentre todas as amostras aquosas. O produto permeado apresentou um pico de menor intensidade enquanto o concentrado teve maior intensidade em relação à alimentação, correlacionando de modo geral com os dados obtidos na determinação de flavonóides totais. Todos os espectros apresentaram apenas um pico de absorção sendo que na amostra alcoólica foi situado próximo à 290 nm e nas amostras aquosas foi próximo de 310 nm.

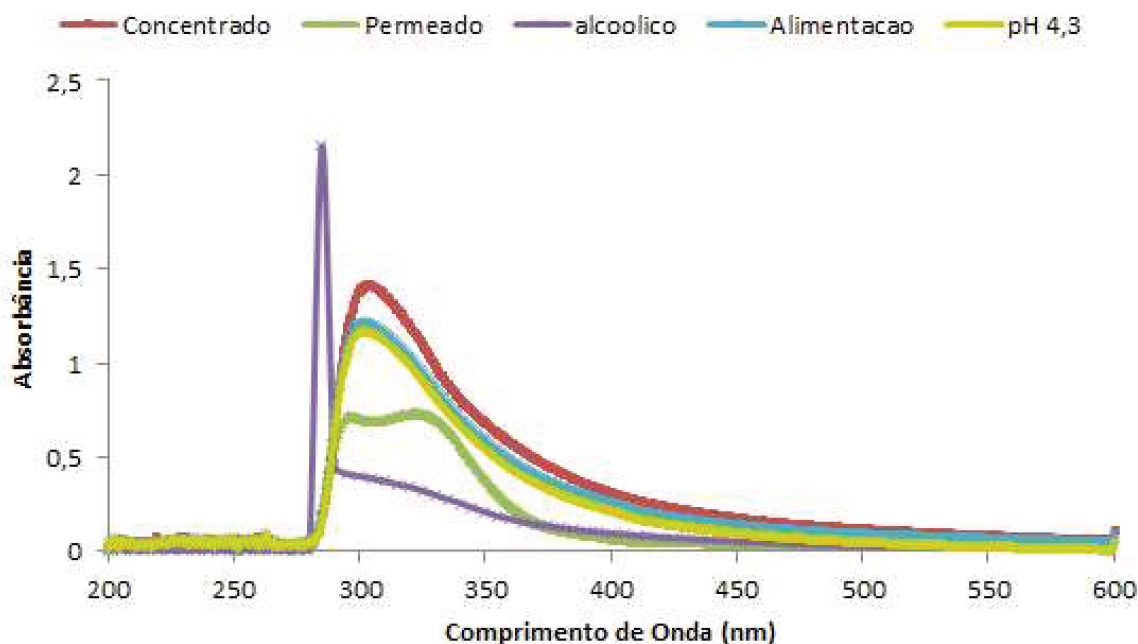


Figura 5.19. Espectrometria na região U.V.-visível dos produtos do processo de concentração com membranas, comparados com o extrato alcoólico e com o extrato aquoso sem alteração de pH.

Os flavonóides em geral apresentam o pico de absorção da luz ultravioleta na faixa de 270 e 330 nm, sendo que os extratos aquosos tendem a apresentar menor absorção que os extratos etanólicos (PARK et al., 1998). As amostras aquosas apresentaram um comportamento diverso da alcoólica devido possivelmente devido à menor quantidade de flavonóides apolares, conforme demonstrado na análise por cromatografia líquida de alta eficiência. Além disso, o produto permeado apresentou um pico de menor intensidade quando comparado com as outras amostras, devido à baixa concentração de compostos fenólicos em geral.

5.6.4. Distribuição do tamanho de partículas

Nos processos de concentração por membranas, o transporte das partículas através da superfície da membrana e da camada polarizada é diretamente afetado pelo

tamanho da partícula, graças à sua influência no transporte através da membrana e nas forças de arraste do permeado (BELFORT et al., 1994). Por isso, foi feita uma avaliação da distribuição do tamanho de partículas, conforme metodologia descrita no item 4.5.9, para possibilitar um melhor entendimento do comportamento dos extratos após a alteração de pH, alteração do solvente e após o processo de concentração por membranas. Os resultados encontram-se na Figura 5.20.

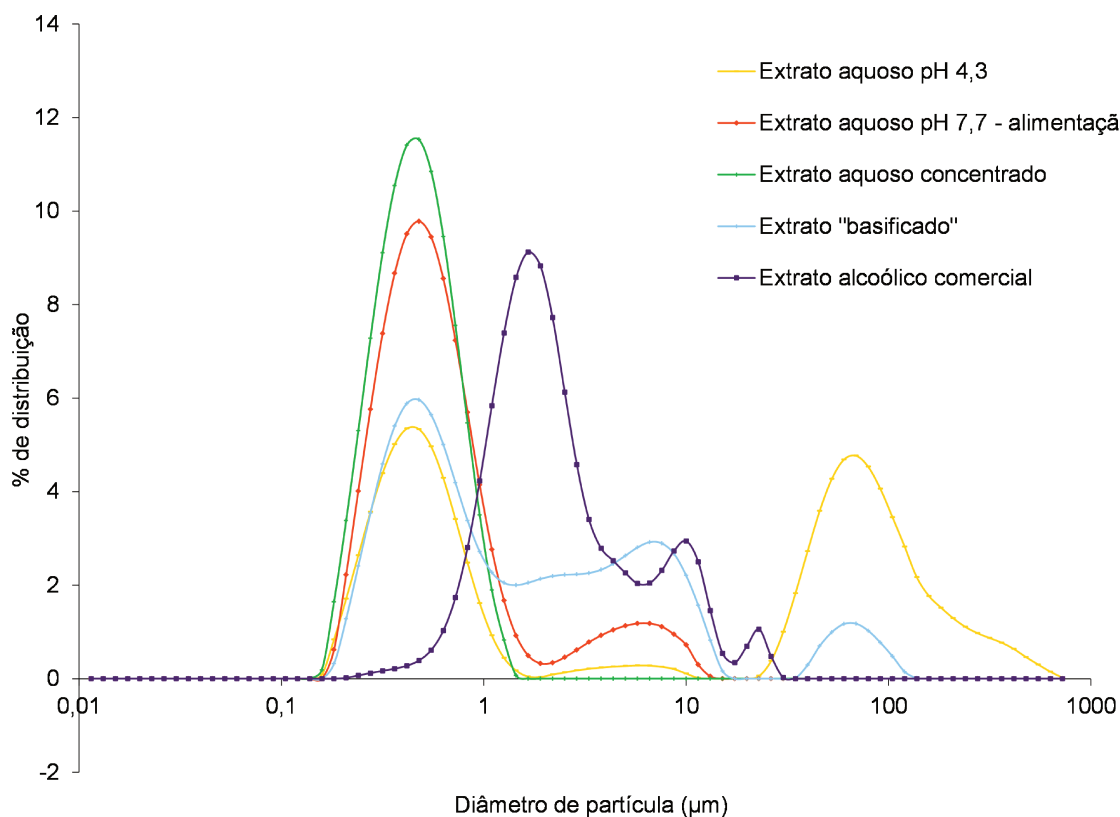


Figura 5.20. Distribuição do tamanho de partículas dos extratos de própolis.

Através da análise dos resultados, pode-se perceber que todos os extratos participantes do processo com membranas (alimentação e concentrado) apresentaram o mesmo diâmetro médio de partículas, variando apenas na porcentagem de distribuição dessas partículas no meio. Esse fato é decorrência justamente do processo de concentração,

uma vez que a retirada do solvente aumenta a proporção dos compostos de maior diâmetro na solução. Não foi possível a avaliação da distribuição do tamanho de partículas do permeado do processo, pois a amostra se apresentava muito diluída, impossibilitando a detecção pelo equipamento.

O conhecimento do tamanho médio das partículas é de fundamental importância para a escolha do processo de concentração por membranas, já que uma das definições dos processos provêm do tamanho de partícula a ser separada. Os resultados obtidos comprovam que a nanofiltração foi a melhor escolha para o processamento de extratos de própolis.

O extrato aquoso em pH 4,3 apresentou partículas de tamanho superior às aquelas obtidas para a alimentação (pH 7,7) que podem estar relacionadas com interações moleculares rompidas em pHs mais básicos. Esta mudança também pode ser decorrência de um processo de degradação sofrido pelos compostos fenólicos quando submetidos a mudanças bruscas de pH. A hidrólise dos polifenóis pode ocasionar a mudança da forma glicosilada para a forma aglicona dos compostos (ROSTAGNO et al., 2009). Apesar da mudança estrutural, o composto ainda é definido como um polifenol por apresentar a estrutura característica (anel aromático ligado a um grupo hidroxila), sendo ainda detectado pelos métodos espectrofotométricos de determinação. Esta situação pode ser confirmada pela análise dos resultados obtidos pelo teste feito com um extrato basificado a 7,7 após a centrifugação da própolis (amostra extrato “basificado”). Neste resultado, verificou-se a presença do pico na casa em 70 μm igual àquele obtido para a amostra em pH 4,3 mas em menor proporção, evidenciando uma hidrólise dos compostos glicosilados que já estavam extraídos. A Figura 5.21 mostra o exemplo de um flavonóide aglicona (quercetina) e suas formas glicosiladas.

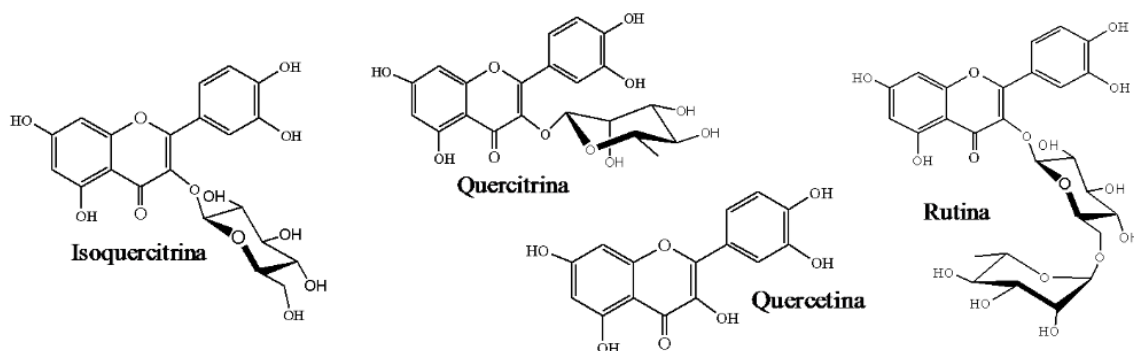


Figura 5.21. Estrutura da quercetina (aglicona) e suas formas glicosiladas.

O extrato alcoólico apresentou um comportamento totalmente diferente dos anteriores, evidenciando que o álcool extrai diferentes compostos da própolis, quando comparado com a extração aquosa, conforme pode ser visualizado nos resultados da cromatografia líquida de alta eficiência (Figura 5.18). Azema et al. (2006) verificaram o mesmo comportamento na distribuição do tamanho de partículas do álcool frente a água usados como solventes de partículas minerais, explicando que o álcool é responsável por uma maior aglomeração dos compostos extraídos.

5.6.5. Atividade antimicrobiana

A atividade antimicrobiana foi testada para os extratos aquosos em pH 4,3 e em pH 7,7 (alimentação), concentrado e permeado do processo de concentração, extrato alcoólico comercial e álcool 80% usado como controle negativo da amostra alcoólica. O permeado do processo, devido à sua baixa concentração de compostos funcionais foi considerado controle negativo das amostras aquosas em pH alcalino. A análise do controle negativo foi efetuada para se descartar as possibilidades do solvente ser responsável pela atividade antimicrobiana do extrato. As Tabelas 5.18 a 5.23 indicam o tamanho do halo de inibição de crescimento promovido por cada extrato de própolis para *Staphylococcus aureus*, *Salmonella choleraesuis*, *Bacillus cereus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida tropicalis* e *Aspergillus flavus*, respectivamente.

Tabela 5.18. Atividade antimicrobiana dos extratos aquosos e etanólico de própolis sobre *Staphylococcus aureus*

Amostra	Zona de inibição do crescimento microbiano
	(mm)*
Álcool (controle)	1,32 ± 0,97
Extrato alcoólico(pH 4,3)	4,85 ± 0,85
Extrato aquoso (pH 4,3)	0,00 ± 0,00
Extrato aquoso (pH 7,7)	0,00 ± 0,00
Extrato aquoso concentrado(pH 7,7)	2,40 ± 0,39
Permeado aquoso (pH 7,7)	0,00 ± 0,00

População inicial de *S. aureus* padronizada em 1.04×10^7 UFC/mL

*halo medido a partir do final do disco até o final do crescimento, obtido a partir da média de 5 repetições.

