

**UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ**

**TABATA HANA SHIGIHARA**

**OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO DE PRÓPOLIS VERDE PELA ATIVIDADE  
ANTIFÚNGICA E INCORPORAÇÃO EM BIOFILME DE QUITOSANA**

**TOLEDO**

**2021**

**TABATA HANA SHIGIHARA**

**OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO DE PRÓPOLIS VERDE PELA ATIVIDADE  
ANTIFÚNGICA E INCORPORAÇÃO EM BIOFILME DE QUITOSANA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR, Campus Toledo no Curso Superior de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel.

Área de concentração: microbiologia aplicada

Orientadora: Tatiana Shioji Tiuman

**TOLEDO**

**2021**

**TERMO DE APROVAÇÃO  
TABATA HANA SHIGIHARA**

**OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO DE PRÓPOLIS VERDE PELA ATIVIDADE  
ANTIFÚNGICA E INCORPORAÇÃO EM BIOFILME DE QUITOSANA**

Data da aprovação, 19 de agosto de 2021.

---

Prof<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup> Tatiana Shioji Tiunan  
Universidade Tecnológica Federal do Paraná

---

Prof<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup>. Priscila Vaz de Arruda  
Universidade Tecnológica Federal do Paraná

---

Prof. Dr. Clayton Antunes Martin  
Universidade Tecnológica Federal do Paraná

**TOLEDO  
2021**

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> – Microscopia eletrônica de varredura de <i>Candida albicans</i> .....	14
<b>Figura 2</b> – Estrutura química da quitina e quitosana.....	16
<b>Figura 3</b> – Representação ilustrativa da disposição das amostras de extratos brutos de própolis verde em microplaca de 96 poços.....	22
<b>Figura 4</b> – Análise de Superfície de Resposta para <i>Candida albicans</i> , <i>Candida glabrata</i> e <i>Candida tropicalis</i> no planejamento A: acetato de etila, acetona e isopropanol.....	33
<b>Figura 5</b> – Análise de Superfície de Resposta para <i>Candida albicans</i> , <i>Candida glabrata</i> e <i>Candida tropicalis</i> no planejamento B: acetona, etanol e isopropanol.....	34
<b>Figura 6</b> – Análise de superfície de resposta para <i>Candida albicans</i> , <i>Candida glabrata</i> e <i>Candida tropicalis</i> no planejamento C: acetato de etila, etanol e isopropanol .....	35
<b>Figura 7</b> – Soluções filmogênicas dispostas em placas de teflon.....	38
<b>Figura 8</b> – Comparação visual da atividade antifúngica em relação ao controle de crescimento (CC): (A) resultado positivo do extrato ACE contra <i>Candida glabrata</i> e (B) resultado do extrato ACI com <i>Candida tropicalis</i> .....	41
<b>Figura 9</b> – Resultado negativo para atividade antifúngica da <i>Candida albicans</i> para os biofilmes testados a 1cm <sup>2</sup> (C+; ACI; ACE e AI) .....	42

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> – Planejamento experimental para elaboração dos extratos de própolis verde.....	20
<b>Tabela 2</b> – Características físico-químicas de própolis verde de Minas Gerais.....	28
<b>Tabela 3</b> – Concentração inibitória mínima (CIM) e concentração fungicida mínima (CFM) .....	31
<b>Tabela 4</b> – Extratos de própolis verde otimizados por análise de superfície de resposta de acordo com os planejamentos experimentais A, B e C, valores teóricos estimados de concentração inibitória mínima (CIM) para cada extrato e valores experimentais obtidos .....	36
<b>Tabela 5</b> – Resultados expressos em média e desvio padrão da espessura, permeabilidade de vapor de água (PVA) e solubilidade dos biofilmes .....	38
<b>Tabela 6</b> – Atividade antimicrobiana dos biofilmes por macrodiluição .....	40

## RESUMO

O mercado de própolis brasileira sofreu grande expansão, levando o setor de beneficiamento de própolis busca encontrar a melhor forma de produzir extratos de própolis com atividades biológicas. Este trabalho visou otimizar extratos de própolis pela atividade antifúngica e incorporar os extratos a um biofilme de quitosana. A metodologia foi iniciada com o preparo dos extratos utilizando etanol, acetona, acetato de etila e isopropanol isoladamente e em misturas de 2 e 3 solventes em iguais proporções. Os extratos foram organizados em 3 planejamentos diferentes e tiveram a concentração inibitória mínima (CIM) e a concentração fungicida mínima (CFM) contra *Candida albicans*, *Candida tropicalis* e *Candida glabrata* determinada por microdiluição. A partir da CIM, foi realizada a análise de superfície de resposta, a fim de encontrar os extratos em condições ótimas para cada planejamento. Por fim, os extratos otimizados foram incorporados à produção de biofilmes de quitosana e foram determinadas espessura, permeação de vapor de água, solubilidade em água e atividade anti-*Candida* em macrodiluição. Todos os extratos testados apresentaram atividade antifúngica para as espécies de *Candida* testadas. Destacou-se o extrato de acetona/etanol que promoveu a inibição das leveduras com os menores valores de CIM e CFM (0,76-2,50 mg/mL). Na otimização do processo, os melhores extratos obtidos de cada planejamento foram para as misturas de: acetona/isopropanol; acetona/etanol e acetato de etila/isopropanol. Os biofilmes com extratos incorporados não demonstraram diferenças de espessura (0,18-0,25 mm), permeabilidade de vapor de água (11,57-16,96 g/diam<sup>2</sup>kPa) e solubilidade em água (27,60-30,44 %) em relação ao biofilme sem extrato. O biofilme com extrato de acetona + etanol foi o que demonstrou maior atividade anti-*Candida* entre os demais. Assim, confirmou-se que essa é uma mistura de bom potencial extrativo para própolis verde. Por meio desse trabalho, foi encontrada uma condição de extração ótima de compostos biologicamente ativos de própolis verde e verificada a influência destes extratos nas características físico-químicas e atividade antifúngica, quando incorporados ao biofilme de quitosana.

Palavras-chave: Extrato bruto. Planejamento experimental. Concentração inibitória mínima. *Candida*.