Tabela 5.19. Atividade antimicrobiana dos extratos aquosos e etanólico de própolis sobre *Salmonella cholerasuis*

Amostra	Zona de inibição do crescimento microbiano
	(mm)*
Álcool (controle)	0,20 ± 0,40
Extrato alcoólico(pH 4,3)	0,90 ± 0,40
Extrato aquoso (pH 4,3)	0,00 ± 0,00
Extrato aquoso (pH 7,7)	0,00 ± 0,00
Extrato aquoso concentrado(pH 7,7)	0,00 ± 0,00
Permeado aquoso (pH 7,7)	0,00 ± 0,00

População inicial de *S. cholerasuis* padronizada em 6.0×10^6 UFC/mL

*halo medido a partir do final do disco até o final do crescimento, obtido a partir da média de 5 repetições.

Tabela 5.20. Atividade antimicrobiana dos extratos aquosos e etanólico de própolis sobre

Bacillus cereus

Amostra	Zona de inibição do crescimento microbiano
	(mm)*
Álcool (controle)	0,00 ± 0,00
Extrato alcoólico(pH 4,3)	0,00 ± 0,00
Extrato aquoso (pH 4,3)	0,00 ± 0,00
Extrato aquoso (pH 7,7)	0,00 ± 0,00
Extrato aquoso concentrado(pH 7,7)	0,00 ± 0,00
Permeado aquoso (pH 7,7)	0,00 ± 0,00

População inicial de *B. cereus* padronizada em $7,8 \times 10^6$ UFC/mL

*halo medido a partir do final do disco até o final do crescimento, obtido a partir da média de 5 repetições.

Tabela 5.21. Atividade antimicrobiana dos extratos aquosos e etanólico de própolis sobre

Pseudomonas aeruginosa

Amostra	Zona de inibição do crescimento microbiano
	(mm)*
Álcool (controle)	0,00 ± 0,00
Extrato alcoólico(pH 4,3)	0,00 ± 0,00
Extrato aquoso (pH 4,3)	0,00 ± 0,00
Extrato aquoso (pH 7,7)	0,00 ± 0,00
Extrato aquoso concentrado(pH 7,7)	0,00 ± 0,00
Permeado aquoso (pH 7,7)	0,00 ± 0,00

População inicial de *P. aeruginosa* padronizada em $1,04 \times 10^7$ UFC/mL

*halo medido a partir do final do disco até o final do crescimento, obtido a partir da média de 5 repetições.

Tabela 5.22. Atividade antimicrobiana dos extratos aquosos e etanólico de própolis sobre *Candida tropicalis*.

Amostra	Zona de inibição do crescimento microbiano
	(mm)*
Álcool (controle)	0,00 ± 0,40
Extrato alcoólico(pH 4,3)	1,00 ± 0,01
Extrato aquoso (pH 4,3)	0,00 ± 0,00
Extrato aquoso (pH 7,7)	0,00 ± 0,00
Extrato aquoso concentrado(pH 7,7)	0,00 ± 0,00
Permeado aquoso (pH 7,7)	0,00 ± 0,00

População inicial de *C. tropicalis* padronizada em $8,4 \times 10^6$ UFC/mL

*halo medido a partir do final do disco até o final do crescimento, obtido a partir da média de 5 repetições.

Tabela 5.23. Atividade antimicrobiana dos extratos aquosos e etanólico de própolis sobre *Aspergillus flavus*.

Amostra	Zona de inibição do crescimento microbiano
	(mm)*
Álcool (controle)	1,60 ± 0,40
Extrato alcoólico(pH 4,3)	5,00 ± 0,01
Extrato aquoso (pH 4,3)	0,00 ± 0,00
Extrato aquoso (pH 7,7)	0,50 ± 0,01
Extrato aquoso concentrado(pH 7,7)	1,80 ± 0,01
Permeado aquoso (pH 7,7)	0,10 ± 0,01

População inicial de *A. flavus* padronizada em $1,13 \times 10^6$ UFC/mL

*halo medido a partir do final do disco até o final do crescimento, obtido a partir da média de 5 repetições.

Foram analisadas as atividades antimicrobianas das amostras provenientes de extratos de própolis frente à seis microrganismos: dois gram positivos (*Staphylococcus aureus* e *Bacillus cereus*), dois gram negativos (*Salmonella cholerasuis* e *Pseudomonas aeruginosa*) e dois fungos (*Aspergillus flavus* e *Candida Tropicalis*). De acordo com os resultados expressos nas tabelas anteriores, pode-se perceber atividade antimicrobiana dos extratos de própolis frente a *Staphylococcus aureus*, *Salmonella cholerasuis*, *Candida Tropicalis* e *Aspergillus flavus*. O extrato alcoólico comercial foi o que apresentou maior atividade contra os microrganismos testados, para todas as amostras. Além disso, as bactérias gram positivas foram mais sensíveis aos compostos da própolis que as gram negativas, e os fungos também foram susceptíveis aos extratos de própolis. Estes resultados estão de acordo com a literatura, uma vez que as bactérias Gram positivas costumam ser mais susceptíveis à atividade antimicrobiana dos extratos de própolis que as Gram negativas (FERNANDES JR. et al., 2001). Os extratos aquosos só apresentaram atividade frente ao *Staphylococcus aureus* e *Aspergillus flavus*, sendo que a amostra de extrato concentrado foi aquela com maior valor de inibição, provavelmente devido ao fato de ser o extrato aquoso com maior concentração de flavonóides e compostos fenólicos. Silva et al. (2006) observaram que o conteúdo total de flavonóides e compostos fenólicos em uma amostra de própolis é diretamente responsável pela atividade biológica desse extrato, sendo que ocorrem efeitos sinérgicos entre os diversos compostos presentes na própolis; dessa forma a atividade antimicrobiana da própolis é variável em relação à região e estação de sua coleta.

Os extratos de própolis alcoólicos possuem atividade antimicrobiana conhecida, mas que pode variar de acordo com a região e época do ano da coleta (KARTAL et al., 2003; LU et al, 2005). Além disso, o efeito antibacteriano é também influenciado pela temperatura e pH do extrato alcoólico, atingindo um valor ótimo a 37°C e pH 5,0, ou seja, sem adição de ácido ou base durante a extração (LU et al, 2005).

Choi et al. (2006) avaliaram a susceptibilidade de diversos microrganismos ao extrato etanólico de própolis proveniente da Coreia e do Brasil e verificaram que todas as amostras apresentaram atividade contra *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*,

Salmonella typhimurium e *Candida albicans*, enquanto que *Pseudomonas aeruginosa* não foi inibida por nenhum dos extratos testados. Estes resultados estão de acordo com o presente trabalho, uma vez que as mesmas famílias de microrganismos foram susceptíveis aos extratos etanólicos.

Park et al. (1998) testaram a atividade antimicrobiana de extratos de própolis em diferentes proporções de água e álcool como solvente. Ao se utilizar água pura ou adicionada de 10 ou 20% de etanol, os extratos não apresentaram atividade antimicrobiana, sendo que o melhor resultado para atividade ocorreu ao se trabalhar com etanol 80% como solvente, formando um halo de inibição de 1,5mm. Neste trabalho, o resultado obtido para extrato aquoso também apresentou diferença na atividade antimicrobiana em diferentes pHs, sendo que apenas no extrato concentrado em pH 7,7 houve a formação de halo de inibição do *S. aureus*. O extrato em pH 7.7 usado na alimentação do processo não apresentou atividade, provavelmente por não ter atingido a concentração mínima de inibição. Dessa forma, o extrato aquoso também pode atuar como um preservativo antimicrobiano como o extrato alcoólico, podendo ser aproveitado como um antibiótico natural. Através da comparação das atividades obtidas pelos extratos com os respectivos controles, pode-se notar que a combinação de substâncias presentes nos extratos que é responsável por grande parte da atividade, e não o solvente utilizado. A Figura 5.22 ilustra os halos de inibição formados pelos extratos com atividade antimicrobiana para o *S. Aureus*.

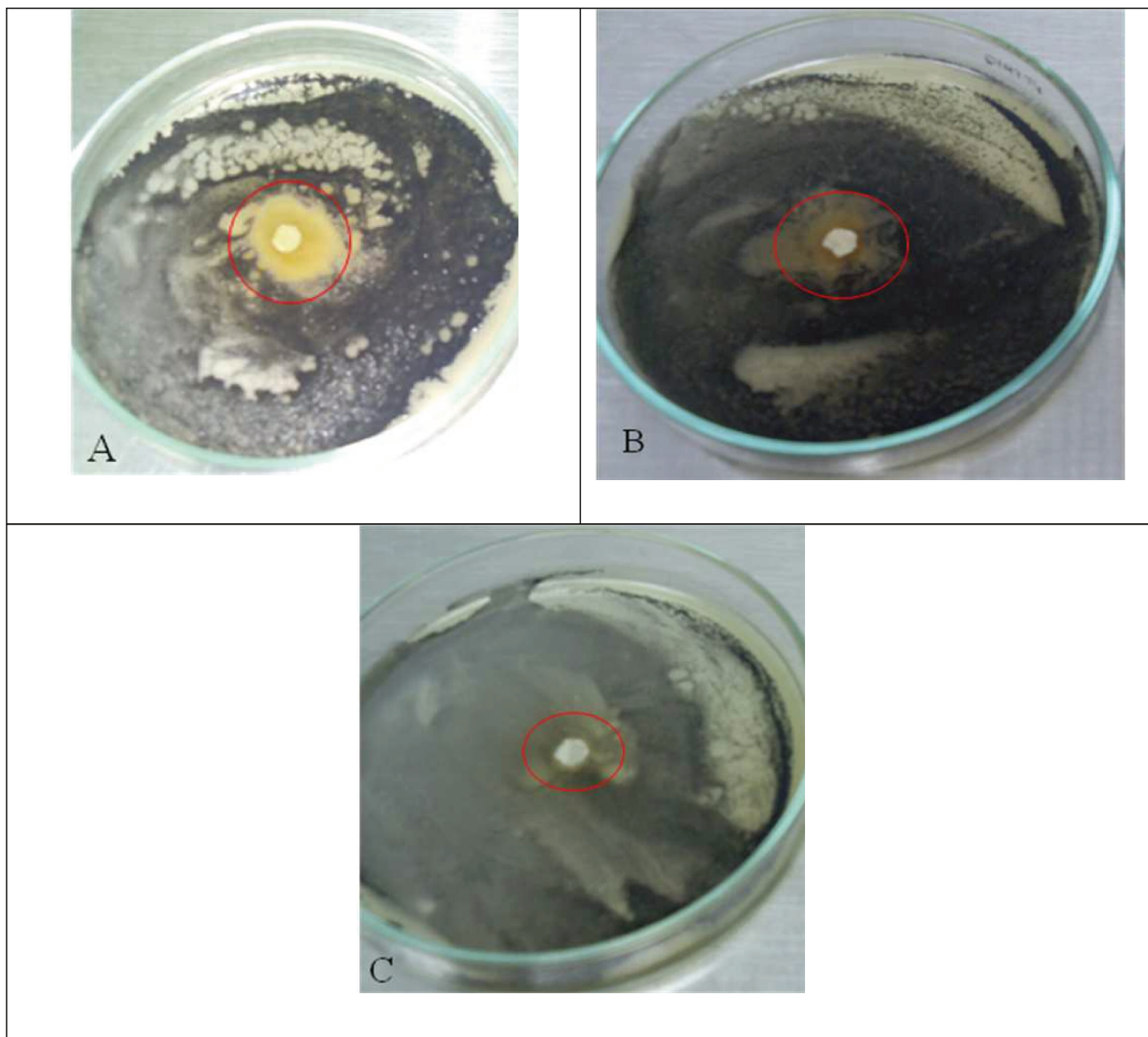


Figura 5.22. Inibição do crescimento de *Staphylococcus aureus* em diferentes extratos de própolis.

A= Extrato aquoso com pH 8,0; B= Extrato etanólico com pH 4,3; C= Etanol usado como controle.

Diversos mecanismos que explicam a atividade antimicrobiana da própolis têm sido relatados como a inibição da divisão celular, colapso do citoplasma e parede celular das bactérias, inibição da síntese protéica e inibição enzimática, como por exemplo a RNA-polimerase. Os compostos presentes na própolis também podem causar uma significativa redução na mobilidade bacteriana e alteração da permeabilidade iônica (TAKAISHI-

KIKUNI e SCHILCHER, 1994; MARCUCCI, 1995; KOO et al., 2002). SCAZZOCCHIO et al. (2006) verificaram que a produção de coagulase por *S. Aureus* foi totalmente suprimida e a produção de lipase foi fortemente reduzida pela presença de extrato etanólico de própolis.

5.6.6. Estudo da vida de prateleira dos extratos aquosos de própolis

As amostras obtidas do processo de concentração por membrana foram armazenadas por 90 dias em diferentes condições de temperatura: ambiente, 5°C e 40°C para a verificação da estabilidade dos extratos sob diferentes condições de armazenagem. No primeiro mês de armazenamento, foram retiradas alíquotas de cada uma das amostras a cada sete dias para análise dos flavonóides e compostos fenólicos, conforme itens 4.3.2 e 4.3.3 Após esse período, as amostras foram avaliadas a cada quinze dias. As Figuras 5.23 a 5.26 mostram todas as amostras no início do período de armazenamento e após 90 dias a 5°C, 22°C e a 40°C, respectivamente.

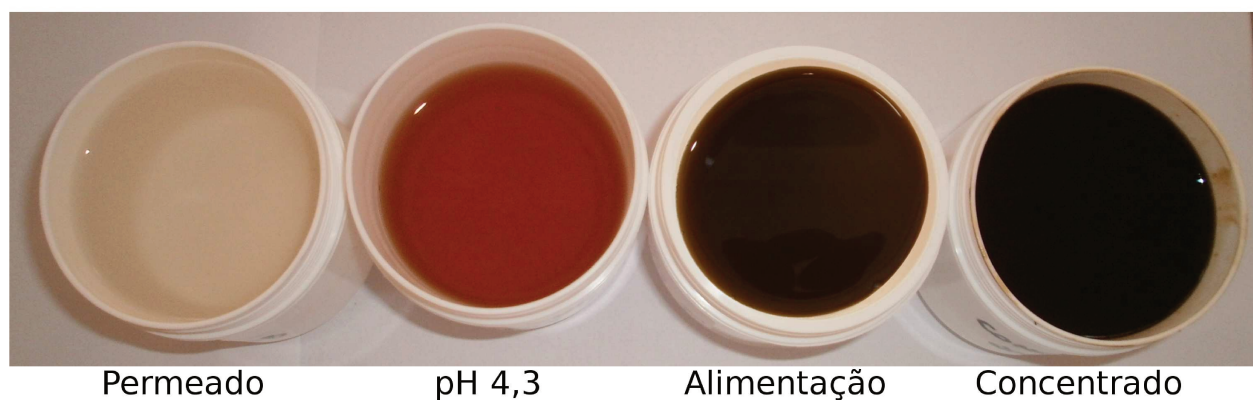


Figura 5.23. Extratos de própolis antes do armazenamento para avaliação da vida de prateleira.

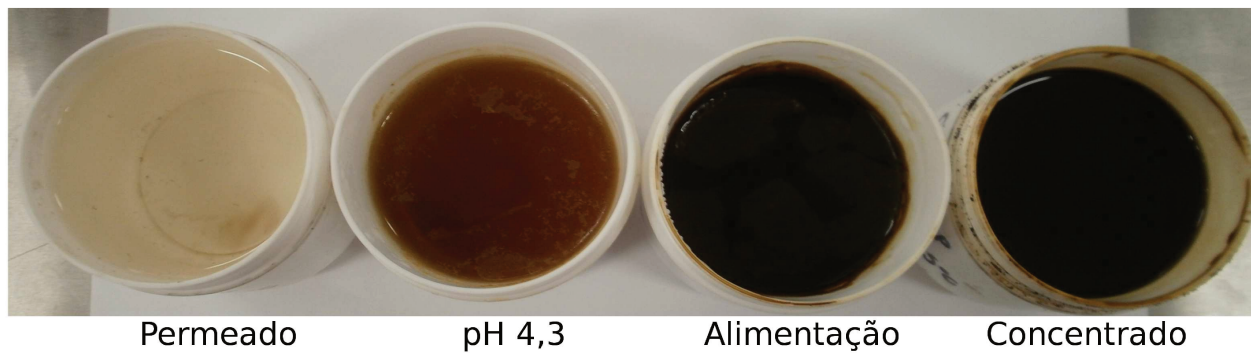


Figura 5.24. Extratos de própolis após o armazenamento por 90 dias a 5°C para avaliação da vida de prateleira.

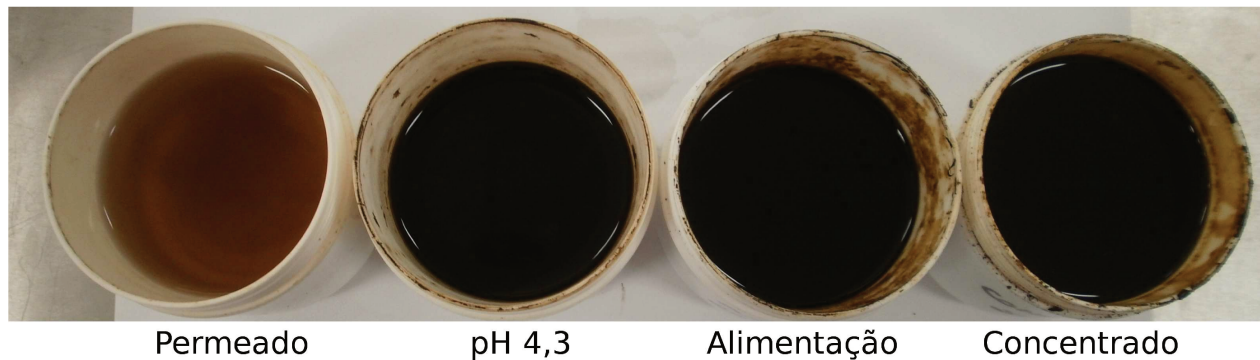


Figura 5.25. Extratos de própolis após o armazenamento por 90 dias a 22°C para avaliação da vida de prateleira.

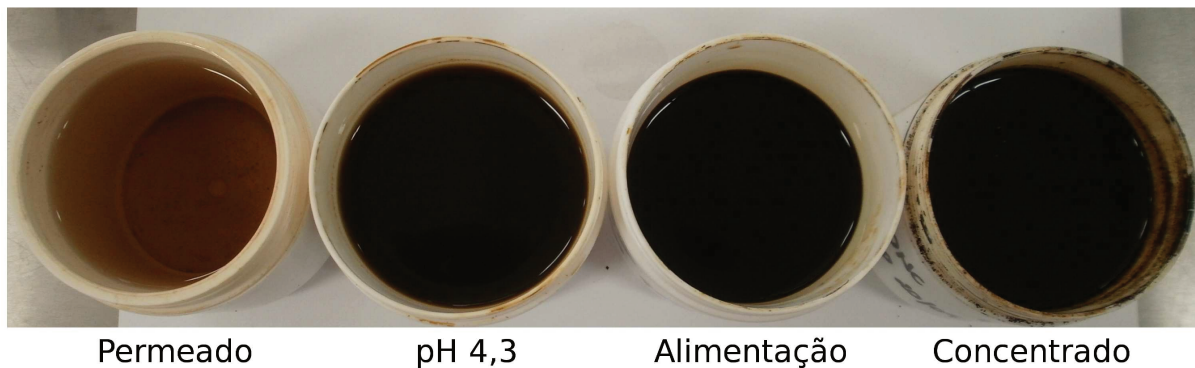


Figura 5.26. Extratos de própolis após o armazenamento por 90 dias a 40°C para avaliação da vida de prateleira.

Através da análise de todos os produtos após o armazenamento, foi possível observar um escurecimento de todas as amostras quando estocadas a 40°C ou a 22°C .

Além disso, houve a formação de aglomerados nos ensaios submetidos a temperaturas elevadas (40°C), podendo ser uma evidência da degradação de compostos pela temperatura. Essa degradação também pode ser a explicação para a mudança de cor das amostras. Os produtos mantidos sob refrigeração preservaram uma aparente integridade em relação à cor e características visuais dos extratos. As Figuras 5.27 e 5.28 representam o comportamento do teor de compostos fenólicos e de flavonóides, respectivamente, para os extratos de própolis armazenados a 22°C por 90 dias; as Figuras 5.29 e 5.30 representam o mesmo comportamento para os extratos armazenados a 5°C e as Figuras 5.31 e 5.32 para aqueles estocados a 40°C.

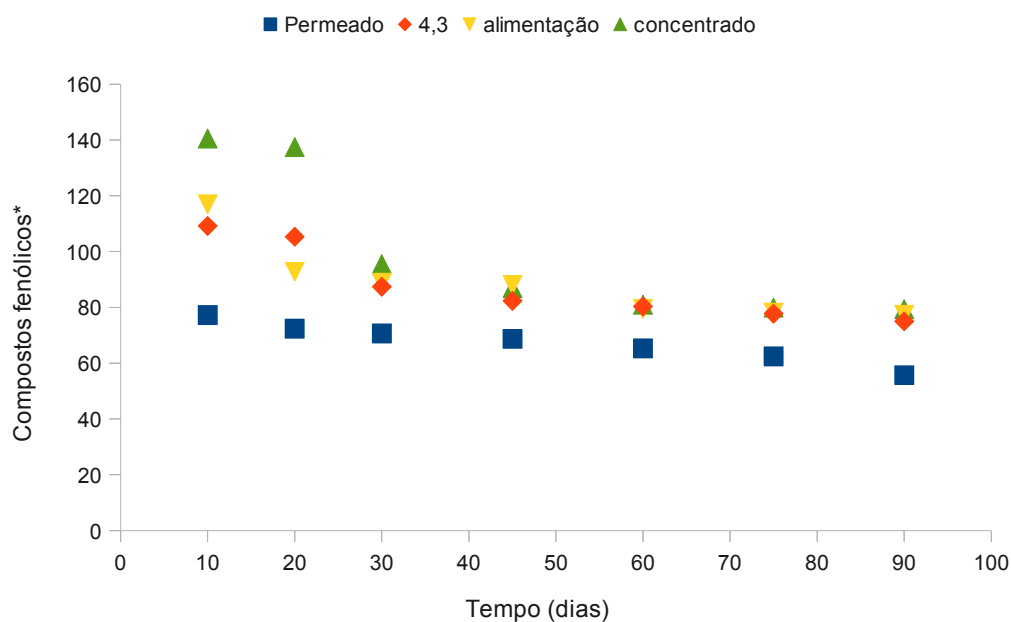


Figura 5.27. Teor de polifenóis ao longo de 90 dias de estocagem a 22°C.
(*equivalentes de ácido gálico)

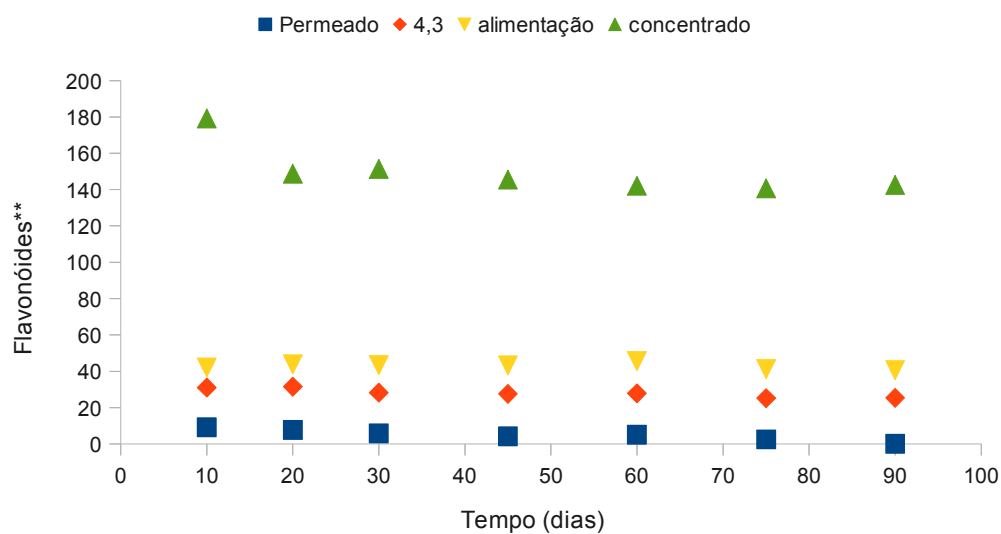


Figura 5.28. Teor de flavonóides ao longo de 90 dias de estocagem a 22°C
(*equivalentes de quercetina)