## ABSTRACT

The Brazilian propolis market underwent great expansion, leading the propolis processing sector seeks to find the best way to produce propolis extracts with biological activities. With this in mind, this work aimed to optimize propolis extracts for antifungal activity and incorporate the extracts into a chitosan biofilm. The methodology started with the preparation of extracts using ethanol, acetone, ethyl acetate and isopropanol alone and in mixtures of 2 and 3 solvents in equal proportions. The extracts were organized in 3 different designs and had the minimum inhibitory concentration (MIC) and the minimum fungicidal concentration (MFC) against *Candida albicans*, *Candida tropicalis* and *Candida glabrata* determined by microdilution. From the CIM, the response surface analysis was performed in order to find the extracts in optimal conditions for each planning. Finally, the optimized extracts were incorporated into the production of chitosan biofilms and thickness, water vapor permeation, water solubility and anti-*Candida* activity in macrodilution were determined. All tested extracts showed antifungal activity for the *Candida* species tested. The acetone + ethanol extract was highlighted, which promoted the inhibition of yeasts with the lowest values of MIC and CFM (0.76-2.50 mg/mL). In the optimization of the process, the best extracts obtained from each planning were for the mixtures of: acetone + isopropanol; acetone + ethanol and ethyl acetate + isopropanol. The biofilms with incorporated extracts showed no differences in thickness (0.18-0.25 mm), water vapor permeability (11.57-16.96 g/diam<sup>2</sup>kPa) and water solubility (27.60-30.44 %) compared to biofilm without extract. The biofilm with acetone + ethanol extract showed the greatest anti *Candida* activity among the others. Thus, it was confirmed that this is a mixture of good extractive potential for green propolis. Through this work, an optimal extraction condition of biologically active compounds of green propolis was found and the influence of these extracts on the physicochemical characteristics and antifungal activity, when incorporated into the chitosan biofilm, was verified.

Keywords: Crude extract. Experimental planning. Minimum inhibitory concentration. *Candida*.

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>9</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>11</b>
<b>2.1</b>	<b>Geral</b> .....	<b>11</b>
<b>2.2</b>	<b>Específicos</b> .....	<b>11</b>
<b>3</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	<b>12</b>
<b>3.1</b>	<b>Própolis</b> .....	<b>12</b>
<b>3.2</b>	<b>Otimização de processos extrativos</b> .....	<b>13</b>
<b>3.3</b>	<b><i>Candida sp.</i></b> .....	<b>14</b>
<b>3.4</b>	<b>Quitosana</b> .....	<b>15</b>
<b>3.5</b>	<b>Aplicação de biofilmes</b> .....	<b>17</b>
<b>4</b>	<b>METODOLOGIA</b> .....	<b>19</b>
<b>4.1</b>	<b>Extrato de própolis</b> .....	<b>19</b>
4.1.1	Obtenção da amostra de própolis .....	19
4.1.2	Controle de qualidade .....	19
4.1.3	Preparo dos extratos de própolis .....	19
4.1.4	Preparo do extratos de própolis para avaliação da atividade antifúngica .....	21
<b>4.2</b>	<b>Concentração inibitória mínima (CIM) e concentração fungicida mínima (CFM)</b> .....	<b>21</b>
4.2.1	Preparo dos inóculos fúngicos .....	21
4.2.2	Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e da concentração fungicida mínima (CFM) .....	22
<b>4.3</b>	<b>Análise estatística</b> .....	<b>23</b>
<b>4.4</b>	<b>Biofilme de quitosana incorporado com extrato de própolis</b> .....	<b>24</b>
4.4.1	Elaboração do filme .....	24
4.4.2	Avaliação macroscópica .....	24
4.3.3	Espessura .....	25
4.3.4	Permeabilidade ao vapor .....	25
4.3.5	Solubilidade em água .....	26
4.3.6	Atividade antifúngica por macrodiluição .....	26
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>28</b>
<b>5.1</b>	<b>Amostra de própolis</b> .....	<b>28</b>
<b>5.2</b>	<b>Concentração inibitória mínima (CIM) e concentração fungicida mínima</b>	

(CFM) .....	29
5.3 Otimização dos extratos de própolis verde .....	32
5.4 Desenvolvimento e caracterização dos biofilmes .....	37
6 CONCLUSÃO .....	43
REFERÊNCIAS .....	44



## 1 INTRODUÇÃO

Nos últimos anos os benefícios de própolis para a saúde humana passaram a ser mais difundidos, por consequência, expandiu-se as formas de comercialização desse produto (BREYER et al., 2016). O mercado brasileiro de própolis está em pleno desenvolvimento, cerca de 92 % de toda a própolis consumida no Japão é de origem brasileira e, em termos de produção, o país ocupa o terceiro lugar no ranking mundial com produção de 50 a 150 toneladas por ano (COSTA, 2014). Em contrapartida, o recente setor de produção e extração de própolis ainda procura por métodos mais viáveis e efetivos para o beneficiamento dessa matéria-prima.

A composição da própolis depende da vegetação e da região em que cada colmeia é localizada. Nesse contexto, admite-se que esse material apresenta alta variabilidade da proporção de componentes, elementos e propriedades físico-químicas e biológicas específicas (MARIANO; HORI, 2018). A partir desse viés, surge a importância de serem realizados estudos que investigam as características do produto levando em consideração a flora local.

O processo de extração consiste na remoção de substâncias pertencentes a composição química do material para um líquido extrator adequado (SIMÕES, 2014). Uma vez que a matéria-prima tem as características conhecidas, torna-se possível buscar por extrações que proporcionem maiores teores de compostos químicos responsáveis pela atividade de interesse. Para esse fim, a otimização é o meio mais adequado para se obter formulações de maior atividade biológica.

Tem sido crescente a investigação da atividade antifúngica em produtos naturais, uma vez que essa propriedade é capaz de interferir no crescimento das células fúngicas inibindo-as (SFORCIN, 2000). Em se tratando do mercado de produtos naturais, outro importante foco de estudos é o biofilme, que é um filme fino preparado a partir de materiais biológicos que atua como barreira a fatores como umidade e gases, tendo uma função de proteção (DOS SANTOS, 2003). As relações entre esses dois bioprodutos é a capacidade dos extratos naturais de conferir ou potencializar as atividades biológicas dos biofilmes quando incorporados em sua formulação.

A quitosana é um biopolímero linear que pode ser obtida a partir de crustáceos ou da biomassa de fungos filamentosos, oferecendo a vantagem do

uso na obtenção de biomateriais de melhor relação custo/benefício em comparação com os seus semelhantes existentes no mercado (SPIN et al., 2008). Dentre os vários biomateriais de quitosana, encontra-se o biofilme. Um biomaterial de fácil produção e um vasto campo de aplicabilidade, como a indústria alimentícia, médica e farmacêutica.