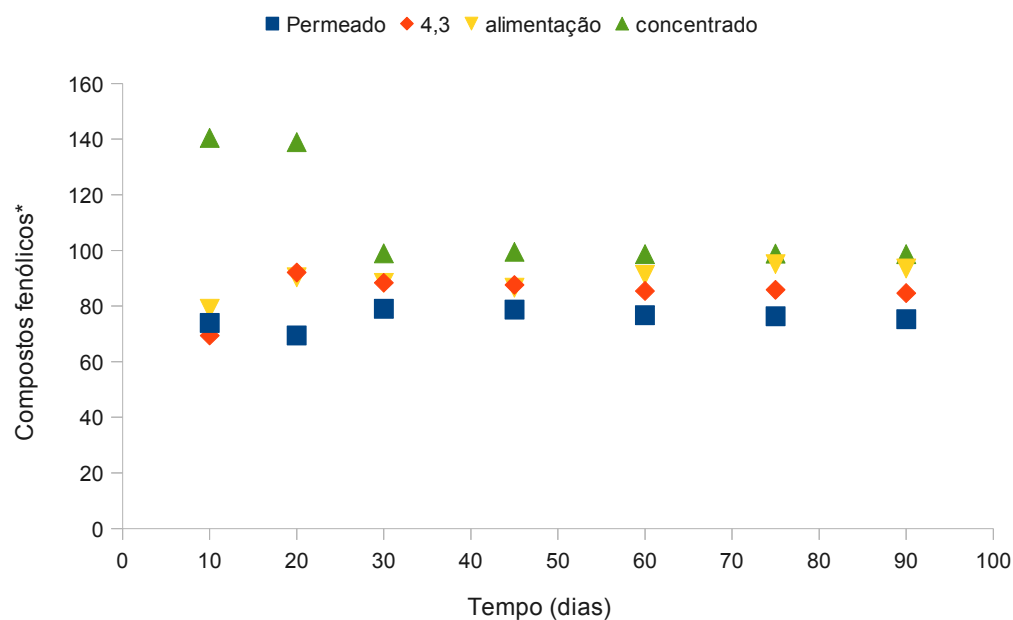


Figura 5.29. Teor de compostos fenólicos ao longo de 90 dias de estocagem a 5°C
(*equivalentes de ácido gálico)

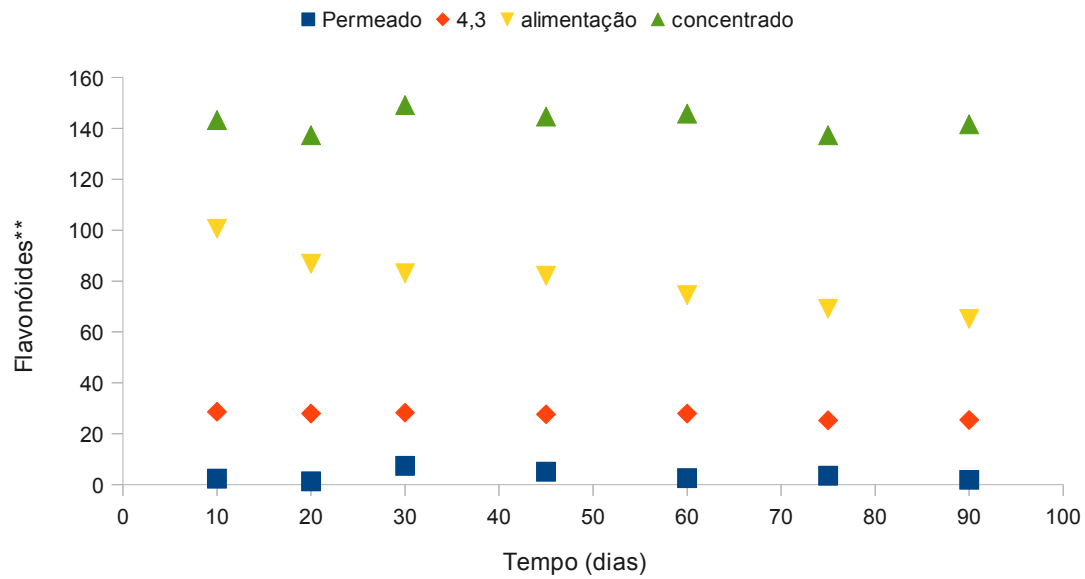


Figura 5.30. Teor de flavonóides ao longo de 90 dias de estocagem a 5°C
(*equivalentes de quercetina)

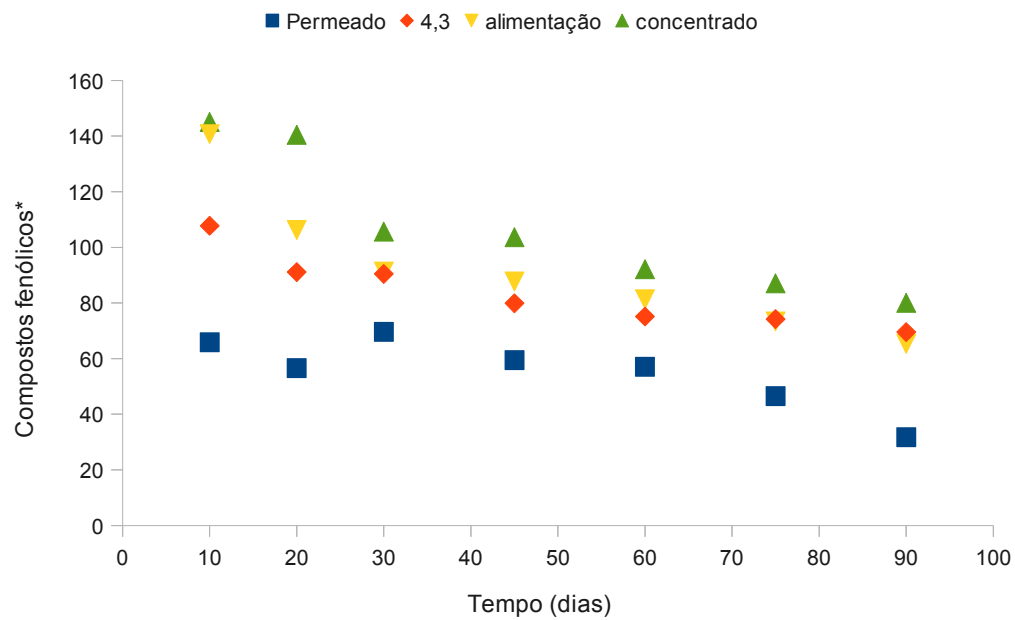


Figura 5.31. Teor de compostos fenólicos ao longo de 90 dias de estocagem a 40°C
(*equivalentes de ácido gálico)

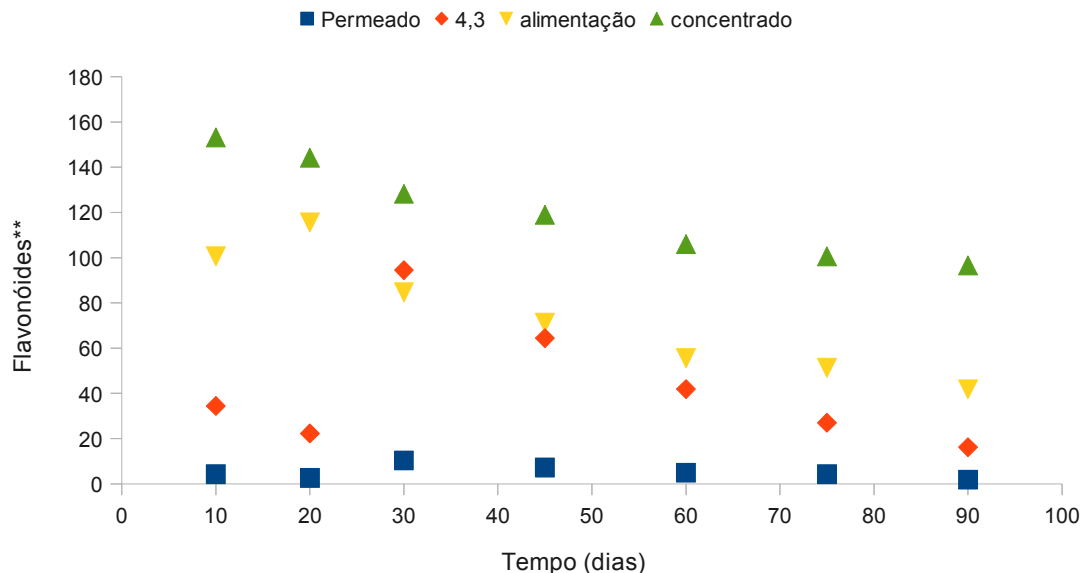


Figura 5.32. Teor de flavonóides ao longo de 90 dias de estocagem a 40°C (*equivalentes de quercetina)

O teor de polifenóis foi decrescente ao longo do tempo de estocagem do extrato de própolis, em todas as condições estudadas. Houve uma variação no período necessário para estabilização do conteúdo total de polifenóis em relação à temperatura de estocagem de cada amostra. À temperatura ambiente, houve uma tendência de estabilização a partir de 60 dias de armazenamento (Figura 5.27), enquanto a 5°C a estabilização teve início em 30 dias de armazenagem (Figura 5.29). Os produtos armazenados a 40°C não apresentaram tendência de estabilização, indicando que os compostos fenólicos se degradaram durante todo o período de estudo (Figura 5.31). Dessa forma, conclui-se que os compostos fenólicos presentes nos extratos aquosos de própolis são susceptíveis ao tempo e à temperatura de armazenagem, sendo que à temperatura de refrigeração ocorre menor perda destes.

Os flavonóides se mostraram estáveis em relação ao tempo de armazenagem à temperatura ambiente (Figura 5.28) e sob refrigeração (Figura 5.30), já que o teor desses compostos foi praticamente constante com o tempo. Em temperaturas elevadas (Figura 5.32) houve um decréscimo no teor de flavonóides dos extratos, indicando degradação pela temperatura. Malaspina e Palma (2000) enfatizam que os principais problemas da própolis

aquosa são a sua estabilidade e a facilidade de contaminação dos extratos obtidos.

Estes dados são importantes para a definição das melhores condições de armazenagem e transporte do extrato aquoso de própolis. O extrato alcoólico possui um prazo de validade de 2 anos (Informação do fabricante – Lambertucci) e não possui indicações de melhores condições de estocagem, indicando que é estável em todas as condições. As características funcionais do extrato alcoólico de própolis, como antimicrobiana e antifúngica garantem a estabilidade do produto com o tempo. Estudos anteriores demonstraram que essas características permanecem inalteradas com a mudança de temperatura do extrato etanólico de própolis (KAWAKITA et al., 2009).

6. Conclusões

- Para o preparo dos extratos de própolis através da alteração de pH foi necessária a utilização de um período de cinco dias para a obtenção do melhor processo de extração.
- O uso de pHs alcalinos produziu extratos aquosos com maiores teores de flavonóides e compostos fenólicos, no entanto em valores inferiores àquele do extrato etanólico.
- A maior extração dos compostos funcionais propiciou uma maior atividade antioxidante e antimicrobiana, e não proporcionou grandes alterações na densidade e viscosidade do produto.
- Verificou-se que não houve uma diminuição acentuada do fluxo de permeado durante o processo de nanofiltração dos extratos em sistema fechado, evidenciando uma baixa ocorrência de incrustação na membrana e pouca formação de camada polarizada.
- As curvas de fluxo de permeado foram similares às curvas típicas dos processos de concentração por membranas, sendo que o fluxo foi proporcional à temperatura e à pressão do processo.
- A utilização de temperaturas mais altas (57°C) durante o processo de concentração por membranas gerou um produto concentrado com menores concentrações de flavonóides e compostos fenólicos. O permeado deste processamento também apresentou pouca quantidade desses compostos, evidenciando que a temperatura pode ter degradado os compostos funcionais da própolis.
- Em geral, houve uma alta taxa de retenção da membrana em relação aos compostos funcionais da própolis, sendo que houve uma concentração maior de compostos fenólicos do que de flavonóides nos permeados.
- O aumento da viscosidade dos produtos concentrados foi de, no máximo, 12%, operando com um fator de concentração igual a 4. Dessa

forma, pode-se considerar que a viscosidade não seria um fator limitante para se operar com fatores de concentração maiores.

- A modelagem matemática utilizada foi eficiente em prever o processo de concentração do extrato de própolis e através dela foi possível definir que as maiores resistências no processo foram ocasionadas pela membrana e por incrustação.
- Através da análise da estabilidade do extrato aquoso de própolis, verificou-se que os flavonóides foram estáveis ao longo do tempo de armazenamento tanto em temperatura ambiente como sob refrigeração, mas foi susceptível à degradação em temperaturas mais altas. Os compostos fenólicos foram mais sensíveis em todas as condições, ocorrendo uma queda no seu conteúdo ao longo do tempo.

7. Sugestões para trabalhos futuros

- Avaliar a composição centesimal e qualificar os compostos extraídos através de espectrofotometria de massas dos extratos de própolis preparados em pHs alcalinos;
- Estudar outras condições de preparo dos extratos, variando-se as condições de tempo, temperatura e agitação durante a extração avaliando-se a sua influência na extração dos flavonóides e dos compostos fenólicos;
- Verificar as condições da membrana antes e depois do processamento, analisando-se sua morfologia e verificando-se incrustação, estabilidade e integridade da mesma;
- Testar o uso de emulsificantes em diferentes concentrações para realização da extração da própolis em meio aquoso e analisar a sua influência durante o processo de concentração dos extratos.
- Estudar o processo de nanofiltração de própolis proveniente de outras regiões do país, como a própolis vermelha do Nordeste.

8. Bibliografia

ADELMANN, J. **Própolis: Variabilidade Composicional, Correlação com a flora e bioatividade antimicrobiana/antioxidante**. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Curitiba: Universidade Federal do Paraná, 185 p. 2005.

AGA, H.; SHIBUYA, T.; SUGIMOTO, T.; KURIMOTO, M.; NAKAJIMA, S. Isolation and identification of antimicrobial compounds in Brazilian propolis, **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, v.58, p.945-946, 1994.

AHN, M-R.; KUMAZAWA, S.; USUI, Y.; NAKAMURA, J.; MATSUKA, M.; ZHU, F.; NAKAYAMA, T. Antioxidant activity and constituents of propolis collected in various areas of China. **Food Chemistry**. v. 101, p. 1383-1392, 2007.

AKOWUAH, G.A.; MARIAM, A.; CHIN, J.H. The effect of extraction temperature on total phenols and antioxidant activity of *Gynura procumbens* leaf. **Pharmacognosy Magazine**, v.5, p.81-85, 2009

ALENCAR, S.M. **Estudo Fitoquímico da Origem Botânica da Própolis e Avaliação da Composição Química de Mel de *Apis mellifera* Africanizada de Diferentes Regiões do Brasil**. Tese de Doutorado - Faculdade de Engenharia de Alimentos. Campinas: Universidade Estadual de Campinas. 120p. 2002.

ALENCAR, S.M.; OLDONI, T.L.C.; CASTRO, M.L.; CABRAL, I.S.R.; COSTA-NETO, C.M.; CURY, J.A.; ROSALEN, P.L.; IKEGAKI, M. Chemical composition and biological activity of a new type of Brazilian propolis: Red propolis. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 113, p. 278-283, 2007.

ALVAREZ, M.V.; PONCE, A.G.; MOREIRA, M.R. Antimicrobial efficiency of chitosan coating enriched with bioactive compounds to improve the safety of fresh cut broccoli. **LWT - Food Science and Technology**, v. 50, p. 78-87, 2013.

ALVES, T.L. **Estudo da formação de incrustações inorgânicas em membranas de nanofiltração utilizadas em processos de dessulfatação**. 150p. Tese (Doutorado em em Ciência dos Materiais e Metalurgia). Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, Departamento de Ciência dos Materiais e Metalurgia. 2006.

AMJAD, Z. **Reverse Osmosis – Membrane Technology, Water Chemistry, and Industrial Applications**. Chapman & Hall, New York, 1993.

ARAGÃO, V. C. **Concentração dos compostos bioativos da polpa de caju através da tecnologia de separação por membranas**. 130p. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2010.

AZEMA, N. Sedimentation behaviour study by three optical methods – granulometric end electrophoresis measurements, dispersion optical analyzer. **Powder Technology**, v. 165, p. 133-139, 2006.

BANKOVA, V. Chemical diversity of propolis and the problem of standardization. **Journal of Ethnopharmacology**, v.100 p. 114–117, 2005.

BANKOVA, V.; BOUDOUROVA-KRASTEVA, G.; POPOV, S.; SFORCIN, J.M.; FUNARI, S.R.C. Seasonal variations of the chemical composition of Brazilian propolis. **Apidologie**,

v. 29, p. 361-367, 1998.

BANKOVA, V.; DYULGEROV, A.; POPOV, S.; EVSTATIEVA, L.; KULEVA, L.; PUREB, O. & ZAMJANSAN, Z. Propolis produced in Bulgaria and Mongolia: phenolic compounds and plant origin. **Apidologie** **23**: 79-85, 1992.

BANSKOTA, A. H.; TEZUKA, Y.; PRASAIN, J. K.; MATSUSHIGE, K.; SAIKI, I.; KADOTA, S. Chemical constituents of Brazilian propolis and their cytotoxic activities. **Journal of Natural Products**, v. 61, p. 896-900, 1998.

BANVOLGYI, S.; KISS, I.; BEKASSY-MOLNAR, E.; VATAI, G. Concentration of red wine by nanofiltration. **Desalination**, v.198, p. 8-15, 2006.

BARATO, N.C. **Clarificação de suco de caju através da separação por membranas**. 134p. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2008.

BARREIROS, A.L.B.S.; DAVID, J.P.; DAVID, J.M. Estresse oxidativo: Relação entre geração de espécies reativas e a defesa do organismo. **Química Nova**, v.29, p.113- 123, 2006.

BARROS, S.T.D; MENDES, E.S; PERES, L. Influência da despectinização sobre ultrafiltração dos sucos de acerola e abacaxi. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 24, n.2, p.194 – 201, 2004.

BASTOS, E. M. A. F.; OLIVEIRA, V. D. C.; SOARES, A. E. E. Microscopic

characterization of the green propolis, produced in Minas Gerais State, Brazil. **Honeybee Science**, v. 21, p. 179-180. 2000.

BELFORT, G.; DAVIS, R.H.; ZYDNEY, A.L. Review—The behavior of suspensions and macromolecular solutions in crossflow microfiltration. **Journal of Membrane Science**. v. 96, p. 1–58, 1994.

BENZIE, I.; STRAIN, J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: The FRAP assay. **Analytical Biochemistry**, v. 239, p. 70-76, 1996.

BITTER, J. G. A., **Transport Mechanisms in Membrane Separation Processes. Reverse Osmosis – Membrane Technology, Water Chemistry, and Industrial Applications.** Plenum Press, New York, 1991.

BOGDANOV, S. Propolis: Composition, Health, Medicine: A Review. **Bee Product Science**. Disponível em <<http://www.bee-hexagon.net/files/fileE/Health/PropolisBookReview.pdf>>. Acesso em 08/11/2012

BONVEHÍ, J. S.; COLL, F. V.; JORDÀ, R. E. The Composition, Active Components and Bacteriostatic Activity of Propolis in Dietetics. **Journal of American Oil Chemical Society**, v. 71, n.5, p. 529-532, 1993.

BOWEN, W. R. & WELFOOT, J. S. Predictive modeling of nanofiltration: membrane specification and process optimization. **Desalination**, v.147, p.197-203, 2002.

BRAINARD, D.H. Color Appearance and Color Difference Specification. In SHEVEL, S.K. **The Science of color**. Cap. 5, p. 191-213, 2003

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M.E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT - Food Science and Technology**, v.28, n.1, p.25-31, 1995.

BRASIL, MINISTÉRIO DA AGRICULTURA. Instrução normativa nº3 – ANEXO VI – Regulamento técnico para fixação de identidade e qualidade de própolis. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**. Brasília, 19 jan. 2001.

BURDOCK, G. A. Review of the biological properties and toxicity of the bee propolis. **Food and Chemical Toxicology**, v. 36, p. 347-363, 1998.

BURIOL, L.; FINGER, D.; SCHMIDT, E.M.; SANTOS, M.T.; ROSA, M.R.; QUINÁIA, S.P.; TORRES, Y.R.; SANTA, H.S.D.; PESSOA, C.; MORAES, M.O.; COSTA-LOTUFO, L.V.; FERREIRA, P.M.P.; SAWAYA, A.C.H.F.; EBERLIN, M.N. Composição química e atividade biológica de extrato oleoso de própolis: uma alternativa ao extrato etanólico. **Química Nova**. v.32, p. 296-302, 2009.

CEPA – Centro de Socioeconomia e planejamento agrícola. **Custo de produção – mel**. Disponível em <
http://cepa.epagri.sc.gov.br/agroindicadores/custos/custo08/ago08/Mel_implantacao.xls>
Acesso em 12/08/2009.

CHANG, E.-E.; YANG, S.-Y.; HUANG, C.-P.; LIANG, C.-H.; CHIANG, P.-C. Assessing

the fouling mechanisms of high-pressure nanofiltration membrane using the modified Hermia model and the resistance-in-series model. **Separation and Purification Technology**, v. 79, P. 329-336, 2011.

CHERYAN, M. **Ultrafiltration and microfiltration handbook**. CRC Press, New York, 1998.

CHETAN, S.; MALLESHI, N.G. Finger millet polyphenols: Optimization of extraction and the effect of pH on their stability. **Food Chemistry**. 105, 862-870, 2007.

CHOI, Y.M.; NOH, D.O.; CHO, S.Y.; SUH, H.J.; KIM, K.M.; KIM, J.M. Antioxidant and antimicrobial activities of propolis from several regions of Korea. **LWT- Food Science and Technology**. v. 39, p. 756-761, 2006.

CONIDI, C.; CASSANO, A.; DRIOLI, E. Recovery of phenolic compounds from orange press liquor by nanofiltration. **Food and Bioproducts Processing**. v.90, p. 867-874, 2012.

CONSTENLA, D. T; LOZANO, J. E. Hollow fibre ultrafiltration of apple juice: macroscopic approach.. **Lebensmittel wissenschaft und technologie**, v. 30, p. 373-378,1997.

CVEK, J.; MEDIĆ-SARIĆ, M.; JASPRICA, I.; ZUBCIĆ, S.; VITALI, D.; MORNAR, A.; VEDRINA-DRAGOJEVIĆ, I.; TOMIĆ, S. Optimisation of an extraction procedure and chemical characterisation of Croatian propolis tinctures. **Phytochemical Analysis**. v. 18, p. 451-459, 2007.

DAWIDOWICZ, A.L.; WIANOWSKA, D.; OLSZOWY M. On practical problems in estimation of antioxidant activity of compounds by DPPH radical dot method (Problems in estimation of antioxidant activity). **Food Chemistry**. v. 131, p. 1037-1043, 2012.

DIAS, L.G.; PEREIRA, A.P.; ESTEVINHO, L.M. Comparative study of different Portuguese samples of propolis: Pollinic, sensorial, physicochemical, microbiological characterization and antibacterial activity, **Food and Chemical Toxicology**, v. 50, p. 4246-4253, 2012.

DÍAZ-REINOSO, B.; MOURE, A.; DOMÍNGUEZ, H.; PARAJÓ, J.C. Membrane concentration of antioxidants from *Castanea sativa* leaves aqueous extracts. **Chemical Engineering Journal**, v. 175, p. 95-102, 2011.

DÍAZ-REINOSO, B.; MOURE, A.; DOMÍNGUEZ, H.; PARAJÓ, J.C. Ultra- and nanofiltration of aqueous extracts from distilled fermented grape pomace. **Journal of Food Engineering**, v. 91, p. 587-593, 2009.

EBRAHIMZADEH, M.A.; NABAVI, S.M.; NABAVI, S.F.; BAHRAMIAN, F.; BEKHRADNIA, A.R. Antioxidant and free radical scavenging activity of *h. officinalis* l. var. *angustifolius*, v. *odorata*, b. *hyrcana* and c. *speciosum*. **Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences**. v.23, p. 29-34, 2010.

FERNANDES JR., A.; LEOMIL, L.; FERNANDES, A.A.H.; SFORCIN, J.M.. The antibacterial activity of propolis produced by *Apis mellifera* L. and Brazilian stingless bees. **Journal of Venomous Animals and Toxins** , v.7, n.2 , p. 173-182, 2001.

FIELD, R. W., WU, D., HOWELL, J. A., GUPTA, B. B. Critical flux concept for microfiltration fouling. **Journal of Membrane Science**, v.100, p.250 – 272, 1995.

FRANKEL, E.N.; MEYER, A.S. The problem of using one-dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.80, n.13, p.1925-1941, 2000.

FUNARI, C. S., FERRO, V. O. Análise de Própolis. **Ciencia e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, p. 171-178, 2006.

GARDNER, P.T., WHITE, T.A.C., MCPHAIL, D.B. & DUTHIE, G.G. The relative contributions of vitamin C, carotenoids and phenolics to the antioxidant potential of fruit juices. **Food Chemistry**. v.65, p.471-474, 2000.

GEANKOPOLIS, C. J. **Transport processes and Separation Processes Principles**. Pearson Education Inc, New Jersey, 2003.

GEENS, J.; BOUSSU, K.; VANDECASTEELE, C.; VAN DER BRUGGEN, B. Modelling of solute transport in non-aqueous nanofiltration. **Journal of Membrane Science**, v. 281, p. 139-148, 2006.

GIL, M.I., THOMAS-BARBERAN, F.A., HESS-PIERCE, B. & KADER, A.A. Antioxidant capacities, phenolic compounds, carotenoids, and vitamin C contents of nectarine, peach and plum cultivars from California. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 50, p.4976-4982, 2002.

GÓMEZ-CARAVACA, A.M.; GÓMEZ-ROMERO, M.; ARRÁEZ-ROMÁN, D.; SEGURA-CARRATERO, A.; FERNÁNDEZ-GUTIÉRREZ, A. Advances in the analysis of the phenolic compounds in products derived from bees. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 41, p. 1220-1234, 2006.