Sabe-se que a própolis e a quitosana são substâncias que apresentam ação comprovada contra bactérias e fungos, além disso, ambas as substâncias são de origem natural, atóxicas e biodegradáveis (COSTA, 2015). Essas características permitem juntá-las em um único produto para verificar se há potencialização sinérgica da ação antifúngica desses compostos.

Nessa perspectiva, a presente pesquisa buscou encontrar as melhores condições de extração de própolis utilizando isopropanol, acetona, acetato de etila e etanol, tendo como parâmetro de avaliação a atividade antimicrobiana. Em uma segunda etapa, visou-se incorporar os extratos otimizados em biofilmes de quitosana com a finalidade de verificar a influência dos extratos no bioproduto desenvolvido.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Geral

Otimizar o processo de extração de própolis verde através da avaliação da ação antifúngica e incorporar os extratos otimizados no desenvolvimento de um biofilme de quitosana.

### 2.2 Específicos

- ✓ Obter extratos de própolis verde utilizando diferentes solventes e suas combinações.
- ✓ Determinar a atividade anti-*Candida*, de extratos de própolis e da quitosana por meio da concentração inibitória mínima (CIM);
- ✓ Elaborar o biofilme de quitosana incorporando o extrato de própolis;
- ✓ Verificar possíveis alterações físico-químicas da estrutura do biofilme após a adição do extrato;
- ✓ Verificar a eficácia do biofilme de quitosana contra diferentes espécies de *Candida*.

### 3 REFERENCIAL TEÓRICO

Nessa seção serão abordados conceitos e informações fundamentais acerca dos principais temas do estudo: própolis, otimização de processos extrativos, *Candida sp.*, quitosana e aplicação de biofilmes.

#### 3.1 Própolis

De acordo com Silva et al. (2015) entende-se por própolis o produto proveniente de substâncias resinosas, gomosas e balsâmicas, coletadas por abelhas melíferas, de brotos, flores e exsudados de plantas, com a adição de secreções salivares, cera e pólen. Dessa forma, as abelhas dão origem a uma resina que pode ter coloração, consistência e composição variada (BRASIL, 2001).

Dentro da colmeia, a própolis é utilizada principalmente para funções estruturais, como a construção e a adaptação das paredes. Além disso, esse material é usado para embalsamar insetos mortos e, como “arma química”, pois mantém o ambiente asséptico, protegendo as abelhas de microrganismos patogênicos e invasão de outros insetos (CUNHA, 2017).

As características físico-químicas da própolis são diretamente influenciadas pela vegetação local e a época da extração do produto. A coloração, por exemplo, pode variar entre o verde, vermelho e marrom. Sua composição também sofre alteração por esses fatores, ou seja, própolis de regiões diferentes irão apresentar composição e características distintas. De modo geral, apresenta um odor característico que pode variar de uma amostra para outra e o ponto de fusão encontra-se na faixa de 60 e 70 °C (MARIANO; HORI, 2018).

Em estimativas generalizadas, a composição desse produto natural contém entre 50-60 % de resinas e bálsamos, 30-40 % de ceras, 5-10 % de óleos essenciais, 5 % de grãos de pólen, juntamente com microelementos como alumínio, estrôncio, ferro, cobre, manganês e poucas quantidades de vitaminas B1, B2, B6, C e E (MORAES, 2009).

No âmbito de atividade biológica, essa resina natural apresenta atividades antibacteriana, antifúngica, antiviral, anticariogênica, citotóxica, antiinflamatória, imunomodulatória, antioxidante e antitumoral (CABRAL et al., 2009). Tantas atividades são decorrentes da composição química complexa e variável da

própolis. Dentre esses compostos, os ácidos fenólicos e os flavonoides chamam bastante atenção, pois são responsáveis pela ação antimicrobiana e antioxidante (VOLPI; BERGONZINI, 2006).

Em se tratando da atividade antimicrobiana da própolis, sabe-se que sua principal atividade é contra bactérias Gram-positivas, uma vez que são inibidas com concentrações menores de própolis em comparação com bactérias Gram-negativas. Existe já um alto número de trabalhos de avaliação da atividade antibacteriana em *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* e *Salmonella typhimurium* (SFORCIN et al., 2000). No entanto, ainda não há completa elucidação do mecanismo de ação dessa atividade. Takaisi-Kikuni e Schilcher (1994) apontam como principal causa, a inibição da síntese de proteínas através da desorganização do citoplasma ainda no processo de divisão celular.

Já na avaliação da atividade antifúngica da própolis, a mesma demonstrou atividade para leveduras *Candida albicans* e *Candida tropicalis* em alguns trabalhos. Para Sforcin et al. (2001), *C. albicans* se mostrou mais suscetível ao extrato etanólico, enquanto Fernandes Jr et al. (1995) constataram a atividade antimicrobiana de extratos etanólicos de própolis para as duas espécies, mas a *C. tropicalis* foi a mais suscetível aos efeitos do extrato.

### **3.2 Otimização de processos extrativos**

A extração de compostos bioativos pode ocorrer de inúmeros métodos diferentes, devido a ampla gama combinações de diferentes parâmetros de controle fixos ou variáveis que podem ser alterados. Como por exemplo, a origem do material, os solventes, o tempo de extração, a temperatura de extração e o tamanho das partículas. Nos produtos naturais estão diversificadamente presentes, compostos com potencial bioativo em diferentes quantidades, tornando completamente inviável um único solvente ideal para a retirada dessas substâncias (SHAHIDI; NACZK, 1995). Assim, é necessário buscar por condições mais apropriadas do processo para a melhor extração dos compostos bioativos, focando na atividade biológica de maior interesse. Essa situação é uma otimização do processo.

A literatura científica dos estudos de otimização dos extratos de própolis é vasta e relata resultados nas mais diferentes condições, principalmente em relação a melhor concentração de etanol para a extração. Brevemente, são notadas otimizações

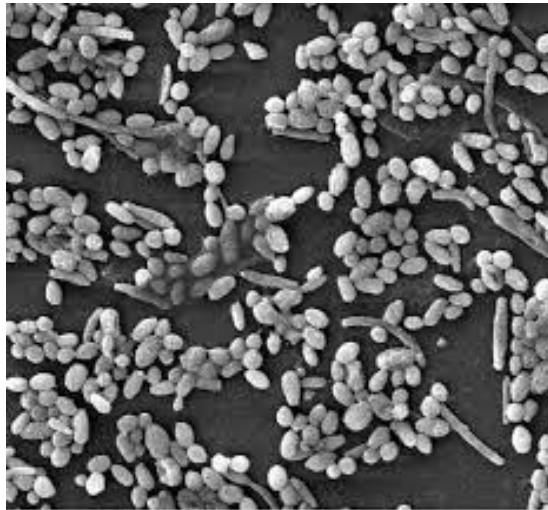
variando a origem do líquido extrator como fez Longhini et al. (2007) que compararam a atividade biológica entre extratos hidroalcoólicos e hidroglicólicos, assim comovariando a concentração de etanol em meio aquoso (DOS SANTOS et al., 2003) ou ainda investigando o efeito do tamanho das partículas na produção de extrato aquoso (COSTA, 2020).