GRESSLER, L.T.; DA SILVA, A.S.; MACHADO, G.; ROSA, L.; DORNELES, F.; OLIVEIRA, M.S.; ZANETTE, R.A.; VARGAS, A.C.P.; MONTEIRO, S.G. Susceptibility of *Trypanosoma evansi* to propolis extract in vitro and in experimentally infected rats. **Research in Veterinary Science**, V. 93, P. 1314-1317, 2012.

GRUPO COLMÉIAS. **Estimativas de faturamento**. Disponível em <http://www.colmeias.org.br/arquivos/artigos/artigos_arquivos/altaprodutiviade.rtf> Acesso em 12/08/2009.

GÜLÇİN, I. Antioxidant activity of food constituents: an overview. **Archives of Toxicology**, v. 86, p. 345-391, 2012.

HABERT, A.C.; BORGES, C.P.; NOBREGA, R. **Processos de Separação por Membranas**. Ed. e-papers, Rio de Janeiro, 180p., 2006.

HARBOURNE, N.; JACQUIER, J.C.; O'RIORDAN, D. Optimization of the aqueous extraction conditions of phenols from meadowsweet (*Filipendula ulmaria* L.) for incorporation into beverages. **Food Chemistry**, v. 116, p. 722-727, 2009.

HERMIA, J. Constant pressure blocking filtration laws – Application to power-law non-Newtonian fluids, **Transactions of the Institution of Chemical Engineers**, v. 60, p. 183-

187, 1982.

HILAL, N.; AL-ZOUBI, H.; DARWISH, N. A.; MOHAMMAD, A. W.; ABU ARABI, M. A comprehensive review of nanofiltration membranes: treatment, pretreatment, modeling, and atomic force microscopy. **Desalination**, v.170, p.281-308, 2004

HUANG, D.; OU, B.; PRIOR, R. The chemistry behind antioxidant capacity assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 1841-1856, 2005.

JARUSUTTHIRAK, C.; MATTARAJ, S.; JIRARATANANON, R. Factors affecting nanofiltration performances in natural organic matter rejection and flux decline. **Separation and Purification Technology** v. 58, p. 68-75, 2007.

KACÁNIOVA M.; VUKOVIĆ, N.; CHLEBO, R.; HAŠČÍK,P.; ROVNÁ K.; CUBON, J.; DZUGAN, M.; PASTERNAKIEWICZ, A. The antimicrobial activity of honey, bee pollen loads and beeswax from Slovakia. **Archives of Biological Sciences**, v.64, p. 927-934, 2012.

KALOGEROPOULOS, N.; KONTELES, S.; TROULLIDOU, E.; MOURTZINOS, I.; KARATHANOS, V.T. Chemical composition, antioxidant activity and antimicrobial properties of propolis extracts from Greece and Cyprus. **Food Chemistry**. v. 116, p. 452-461, 2009.

KARTAL, M.; YILDIZ, S.; KAYA, S.; KURUCU, S.; TOPÇU,G. Antimicrobial activity of propolis samples from two different regions of Anatolia. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 86, p. 69-73, 2003.

KAWAKITA. E.T. ; SOUZA, EDISON ANTÔNIO DE ; LEIS, G.S. ; IKEDA, N.Y. ; GOMES, S.M.A. ; ORSI, R. O. Perfil microbiológico do extrato alcoólico de própolis mantido em duas temperaturas de armazenamento. **In: XXI Congresso de Iniciação Científica da UNESP**, 2009, São José do Rio Preto. Anais do Evento. 2009.

KIKUZAKI H.; NAKATANI N. Antioxidant effect of some ginger constituents. **Journal of Food Science**, v.58, p.1407-1410, 1993.

KIM, S.H.; PARK, J.D.; LEE, L.S.; HAN, D.S. Effect of pH on green tea extraction. **Korean Journal of Food Science and Technology**, v.31, p.1024-1028, 1999.

KIMOTO, T.; KOYA, S.; HINO, K.; YAMAMOTO, Y.; NOMURA, Y.; MICALLEF, M.J.; HANAYA, T.; ARAI, S.; IKEDA, M.; KURIMOTO, M. Renal carcinogenesis induced by ferric nitrilotriacetate in mice, and protection from it by Brazilian propolis and Artepilin C. **Pathology International**, v. 50, p. 679-689, 2000.

KONISHI, S., SAWAYA, A., CUSTÓDIO, A.R., CUNHA, I., SHIMIZU, M.,. Análise da influência de agentes solubilizantes na atividade antimicrobiana de extratos de própolis e de uma formulação de spray hidroalcoólico. **Mensagem Doce**. v.75, p.22–25 , 2004.

KOO, H. **Estudo dos Flavonóides da Própolis de *Apis mellifera* africanizada provenientes de diversas regiões do Brasil**. Dissertação de mestrado - Faculdade de Engenharia de Alimentos. Campinas: Universidade Estadual de Campinas. 67 p. 1996.

KOO, H.; ROSALEN, P.L.; CURY, J.A.; PARK, Y.K.; BOWEN, W.H. Effects of Compounds Found in Propolis on *Streptococcus mutans* Growth and on

Glucosyltransferase Activity. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 46, n. 5, p. 1302-1309. 2002.

KRELL, R. **Value-added products from beekeeping**. FAO agricultural services bulletin no. 124, 1996. Disponível em <<http://www.fao.org/docrep/w0076e/w0076e00.HTM>> Acesso em 28/01/2012.

KUMAZAWA, S.; HAMASAK, T.; NAKAYAMA, T. Antioxidant activity of various geographic origins. **Food Chemistry**, v. 84, p. 329 – 339, 2004.

LAORKO, A.; LI, Z.; TONGCHITPAKDEE, S.; CHANTACHUM, S.; YOURAVONG, W. Effect of membrane property and operating conditions on phytochemical properties and permeate flux during clarification of pineapple juice. **Journal of Food Engineering**, v.100, p.514–521, 2010.

LIANG, Y.; XU, Y. Effect of pH on cream particle formation and solids extraction yield of black tea. **Food Chemistry**. v.71, p.155-160, 2001.

LIMA, C.A.; OLIVEIRA, J.; PEDREIRA, A.J.L.A.; CASTIGLIONI, S.A.C. Estudo da viabilidade financeira da implantação de um apiário para a produção de própolis e mel. **XLIV Congresso da Sociedade Brasileira de Economia e Sociologia Rural**, 2006. Disponível em <http://www.sober.org.br/palestra/5/869.pdf>. Acesso em 24/08/09.

LONGHINI, R.; SHEILA, M.; RAKSA, S.; OLIVEIRA, A.C.P.; SVIDZINSKI, T.I.E.; FRANCO, S.L. Obtenção de extratos de própolis sob diferentes condições e avaliação de sua atividade antifúngica. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.17, p. 388-395, 2007.

LOTFY, M. Biological Activity of Bee Propolis in Health and Disease. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**. v.7, p. 22-31, 2006.

LU, L-C.; CHEN, Y-W.; CHOU, C-C. Antibacterial activity of propolis against *Staphylococcus aureus*. **International Journal of Food Microbiology**. v. 102, p. 213-220, 2005.

MALASPINA, O. ; PALMA, Mario Sergio . Própolis brasileira: Controle de Qualidade e Legislação. **In: Congresso Internacional de Propoleos**, 2000, Buenos Aires/AR. Congresso Internacional de propoleos, p. 18-20. 2000.

MARCUCCI, M. C. Propriedades biológicas e terapêuticas dos constituintes químicos da própolis. **Química Nova**, v. 19, p. 529-535, 1996.

MARCUCCI, M. C.; WOISKY, R. G.; SALATINO, A. Uso de Cloreto de alumínio na quantificação de flavonóides em amostras de própolis. **Mensagem Doce**, v. 46, 1998.

MARCUCCI, M.C.; FERRERES, F.; GARCÍA-VIGUERA, C.; BANKOVA, V.S.; DE CASTRO, S.L.; DANTAS, A.P.; VALENTE, P.H.M.; PAULINO, N. Phenolic Compounds from Brazilian Propolis with Pharmacological Activities, **Journal of Ethnopharmacology**, v.74, p.105-112, 2001

MAROULIS, Z.B.; SARAVACOS, G.D. **Food Process Design**. Marcel Dekker, Inc., New York, 2003. Cap. 10.

MAVRI, A.; ABRAMOVIČ, H.; POLAK, T.; BERTONCELJ, J.; JAMNIK, P.; MOŽINA,

S.S.; JERŠEK, B. Chemical Properties and Antioxidant and Antimicrobial Activities of Slovenian Propolis. **Chemistry & Biodiversity**, v. 9, p. 1545–1558, 2012.

MELLO, B. C. B. S., PETRUS, J.C.C., HUBINGER, M. D. Concentration of flavonoids and phenolic compounds in aqueous and ethanolic propolis extracts through nanofiltration. **Journal of Food Engineering**, v. 96, p. 533-539, 2010a.

MELLO, B. C. B. S., PETRUS, J.C.C., HUBINGER, M. D. Desempenho do processo de concentração de extratos de própolis por nanofiltração. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 30, p. 166-172, 2010b.

MELLO, B.C.B.S. **Concentração dos extratos de própolis por nanofiltração**. Dissertação de Mestrado - Faculdade de Engenharia de Alimentos. Campinas: Universidade Estadual de Campinas. 149 p. 2008.

MIGUEL, M.C., NUNES, S., DANDLEN, S.A., CAVACO, A.M., ANTUNES, M.D. Phenols and antioxidante activity of hydro-alcoholic extracts of propolis from Algarve, South of Portugal. **Food and Chemical Toxicology**, v.48, p.3418-3423, 2010.

MIRANDA, K. F. **Estudo da concentração de licopeno por ultrafiltração a partir de suco de melancia (*Citrullus vulgaris* Schard)**. Dissertação de Mestrado - Faculdade de Engenharia de Alimentos. Campinas: Universidade Estadual de Campinas. 175p. 2005.

MOHAMMADZADEH, S.; SHARRIATPANAHI, M.; HAMED, M.; AMANZADEH, Y.; EBRAHIMI, S.E.S.; OSTAD, S.N. Antioxidant power of Iranian propolis extract. **Food Chemistry**. v.103, p. 729-733, 2007.

MOLNÁR, Z., ÖZDEMİR, K., BÉKÁSSY-MOLNÁR, E. and VATAI, G., 2011. Valuable components concentration of raspberry marc extract by membrane filtration, **6th International CIGR Technical Symposium - Towards a Sustainable Food Chain: Food Process, Bioprocessing and Food Quality Management** 2011.

MOREIRA, L.; DIAS, L.G.; PEREIRA, J.A.; ESTEVINHO, L. Antioxidant properties, total phenols and pollen analysis of propolis samples from Portugal. **Food and Chemical Toxicology**. v. 46, p. 3482-3485, 2008.

MORENO, M.I.N.; ISLA, M.I.; SAMPIETRO, A.R.; VATTUONE, M.A. Comparison of the free radical-scavenging activity of propolis from several regions of Argentina. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 71, p. 109-114, 2000.

MOURA, F. F. **Contribuição das Propriedades Físico-Químicas e Biológicas da Própolis Produzida por *Apis mellifera* na Região Nordeste do Brasil**. Dissertação de Mestrado - Faculdade de Engenharia de Alimentos. Campinas: Universidade Estadual de Campinas. 69p. 2000.

MULDER, M. **Basic principles of membrane technology**. Kluwer Academic Publishers, 1991.

NAGAI, T.; INOUE, R.; INOUE, H.; SUZUKI, N. Preparation and antioxidant properties of water extract of propolis. **Food Chemistry**, v. 80, p. 29-33, 2003.

NAKAMURA, T.; OHTA, Y.; OHASHI, K.; IKENO, K.; WATANABE, R.; TOKUNAGA, K.; HARADA, N. Protective effect of Brazilian propolis against hepatic oxidative damage

in rats with water-immersion restraint stress. **Phytotherapy Research**, v. 26, p. 1482-1489, 2012.

NANTASENAMAT, C.; ISARANKURA-NA-AYUDHYA, C.; NAENNA, T.; PRACHAYASITTIKUL, V. Prediction of bond dissociation enthalpy of antioxidant phenols by support vector machine. **Journal of Molecular Graphics and Modelling**, v. 27, p.188-196, 2008.

NASCIMENTO, E.A., CHANG, R., MORAIS, S.A.L., PILÓ-VELOSO, D., REIS, D.C. Um marcador químico de fácil detecção para a própolis de alecrim-do-campo (*Baccharis dracunculifolia*). **Revista Brasileira Farmacognosia**. v.18, p.379-383. 2008.