### 3.3 *Candida sp.*

As leveduras do gênero *Candida* são de extrema importância devido a frequência com que colonizam e infectam o hospedeiro humano. Esses microrganismos são comensais que habitam o trato gastrointestinal, fazendo parte também da microbiota oral, urogenital e da pele (CARVALHO, 2017).

Morfologicamente, são caracterizadas por células Gram-positivas leveduriformes que podem ser ovais ou alongadas (Figura 1). Quando cultivada em ágar Sabouraud dextrose, seu crescimento se dá em colônias de cor branca a levemente amarelada, de textura cremosa, brilhante e lisa (LARONE, 2002).

**Figura 1-** Microscopia eletrônica de varredura de *Candida albicans*.



Fonte: Andrade, 2016.

A *Candida albicans* é a levedura que mais comumente causa infecções fúngicas. Essa espécie pode viver em equilíbrio no ambiente vaginal, sem comprometimento à saúde. No entanto, se ocorrer alguma alteração local, pode ser desenvolvido um processo infeccioso (BITTENCOURT, 2008).

Os casos de infecções por *Candida tropicalis* são menos frequentes, uma vez que essa espécie tende a causar fungemia em pacientes que apresentam complicações no sistema imunológico ocasionadas por patologias severas como câncer, neutropenia ou malignidade (LIBERATO, 2008).

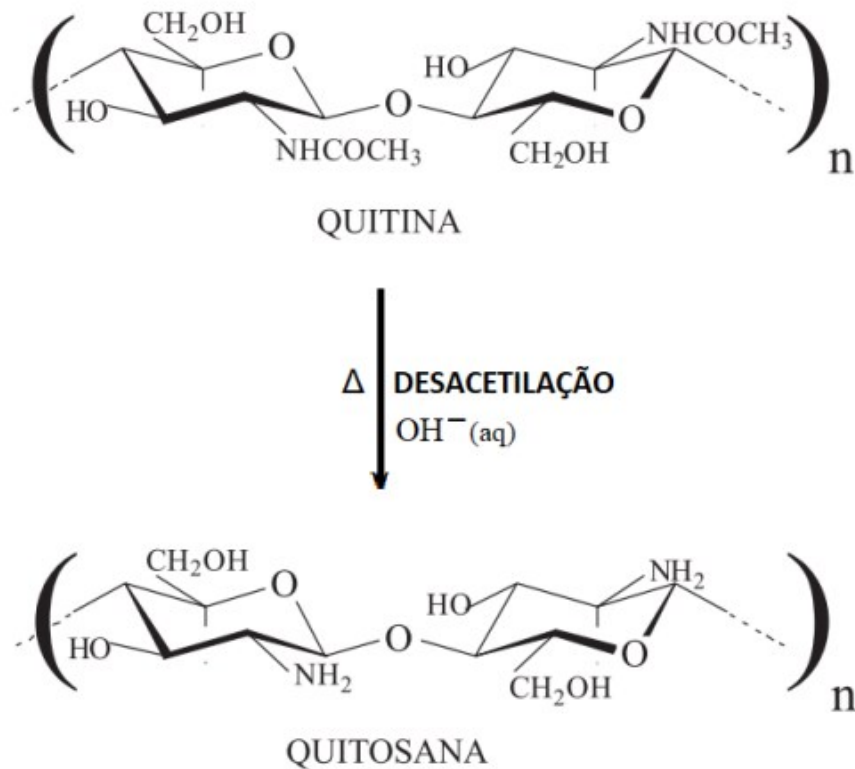
A *Candida glabrata* já foi considerada uma espécie de leve potencial patogênico, natural da microbiota de indivíduos saudáveis, raramente gerando infecções em humanos (FIDEL et al., 1999). Apesar disso, a frequência de infecções em seres humanos por *C. glabrata* tem aumentado consideravelmente nos últimos anos, muito em decorrência do uso de fármacos imunossupressores e por isso, é classificada como um patógeno oportunista emergente, sobretudo em ambientes hospitalares (CARVALHO, 2017).

O tratamento das infecções fúngicas por ação dessas leveduras se dá por meio de administração de medicamentos tópicos ou de uso sistêmicos, isolados ou associados, de acordo com a intensidade da enfermidade. Os produtos fármacos contendo antibióticos como a anfotericina B, fluconazol, cetoconazol e a nistatina são bastante empregados nesse tipo de tratamento. Entretanto, os antifúngicos possuem efeitos adversos, podendo desencadear nefrotoxicidade, hepatotoxicidade e reações de hipersensibilidade. Somado à problemática das infecções, ocorre o aprimoramento do mecanismo de resistência das cepas (JENSEN et al., 2015; SOBREIRA et al., 2020). Nesse sentido, é possível visualizar a importância de desenvolver novos estudos e ampliar a literatura acerca de novos compostos antibióticos.

### 3.4 Quitosana

A quitosana é um polímero linear obtido, geralmente, pela desacetilação alcalina da quitina, que é um polissacarídeo constituído majoritariamente de unidades 2-acetamido-2-desoxi-D-glicopiranosose, ligadas através de ligação  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4). Em resumo, quando o grau de desacetilação da quitina atinge aproximadamente 50 %, ela se torna solúvel em condições aquosas ácidas, dando origem a quitosana (TAVARIA et al., 2013). As estruturas químicas da quitina e da quitosana podem ser observadas na Figura 2.

**Figura 2** – Estrutura química da quitina e quitosana.



Fonte: Costa, 2015.

Esse composto tem alta importância econômica e ambiental, haja vista que é obtido da quitina, material presente nas carapaças de crustáceos, e é classificada como o segundo polissacarídeo mais abundante na natureza, sendo superado apenas pela celulose (SPIN, et al., 2008). Desse modo, a quitosana é um subproduto da comercialização de crustáceos, sendo produzida a partir dos resíduos desse processo. Em termos comerciais, esse polímero tem sido utilizado na produção de embalagens alimentícias, biorremediação, clareamento de sucos e em sistemas de liberação controlada de fármacos (AZEVEDO, 2007).

Atualmente, os biopolímeros detêm grande interesse da comunidade acadêmica devido a sua produção através de fontes renováveis de energia e a sua biodegradação. Por sua vez, a quitosana apresenta baixa toxicidade, biocompatibilidade, além de ser biodegradável, sendo amplamente utilizada em diferentes áreas, com sucesso na área médica, farmacêutica e alimentícia. Pode ser utilizada na formulação de produtos cosméticos, no desenvolvimento de pele artificial e em filmes desenvolvidos para a conservação de alimentos



perecíveis (BERGER et al., 2011; COSTA, 2015).

Em território nacional, a quitosana é bastante comercializada como alimento funcional, pois auxilia no controle de triglicerídeos e colesterol e vem sendo estudada há cerca de 150 anos e ao longo desse período, várias propriedades já foram comprovadas cientificamente. Dentre as mais importantes, destacam-se: a atividade antimicrobiana, efeito coagulante, analgésico e aceleração da cicatrização (TRÓCOLLI, 2015).

### 3.5 Aplicação de biofilmes

A demanda de biofilmes vem aumentando durante os últimos anos, devido as suas propriedades morfológicas, como espessura, densidade e forma de superfície. Além da ampliação das áreas de atuação. O mercado alimentício atual exige uma qualidade cada vez maior dos produtos, além de novas formas de embalagens que possam ter o descarte adequado sem prejudicar o meio ambiente.

Biofilme é um filme fino preparado a partir de materiais biológicos que age como barreira a elementos externos, como umidade e gases. Assim, protege o produto, elevando a sua vida de prateleira. Esses filmes também podem ajudar a manter características de qualidade desejáveis aos alimentos, como cor, aroma, acidez e doçura. Além disso, esse tipo de biomaterial pode conter propriedades funcionais: retardar a migração de umidade, de gases, de óleo, de soluto; oferecer uma integridade estrutural adicional aos alimentos; reter compostos aromáticos e funcionar como suporte para aditivos. Em alguns casos específicos, podem promover nutrientes ou otimizar as características sensoriais do produto (SANTOS, 2012).

Apesar do ramo alimentício explorar fortemente o uso de biofilmes, são inúmeras as áreas que permitem a aplicação dessas membranas. Na vertente médica, os biofilmes são empregados como curativos de ferimentos cutâneos. O estudo de Khodabakhshi et al. (2019) verificou a eficácia do biofilme de poliuretano incorporado com própolis, agindo como agente antibacteriano contra *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* em úlceras cutâneas em ratos.

Já Wanderley (2016) desenvolveu um estudo comparativo de métodos de obtenção de biofilmes de quitosana incorporado com insulina para o tratamento de Diabetes *Mellitus*, promovendo a liberação controlada de fármacos. Um sistema

carreador deve permitir que o fármaco a ser liberado tenha boa estabilidade, absorção e atividade farmacodinâmica. Foi comprovado nesse estudo que a insulina e a quitosana possuem compatibilidades químicas e que para melhor preservação da insulina o biofilme deve secar a frio.

## 4 METODOLOGIA

Esse trabalho de conclusão de curso é uma pesquisa acadêmica de cunho experimental. Os experimentos foram desenvolvidos nos laboratórios de microbiologia e química orgânica da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – *campus* Toledo.

### 4.1 Extrato de própolis

#### 4.1.1 Obtenção da amostra de própolis

A amostra de própolis verde foi cedida pela empresa Apis Global, sendo pertencente ao lote 001/19 e coletada no município de Caxambú, localizado no sul do estado de Minas Gerais.

#### 4.1.2 Controle de qualidade

A amostra foi caracterizada pela PROBee Consultoria e Controle de Qualidade de Produtos Apícolas e naturais através das seguintes análises: determinação do teor de cinzas, umidade, cera, impurezas mecânicas, fenólicos, flavonóides e solubilidade em álcool. O laudo foi fornecido pela empresa Apis Global.

#### 4.1.3 Preparo dos extratos de própolis

Os extratos foram obtidos utilizando-se quatro solventes orgânicos como líquidos extratores, sendo estes empregados tanto isolados como em variadas misturas de 2 ou 3 componentes, sempre em iguais proporções (1:1; 1:1:1).

Os 13 extratos foram agrupados em 3 planejamentos de carácter simplex-centróide, levando em consideração os solventes presentes nas misturas realizadas (Tabela 1).

**Tabela 1** – Planejamento experimental para elaboração dos extratos de própolis verde.

<b>Planejamento</b>	<b>Extratos</b>	<b>Abreviações</b>
A	Isopropanol	I
	Acetona	AC
	Acetato de etila	A
	Acetato de etila + acetona	AAC
	Acetato de etila + isopropanol	AI
	Acetona + isopropanol	ACI
	Acetato de etila + Acetona + Isopropanol	AACI
B	Acetona	AC
	Etanol	E
	Isopropanol	I
	Acetona + etanol	ACE
	Acetona + isopropanol	ACI
	Etanol + isopropanol	EI
C	Etanol + acetona + isopropanol	EACI
	Acetato de etila	A
	Etanol	E
	Isopropanol	I
	Acetato de etila + etanol	AE
	Acetato de etila + isopropanol	AI
	Etanol + isopropanol	EI
	Etanol + acetato de etila + isopropanol	EAI

Fonte: próprio autor, 2021.

Com o preparo em triplicata, foi pesado  $1,000 \pm 0,0010$  g de própolis verde, já cortada em pequenos pedaços para a aumentar a superfície de contato. Em um erlenmeyer de 125 mL, adicionou-se 25 mL do solvente ou da mistura extratora. Em seguida, o erlenmeyer foi completamente coberto com papel alumínio e vedado com parafilme a fim de evitar a oxidação do conteúdo. Após esse procedimento, o frasco foi acomodado em incubadora refrigerada de agitação orbital (Troth 6430) a 200 rpm e 40 °C, por 24 horas.

Após o período de incubação, o extrato foi filtrado utilizando-se funil de Buchner e bomba de vácuo (Prismatec 122-BCP). Posteriormente, a mistura filtrada foi concentrada utilizando-se evaporador rotativo (Solab SL-126). E o extrato

concentrado foi transferido para um balão volumétrico de 10 mL, que foi completado com o volume da mistura de solventes extratores ou solvente puro. Ao final, transferiram-se os extratos para frascos âmbar de 10 mL e estes foram armazenados em congelador a -18 °C até o momento das análises.