OLDONI, T. L. C. **Isolamento e identificação de compostos com atividade antioxidante de uma nova variedade de própolis brasileira produzida por abelhas da espécie *Apis mellifera***. Dissertação de Mestrado - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. Piracicaba: Universidade de São Paulo. 104 p. 2007.

ORSI, R.O.; SFORCIN, J.M.; RALL, V.L.M.; FUNARI, S.R.C.; BARBOSA, L.; FERNANDES, Jr, A. Susceptibility profile of *Salmonella* against the antibacterial activity of propolis produced in two regions of Brazil. **The Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 11, p. 109-116, 2005.

ORSOLIC, N.; BASIC, I. Water-soluble derivative of propolis and its polyphenolic compounds enhance tumocidal activity of macrophages. **Journal of Ethno-Pharmacology**, v. 102, p. 37-45, 2005.

PARK, Y. K.; KOO, M.H.; SATO, H.H.; CONTADO, J.L. Estudo de alguns componentes da própolis coletada por *Apis mellifera* no Brasil. **Arquivos de Biologia e Tecnologia**. v. 38, p. 1253-1259. 1995.

PARK, Y. P.; IKEGAKI, M.; ABREU, J. A. D. S.; ALCICI, N. M. F. Estudo da preparação dos extratos de própolis e suas aplicações. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.18. n.3. 1998.

PARK, Y. P.; IKEGAKI, M.; ALENCAR, S. M. Classificação das própolis brasileira a partir de suas características físico-químicas e propriedades biológicas. **Mensagem Doce**, v. 58, p. 2-7, 2000.

Park, Y.K.; Paredes-Guzman, J.F.; Aguiar, C.L.; Alencar, S.M.; Fujiwara, F.Y. Chemical Constituents in *Baccharis dracunculifolia* as the Main Botanical Origin of Southeastern Brazilian Propolis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.52, p.1100-1103, 2004.

PARK, Y.P.; ALENCAR, S.M.; AGUIAR, C.L. Botanical origin and chemical composition of Brazilian propolis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 50, p. 2502-2506, 2002.

PEREIRA, A. D. S.; SEIXAS, F. R. M. S.; NETO, F. R. D. A. Própolis: 100 anos de pesquisa e suas perspectivas futuras. **Química Nova**, v. 25, p. 321-326, 2002.

PERRY, R. H. ; CHILTON, C. H. **Manual De Engenharia Química**, 5a Ed. Rio De Janeiro: Guanabara Dois, 1980.

PETRUS, J. C. C. **Preparação, Modificação e Caracterização de Membranas Assimétricas para Clarificação de Suco de Frutas**. Tese de Doutorado - Faculdade de Engenharia de Alimentos. Campinas: Universidade estadual de campinas. 139p. 1997.

PILIPOVIK, M. V.; RIVEROL, C. Assessing dealcoholization systems based on reverse osmosis. **Journal of Food Engineering**, v. 69, p.437-441, 2005.

Portal da Cidadania, 2002. Disponível em <<http://www.radiobras.gov.br/ct/materia.phtml?materia=86597>> Acesso em 28/01/2010.

PORTER, M.C. **Handbook of industrial membrane technology**. New Jersey: Noyes, 1990, 604p.

Produção de Mel – Embrapa, 2002. Disponível em <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Mel/SPMel/importancia.htm>> Acesso em 28/01/2008.

Própolis: Correlação Química e Biológica. Disponível em <http://www.chemkeys.com/bra/md/tee_7/pcqeb_2/pcqeb_2.htm> Acesso em 28/01/2010.

PRUDÊNCIO, A.P.A., PRUDÊNCIO, E.S., AMBONI, R.D.M.C., MURAKAMI, A.N.N., MARASCHIN, M., PETRUS, J.C.C., OGLIARI, P.J. and LEITE, R.S., 2012. Phenolic composition and antioxidant activity of the aqueous extract of bark from residues from mate tree (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) bark harvesting concentrated by nanofiltration. **Food and Bioproducts Processing**, 90(3), pp. 399-405.

RAMOS A. F. N.; MIRANDA J. L. Propolis: a review of its anti-inflammatory and healing actions. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**. v. 13, p. 697-710, 2007.

RAUTENBACH, R. ALBRECHT, R. **Membrane Processes**. John Wiley & Sons Ltd, New York, 1989.

RAWLE, A. Basic principles of particle size analysis. 2004 Disponível em <<http://www.pct.hu/basic.pdf>> Acesso em 20/11/2011.

RICE-EVANS, C.; MILLER, N. J.; BOLWELL, G. P. BRAMLEY, P. M.; PRIDHAM, J. B. The relative antioxidant activities of plant derived polyphenolic flavonoids. **Free Radical Research** v. 22, p. 375-383, 1995.

RIJN C.J.M, **Nano and Micro Engineered Membrane Technology**, Elsevier, Amsterdam, 2005

RODRIGUES, R.B. **Aplicação dos processos de separação por membranas para produção de suco clarificado e concentrado de camu camu (*Myrciaria dubia*)**. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Campinas: Universidade Estadual de Campinas. 146p. 2002.

ROSTAGNO , M. A.; VILLARESA, A.; GUILLAMÓNA, E.; GARCÍA-LAFUENTEA, A.; MARTÍNEZA, J.A. Review: Sample preparation for the analysis of isoflavones from soybeans and soy foods. **Journal of Chromatography**, v.1216, n.1, p.2-29, 2009.

SÁNCHEZ-MORENO, C. Review: methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. **Food Science and Technology International**, v.8, p.121-137, 2002.

SCAZZOCCHIO, F.; D'AURIA, F.D.; ALESSANDRINI, D.; PANTANELLA, F. Multifactorial aspects of antimicrobial activity of propolis. **Microbiological Research**. v. 161, p. 327-333, 2006.

SCHÄFER, A.I.; FANE, A.G.; WAITE, T.D. Nanofiltration – Principles and Applications. Inglaterra: Elsevier Advanced Technology, 2005. 560 p.

SHELLER, S., KROL, W., SEDLACZEK, R., ZYDOWICZ, G., WOJCIK, L. E SHANI, J. Ethanolic extract of propolis (EEP), a natural antioxidant, prolongs life span of male and female mice. **Pharmacology**, v. 3, p. 123-125, 1994.

SCOPUS. Disponível em <<http://www.scopus.com>>. Acesso em 25/10/2012.

SEBRAE. **Apicultura - Histórico de exportações**. Disponível em <<http://www.sebrae.com.br/setor/apicultura/sobre-apicultura/mercado/historico-de-exportacoes>> Acesso em 20/07/2012.

SEBRAE. **Boletim Setorial do Agronegócio – Apicultura**. Recife, 15 p. 2011.

SEBRAE. **Exportações de Mel - Maio**. Disponível em <http://www.sebrae.com.br/setor/apicultura/sobre-apicultura/mercado/exportacoes/PDF_expo_maio_2010.pdf> Acesso em 20/06/2010.

SEBRAE. **Informações de Mercado sobre mel e derivados da colméia**. Relatório completo. Brasília, 243p. 2006.

SFORCIN, J.M.; BANKOVA, V. Propolis: Is there a potential for the development of new drugs? **Journal of Ethnopharmacology**. v.133, p.253–260, 2011.

SFORCIN, J.M.; FERNANDES Jr., A.; LOPES, C.A.M.; BANKOVA, V.; FUNARI, S.R.C. Seasonal effect on Brazilian propolis antibacterial activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 73, p.243-249, 2000.

SILVA, F.C. **Aplicação de membranas poliméricas para obtenção de licopeno concentrado a partir de polpa de mamão (*Carica papaya* L.)**. 122p. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2010.

SILVA, F.C.; **Aplicação de membranas poliméricas para obtenção de licopeno concentrado a partir de polpa de mamão (*Carica papaya* L.)**. 122 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos). Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2010.

SILVA, J. F. M.; SOUZA, M. C.; MATTA, S. R.; ANDRADE, M. R.; VIDAL, F. V. N. Correlation analysis between phenolic levels of Brazilian propolis extracts and their antimicrobial and antioxidant activities. **Food Chemistry**, v.99, p. 431-435, 2006.

SILVA, J.C.; RODRIGUES, S.; FEÁAS,X.; ESTEVINHO, L.M. Antimicrobial activity, phenolic profile and role in the inflammation of propolis. **Food and Chemical Toxicology**,

v.50, p. 1790-1795, 2012.

SILVA, R.S.; SCHEER, A.P. Estudo do processamento por microfiltração de soluções aquosas de pectina em membranas cerâmicas. **Acta Scientiarum Technology**, v. 33, p. 215-220, 2011.

SILVERSTEIN, R.M.; BASSELER, G.C.; MORRIL, T.C. **Identificação Espectrométrica de Compostos. Orgânicos**, 7ª Edição, Ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2006

Siripatrawan, U.; Vitchayakitti, W.; Sanguandeeul, R. Antioxidant and antimicrobial properties of Thai propolis extracted using ethanol aqueous solution. **International Journal of Food Science and Technology**. Early view. DOI: 10.1111/j.1365-2621.2012.03152.x , 2012.

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

TAKAISHI-KIKUNI, N.B.; SCHILCHER, H. Electron microscopic and microcalorimetric investigation of the possible mechanism of the antibacterial action of a defined propolis provenance. **Planta Medicine**, v.60, n.2, p.222-227, 1994.

TANIGUCHI, C.; GUENGERICH, f.p. Metabolismo dos Fármacos. Disponível em <<http://www.ufpi.br/subsiteFiles/lapnex/arquivos/files/Metabolismo%20dos%20farmacos.pdf>> Acesso em 10/11/2012.

THAIPONG, K., BOONPRAKOB,U., CROSBY, K., CISNEROS-ZEVALLOS, L. &

BYRNE, D.H. Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. **Journal of Food Composition and Analysis**, 19, 669-675, 2006.

THIRUGNANASAMPANDAN, R.; RAVEENDRAN, S.B.; JAYAKUMAR, R. Analysis of chemical composition and bioactive property evaluation of Indian propolis. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**. P. 651-654. 2012.

TSIBRANSKA, H.; PEEV, G.A.; TYLKOWSKI, B. Fractionation of Biologically Active Compounds Extracted from Propolis. **Membrane Science and technology**. v. 1, p. 1-4, 2011.

TSUI, E. M.; CHERYAN, M. Membrane processing of xanthophylls in ethanol extracts of corn. **Journal of Food Engineering**, v. 83, p. 590-595, 2007.

TYLKOWSKI, B.; TRUSHEVA, B.; BANKOVA, V.; GIAMBERINI, M. PEEV, G.; NIKOLOVA, A. Extraction of biologically active compounds from propolis and concentration of extract by nanofiltration. **Journal of Membrane Science**, v. 348, p. 124-130, 2010.

USHIKUBO, F.Y. **Efeito do tratamento enzimático, da velocidade tangencial e da pressão transmembrana na microfiltração da polpa diluída de umbu** (Spondias tuberosa Arr. Cam.). 2006. 117p. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2006.

USHIKUBO, F.Y.; WATANABE, A.P.; VIOTTO, L.A. Microfiltration of umbu (*Spondias tuberosa* Arr. Cam.) juice. **Journal of Membrane Science**, v. 288, p. 61-66, 2007.

VELA, M.C.V.; BLANCO, S.A.; GARCÍA, J.L.; RODRÍGUEZ, E.B. Analysis of membrane pore blocking models adapted to crossflow ultrafiltration in the ultrafiltration of PEG. **Chemical Engineering Journal**, v. 149, p. 232-241, 2009.

VINCZE, I.; STEFANOVITS-BÁNYAIB, E.; VATAI, G. Using nanofiltration and reverse osmosis for the concentration of seabuckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) juice. **Desalination**, v.200, p. 528-530, 2006.

WOISKY, R. G. **Métodos de Controle Químico de Amostras de Própolis**. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas. São Paulo: Universidade Estadual de São Paulo. 74p. 1996.

YOSHIDA, Y.; KISO, M.; GOTO, T. Efficiency of the extraction of catechins from green tea. **Food Chemistry**, v. 67, p. 429-433, 1999.

ZIN, Z.M.; ABDUL-HAMID, A.; OSMAN, A. Antioxidative activity of extracts from Mengkudu (*Morinda citrifolia* L.) root, fruit and leaf. **Food Chemistry**, v. 78, p. 227-231, 2002.