#### **4.1.4 Preparo do extratos de própolis para avaliação da atividade antifúngica**

O extrato concentrado obtido na etapa anterior foi submetido a secagem preliminar em capela de exaustão por 20 minutos, seguido de secagem com nitrogênio comprimido para obtenção de amostras livres dos solventes orgânicos utilizados, a fim de assegurar que os testes foram realizados apenas com os compostos bioativos extraídos.

Pesou-se  $10 \pm 0,01$  mg do extrato de própolis em microtubos de centrifugação e adicionou-se 100  $\mu$ L de dimetilsulfóxido (DMSO) para solubilizar o extrato seco no meio de cultura. O sistema foi agitado em vortex até a completa dissolução do extrato e o volume foi completado com 900  $\mu$ L de caldo Rosewell Park Memorial Institute (RPMI) 1640. Novamente, a mistura foi homogeneizada em vortex, resultando em uma solução na concentração de 10 mg/mL.

## **4.2 Concentração inibitória mínima (CIM) e concentração fungicida mínima (CFM)**

### **4.2.1 Preparo dos inóculos fúngicos**

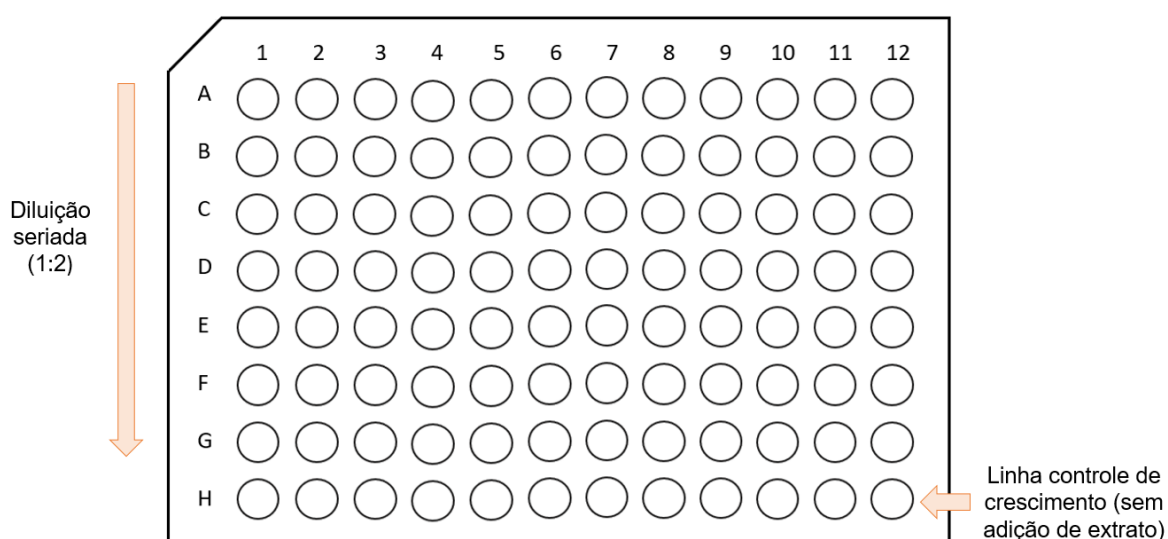
As culturas das leveduras *C. albicans* ATCC 26790, *C. glabrata* ATCC 2001 e *C. tropicalis* ATCC 28707 utilizadas são provenientes do banco de cultura da professora da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Tatiana Tiunan. Essas cepas estavam mantidas a 6-10 °C em ágar Sabouraud. Para ativação, foram inoculadas em caldo Sabouraud e incubadas a 35 °C por 24 horas sem agitação. Ao início do experimento foram preparadas diluições das culturas em solução salina 0,9 % (m/v) de acordo com a escala 0,5 de McFarland a qual confere uma padronização em aproximadamente  $10^6$  cel/mL. Por fim, a suspensão de leveduras foi diluída em caldo RPMI (1:20), resultando em uma concentração de  $5 \times 10^4$  cel/mL.

#### 4.2.2 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e da concentração fungicida mínima (CFM)

A CIM para leveduras foi determinada pela técnica de microdiluição em caldo, de acordo com a norma M27-A2 do NCCLS (2002). Utilizou-se meio de cultura Rosewell Park Memorial Institute 1640 (RPMI), tamponado com 0,165 mol/L de solução tampão ácido-3-(N-morfolino)propanossulfônico.

Em microplacas estéreis de 96 poços, acrescentou-se 100 µL de meio RPMI em todos os poços. Foi feita a adição de 100 µL da solução de meio RPMI com os extratos de própolis a 10 mg/mL na linha A (Figura 3). Dessa forma, a mistura presente nos poços da linha A passou a ter concentração de 5 mg/mL de extrato seco de própolis. Nos poços das linhas sequenciais foi realizada diluição seriada com razão 1:2, com a transferência de 100 µL da linha anterior para os poços da próxima linha, sucessivamente até a linha G, onde 100 µL foram retirados destes e descartados. Dessa forma, foi possível avaliar 7 concentrações de extrato de própolis: 5; 2,5; 1,25; 0,63; 0,31; 0,16 e 0,08 mg/mL. A linha H foi utilizada para controle do crescimento microbiano, dessa forma, não foi acrescentado extrato nestes poços.

**Figura 3** – Representação ilustrativa da disposição das amostras de extratos brutos de própolis verde em microplaca de 96 poços.



Fonte: próprio autor, 2021.

Já os inóculos fúngicos previamente padronizados ( $5 \times 10^4$  cel/mL) teve 10  $\mu$ L acrescidos em cada poço da placa, levando à concentração celular de  $5 \times 10^3$  cel/mL. As placas foram incubadas a 35 °C por 24h em estufa (Ethink 411D).

A CIM foi determinada através da menor concentração do extrato capaz de inibir o crescimento fúngico (ausência de turvação). Enquanto para a CFM, foi realizado o subcultivo dos poços que não apresentaram turvação em Ágar Sabouraud dextrose com cloranfenicol (SDC), da cultura de cada poço que demonstrou inibição de crescimento, juntamente com o controle positivo, a fim de avaliar o crescimento de colônias.