Anexo A – Laudo da própolis bruta adquirida para o trabalho



APIÁRIOS LAMBERTUCCI CERTIFICADO DE ANÁLISE

LAUDO: 03C1P

Data Produção: 03/03/11

Valido até: 03/03/13

PRODUTO: 28

PRÓPOLIS "IN NATURA" P1ME

LOTE: 03C1P

PROPRIEDADES ORGANOLÉPTICAS	RESULTADO	ESPECIFICADO
COR	Conforme	Variedades predominantemente verde
GRANULOMETRIA	Conforme	Heterogênea >7,0 mm
CONSISTÊNCIA	Conforme	Moleável e rígida (à temperatura ambiente)

ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS	RESULTADO	ESPECIFICADO
UMIDADE	5,34%(m/m)	Máximo 8%(m/m)
CERA	25,00%(m/m)	Máximo 25%(m/m)
FLAVONÓIDES	5,09%(m/m)	Mínimo 2%(m/m)
MASSA MECÂNICA	35,06%(m/m)	Máximo 40%(m/m)
SOLÚVEIS EM ETANOL	43,71%(m/m)	Mínimo 35%(m/m)

Joelma Lambertucci de Brito
 Joelma Lambertucci de Brito
 Farmacêutica Responsável
 CRF: 14.304

APIÁRIOS LAMBERTUCCI LTDA

terça-feira, 30 de agosto de 2011

 Rua 22 De nº 1177 - Jardim Anhanguera - CEP 13501-890 - Rto Claro / SP - PAÍS (00010) 824-8080 - Fax (00010) 824-8004
 Home page: www.aparioslambertucci.com.br - E-mail: lambertucci@aparioslambertucci.com.br

Anexo B - Curvas-padrão utilizadas no trabalho

Curva padrão utilizada para determinação de flavonóides

Foi utilizada quercetina hidratada na concentração de 1 a 100µg/mL para a construção da curva-padrão usada como base para determinação da quantidade de flavonóides nos extratos de própolis. A Figura B1 representa a curva padrão obtida e utilizada para os cálculos de flavonóides.

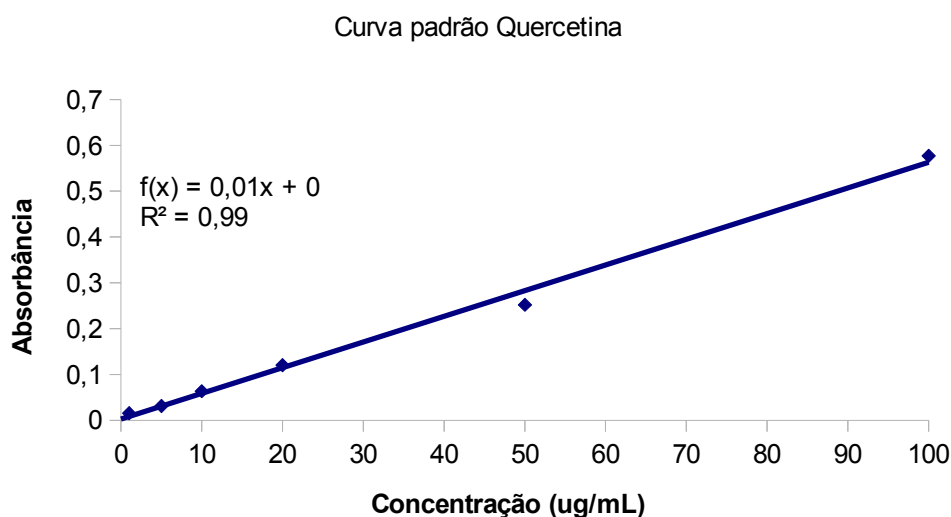


Figura B1. Curva padrão de quercetina hidratada

Curva padrão utilizada para determinação de polifenóis

Foi utilizado ácido gálico na concentração de 1 a 100µg/mL para a construção da curva-padrão usada como base para determinação da quantidade de compostos fenólicos nos extratos de própolis. A Figura B2. representa a curva padrão obtida e utilizada para os cálculos de compostos fenólicos totais.

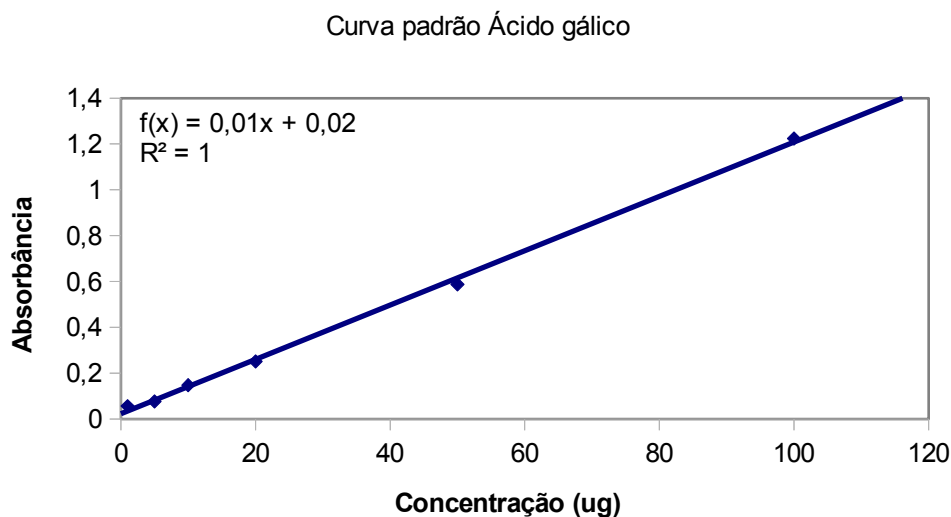


Figura B2. Cuva padrão de ácido gálico

Curva padrão utilizada para atividade antioxidante pelo método FRAP

Foi utilizado sulfato ferroso como solução padrão de comparação para determinação de atividade antioxidante pelo método FRAP. Sua curva padrão foi construída através da realização do método utilizando-se sulfato ferroso na concentração de 100 a 2000 μ M no lugar da amostra. A curva-padrão foi usada como base para determinação da atividade antioxidante dos extratos de própolis. A Figura B3 representa a curva padrão obtida e utilizada para o cálculo da atividade antioxidante pelo método FRAP.

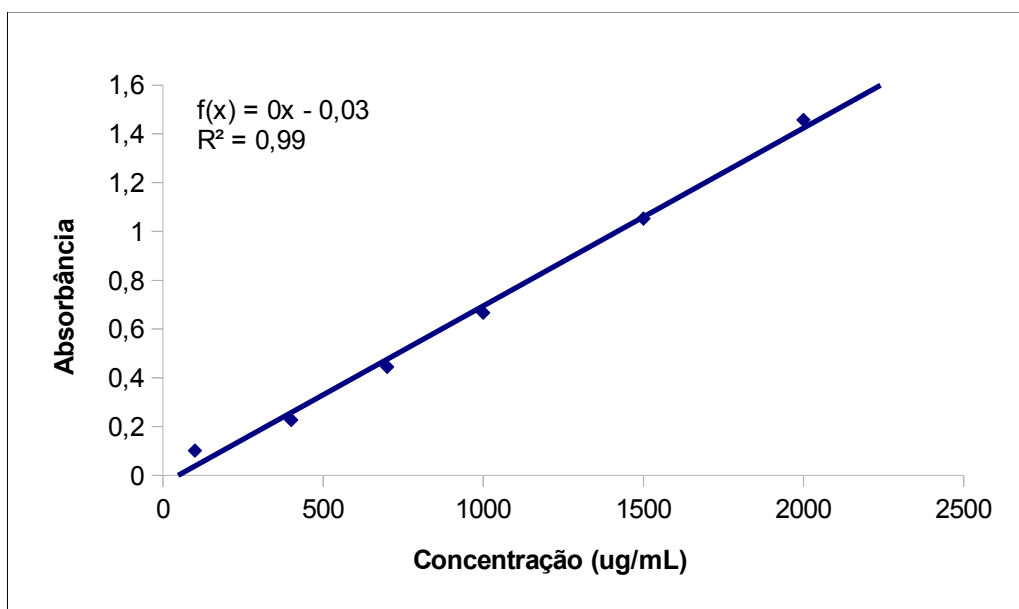


Figura B3. Curva padrão de sulfato ferroso

Anexo C. Regeneração da membrana

Antes da realização dos experimentos com extratos de própolis foi realizada a circulação de água destilada para a construção de uma curva de permeação em função da pressão de processamento. Esta curva está representada na Figura C1. A medida do fluxo de água deionizada em função da pressão transmembrana permitiu a determinação da permeabilidade hidráulica da membrana de nanofiltração.

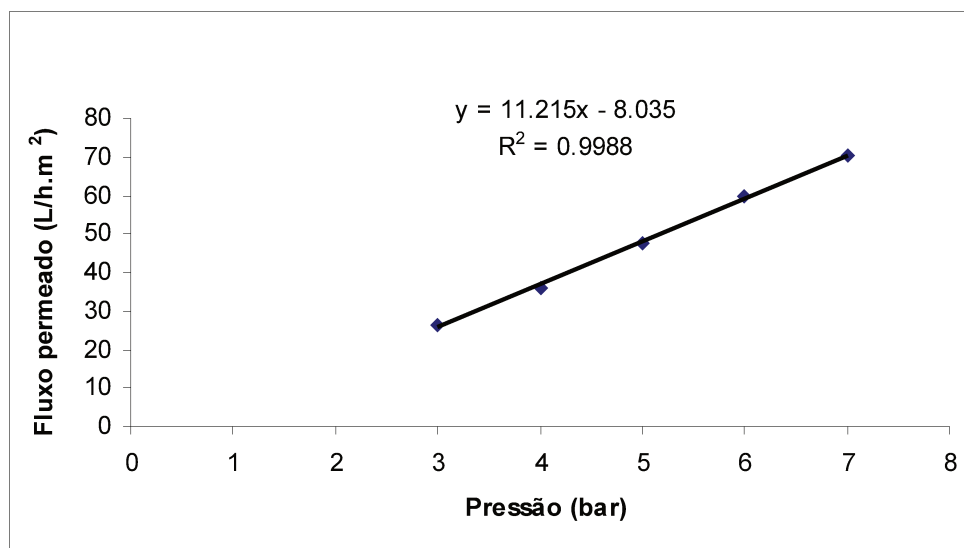


Figura C1. Curva de permeação da água destilada em função do tempo

A Figura C1 mostra o comportamento linear do fluxo em função da pressão aplicada. Esse comportamento é característico de ensaios com solventes puros, em sistemas que não sofrem efeito considerável de compactação de membranas.

Após cada ensaio de concentração dos extratos de própolis foi re-circulada a água destilada a fim de se testar a regeneração da membrana após o processo. Admitiu-se uma variação de até 10% do fluxo original obtido com água destilada. Os dados de permeabilidade após cada ensaio a 6,0 bar estão expressos na Tabela C1.

Tabela C1. Diferença Percentual do Fluxo de permeado após cada ensaio de concentração de extratos de própolis

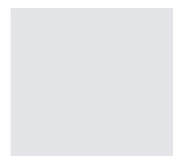
	Fluxo (L/(h.m²))	Diferença (%)
Ensaio 1	63,45	9,96
Ensaio 2	63,30	10,17
Ensaio 3	64,20	8,90
Ensaio 4	63,60	9,75
Ensaio 5	64,20	8,90
Ensaio 6	63,00	10,60
Ensaio 7	67,50	4,21
Ensaio 8	69,30	1,66
Ensaio 9	70,80	-0,47
Ensaio 10	63,45	9,96
Ensaio 11	67,20	4,64
Ensaio 12	69,30	1,66
Ensaio 13	63,50	9,81
Ensaio 14	63,90	9,10
Ensaio 15	67,50	4,21
Ensaio 16	64,20	8,90
Ensaio 17	69,30	1,66
Ensaio Validação	63,50	9,81

Segundo Cheryan (1998), a permeabilidade hidráulica depende das características da membrana, apresentando, portanto, ampla variação de valores para cada tipo de processo de filtração. Além disso, o autor recomenda a utilização de água deionizada na medida da permeabilidade, pois o valor obtido é afetado pela qualidade da água.

Anexo D. Padrões de Coloração

Padrões para os extratos aquosos de própolis em pH 4,3, 7,7 (alimentação), concentrado e permeado do processamento com membranas e extrato alcoólico.

Permeado



4,3



Alimentação



Concentrados



Alcoólico



Anexo E. Tempos de retenção dos padrões utilizados em cromatografia líquida de alta eficiência

A Tabela E1 indica os tempos de retenção de todos os padrões utilizados na metodologia de cromatografia líquida de alta eficiência, inclusive aqueles que não foram identificados nas amostras.

Tabela E1. Tempo de retenção dos padrões utilizados no HPLC.

Padrões	Tempo de retenção (minutos)
Ácido Cumárico	10,02
Ácido Ferúlico	10,92
Ácido trans-cinâmico	9,37
Apigenina	43,67
Acacetina	60,29
Artepilin-C	84,04
Ácido gálico	3,54
Ácido cafeico	6,67
caempferol	35,85
crisina	51,29
Quercetina	33,89
Rutina	13,46