Para confirmar a leitura da CIM foram acrescidos 10  $\mu$ L de solução de cloreto 2,3,5-Trifeniltetrazólio a 0,5 % (m/v) em cada um dos 96 poços da microplaca. Estas foram novamente incubadas por 3 horas a 35 °C. O cloreto 2,3,5-Trifeniltetrazólio é uma substância incolor na sua forma oxidada e quando reduzido por microrganismos sintetiza o formazano, composto capaz de conferir a coloração rosa. Dessa forma, foi considerado que os poços que não apresentaram a coloração rosa, de fato, havia a inibição do crescimento microbiano (NCCLS, 2002).

Esse método foi também reproduzido para amostras de DMSO e quitosana, com a finalidade de verificar a CIM e CFM desses compostos. Além da reprodução com nistatina para controle positivo.

As amostras foram analisadas em triplicata e com repetições dos testes em momentos distintos.

### **4.3 Análise estatística**

Para a conclusão da etapa de otimização do extrato de própolis, os estudos foram conduzidos utilizando o software Statistica®, versão 12.0. Em todas as análises foi utilizado o nível de significância de 0,05. Foram analisados os seguintes parâmetros: a composição do solvente extrator utilizada no planejamento experimental simplex-centróide (Tabela 1), a análise de variância dos resultados, a modelagem e construção dos gráficos de superfície de resposta e a aplicação das funções de desejabilidade para determinar a composição das misturas extratoras que resultam no menor valor de CIM.

## 4.4 Biofilme de quitosana incorporado com extrato de própolis

### 4.4.1 Elaboração do filme

Após a determinação da composição do solvente extrator que resultou na minimização dos valores de CIM para as leveduras estudadas, os respectivos extratos foram incorporados no biofilme. Ou seja, foram utilizados três diferentes extratos, cada um representando a melhor condição de extração de cada planejamento. Assim, foram também identificados como extratos ACI, ACE e AI. Foram produzidos também biofilmes de controle positivo (C+) e negativo (C-), de modo que o C+ teve nistatina em DMSO (1 mg/mL) incorporada ao filme, enquanto o C- trata-se do biofilme sem nenhuma substância incorporada.

O biofilme de quitosana foi produzido seguindo a técnica de *casting*, que consiste na desidratação de uma solução filmogênica (SF). As SF foram preparadas com 2 % de quitosana em ácido acético (0,5 mol/L), devido a particularidade desse biopolímero de maior solubilidade em meio ácido. Para a melhor plasticidade do filme, acrescentou-se a essa formulação-base 0,5 % de ácido oleico. O pH da SF foi ajustado e, nesse estágio, adicionou-se os extratos a serem avaliados na concentração de 1 %. A SF foi então submetida ao aquecimento de 50 °C sob agitação constante por 25 minutos (Even HJ-5). Após esse processo, 20 mL da SF foi cuidadosamente aplicada em placas de teflon e levadas a secagem em estufa a 40 °C por 16 horas (ARAÚJO, 2014; GALINDO, 2017).

Já prontos, os biofilmes esfriaram em dessecador e ao chegar à temperatura ambiente, foram armazenados separadamente em placas de Petri e acondicionados a 4 °C até o momento das análises.

### 4.4.2 Avaliação macroscópica

A avaliação visual das condições morfológicas macroscópicas foi realizada para todos os filmes obtidos, como a presença de bolhas, rachaduras ou separação de fases. As membranas que apresentaram as melhores condições foram utilizadas para os testes posteriores.



### 4.3.3 Espessura

Utilizando um paquímetro (FORTGPRO-FG8330) de precisão de 0,05 mm, foram medidos cinco pontos aleatórios do biofilme e calculada a média aritmética dos valores para determinar a espessura total de cada biofilme.

### 4.3.4 Permeabilidade ao vapor

A permeabilidade ao vapor de água foi determinada através do método gravimétrico padrão E96/E96M com modificações. Em pequenas placas de Petri foi adicionada a sílica gel dessecante, previamente ativada em estufa de secagem (Solab SL-100) por 3 horas a 60 °C, para retirar qualquer resquício de umidade. Posteriormente, as amostras dos biofilmes foram cuidadosamente seladas na parte superior das placas com parafilme. É importante que a distância entre a sílica gel dessecante e o biofilme seja próxima de 6 mm.

Esse sistema foi colocado em dessecador contendo solução de cloreto de cálcio 10 % (m/v) para conferir a umidade relativa de 75 % dentro do dessecador. O sistema foi mantido em estufa a 25 °C. Em intervalo de tempo padronizado (24 horas), foram feitas 5 pesagens para obter o ganho de massa da amostra, a fim de determinar a razão de transferência de vapor de água através do filtro para o meio dessecante (sílica) (LIMBERGER, 2017). Utilizou-se a equação (01) para calcular a transmissão de vapor de água (TVA) e a equação (02) para calcular a permeabilidade ao vapor de água (ASTM, 2002).

$$TVA = \frac{M}{t \cdot A} \quad (01)$$

$$PVA = \frac{(TVA \times e)}{ps \times (UR1 - UR2)} \quad (02)$$

Onde, PVA= Permeabilidade ao vapor e água (g.dia<sup>-1</sup>.m<sup>-1</sup>.kPa<sup>-1</sup>); e= Espessura média do corpo de prova (m); ps= Pressão de saturação de vapor a temperatura do ensaio (Pa); UR1= Umidade relativa dentro do dessecador (75 %); UR2= Umidade relativa dentro da placa (0 %); TVA= Taxa de transmissão ao vapor de água (g.dia<sup>-1</sup>.m<sup>-2</sup>); m= Ganho de massa de água (g); t= tempo (h) e A= Área de permeação (m<sup>2</sup>).

#### 4.3.5 Solubilidade em água

Nessa etapa, biofilmes de 2 cm<sup>2</sup> secos em estufa a 105 °C, foram pesados e colocados em erlenmeyers contendo 50 mL de água destilada. O sistema foi submetido a agitação de 140 rpm a 25 °C em incubadora refrigerada de agitação orbital (Troth 6430) por 24 horas e, novamente, foram secos em estufa a 105 °C por 24 horas. Após encontrar a massa seca final, foi calculada a solubilidade em água pela equação (03) (GALINDO, 2017).

$$SOL = \frac{mi-mf}{mi} \times 100 \quad (03)$$

Onde mi = massa seca inicial (g); mf = massa seca final (g); e SOL= solubilidade em água (%).

#### 4.3.6 Atividade antifúngica por macrodiluição

A verificação da atividade antifúngica contra *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. glabrata* de todos os biofilmes produzidos foi realizada pelo método de macrodiluição em caldo da norma M27-A2 da NCCLS (2002) com modificações. Inicialmente, foram preparadas as amostras dos biofilmes, que posteriormente foram cortados em quadrados de 1 cm<sup>2</sup> e 0,5 cm<sup>2</sup> para que duas quantidades distintas do filme fossem testadas sob as mesmas condições. As amostras já cortadas foram esterilizadas por radiação ultravioleta em capela de fluxo laminar vertical (Veco Bioseg 09) por 30 minutos (15 minutos cada lado).

Em tubos de ensaio pequenos foram reproduzidas as mesmas condições de concentração celular empregadas anteriormente nos testes de CIM e CBM dos extratos de própolis (5 x 10<sup>3</sup> cel/mL). Para tal, foram pipetados 2,985 mL de caldo RPMI e adicionadas as amostras esterilizadas do biofilme. Pipetou-se 0,015 mL do inóculo previamente padronizado de acordo com a escala 0,5 de MacFarland e os tubos foram incubados sem agitação a 35 °C, durante o período de 24 horas. O resultado foi obtido por meio da comparação visual da quantidade de crescimento (turvação) nos tubos contendo as amostras em relação ao tubo controle de crescimento celular (sem nenhum biofilme).

Dos tubos que não apresentaram turvação e do tubo de controle de crescimento celular foram realizados subcultivos em placas com ágar SDC e após

24 horas de incubação a 35 °C foi verificado o crescimento de colônias. Nos tubos que tiveram crescimento celular nas placas, concluiu-se que o biofilme apresentou atividade fungicida. Já para os casos de presença colônias, pode-se inferir que o o biofilme apresentou atividade fungistática (NCCLS, 2002).

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Amostra de própolis

A amostra cedida pela Apis Global foi submetida a análises de controle de qualidade, solicitadas pela própria empresa, para verificar se as mesmas seguem os parâmetros exigidos. A umidade e o teor de cinzas afetam a qualidade do produto e por meio destas avaliações podem ser indicadas as condições de armazenamento ou até mesmo identificar possíveis fraudes (BRASIL, 1988). Além disso, o teor de compostos fenólicos e flavonoides influenciam diretamente na atividade biológica da própolis (COSTA, 2015)

Os parâmetros analisados da própolis foram comparados com os limites estabelecidos na Portaria nº. 025 de 31 de julho de 2000 da Divisão de Inspeção de Produtos de Origem Animal (Tabela 2). É possível observar que a amostra de própolis está dentro de todos os limites estabelecidos quanto ao percentual de umidade, cinzas, ceras e flavonoides.

**Tabela 2** – Características físico-químicas de própolis verde de Minas Gerais.

<b>Parâmetro avaliado</b>	<b>Resultado (%)</b>	<b>Limite da legislação (%)</b>
<b>Umidade</b>	5,9	Máximo 8
<b>Cera</b>	17	Máximo 25
<b>Cinzas</b>	2,3	Máximo 5
<b>Impureza mecânica</b>	26	Máximo 40
<b>Fenólicos</b>	8,2	Mínimo 5
<b>Flavonoides</b>	2,4	Mínimo 0,5
<b>Solúvel em etanol</b>	70,2%	Mínimo 35

Fonte: próprio autor, 2021.

## 5.2 Concentração inibitória mínima (CIM) e concentração fungicida mínima (CFM)

Ao todo foram testadas sete concentrações dos extratos obtidos, sendo a primeira 5,00 mg/mL e as restantes obtidas por diluição seriada (1:2): 2,50; 1,25; 0,63; 0,31; 0,16 e 0,08 mg/mL. Todos os extratos testados apresentaram ação antifúngica contra as três espécies de *Candida* utilizadas.

A literatura acerca dos extratos de própolis é predominantemente composta por solventes extratores hidroalcoólicos, havendo uma lacuna de informações a respeito da capacidade de extração das substâncias biologicamente ativas por demais solventes orgânicos. Em uma visão geral, os solventes testados de menores concentrações de CIM e CBM (Tabela 3) foram da mistura de acetona + etanol variando de 0,76 a 2,50 mg/mL. Os baixos valores de CIM e CFM obtidos pela mistura de acetona + etanol podem ser atribuídos às diferentes características químicas dos solventes utilizados na extração. A acetona é um solvente polar aprótico, enquanto o etanol é polar prótico. Dessa forma, as interações estabelecidas durante a extração ocorrem com compostos distintos, conferindo a extração de uma maior quantidade de substâncias de interesse (PEREZ, 2018).

Os resultados de CIM e CBM foram menores ao extrato obtido com acetona 100% (1,46 a 3,75 mg/mL) que a etanol 100% (2,50 a 3,33 mg/mL). O que leva a necessidade de investigação da acetona como um solvente mais eficiente, pois com os resultados obtidos foi possível sugerir que a acetona tem maior potencial de extração de fenóis e flavonoides que o etanol.

Notou-se nos dois experimentos reproduzidos a repetição e proximidade dos resultados para triplicata das amostras dos extratos testados. Assim, fica assegurado que o método realizado foi capaz de extrair os compostos que apresentam a atividade antimicrobiana em todos os exemplares, apresentando apenas pequenas variações.

Dos demais solventes empregados, apenas a mistura de isopropanol + acetato de etila apresentou atividade antifúngica mais próxima dos resultados da acetona + etanol, uma faixa de 1,25 a 2,50 mg/mL, reafirmando o bom potencial de extração com solventes combinados.

Nos ensaios realizados, a espécie *C. tropicalis* demonstrou ser mais suscetível às menores concentrações de extratos que as demais espécies testadas. Resultado que se contrapõe aos estudos desenvolvidos por Sforcin et al. (2001). Sforcin chegou

à conclusão de que *C. albicans* é mais suscetível às concentrações baixas de própolis verde do que *C. tropicalis*. No entanto, a própolis verde estudada pelo autor é oriunda do estado de São Paulo, apresentando algumas diferenças em sua composição, o que pode acarretar diferenças de propriedades biológicas.

Já Hoseto et al. (2016) asseguram que a *C. albicans* tem maior resistência às concentrações dos extratos de própolis em relação a *C. Tropicalis*, haja vista que a CIM e CFM ficaram em 95,75 µg/mL e 46,88 µg/mL, respectivamente. Os resultados obtidos nos experimentos também corroboram com de Fernandes et al. (1995) que chegaram à CIM mais baixa para *C. tropicalis* em relação a *C. glabrata*.

*C. glabrata* exibiu os menores valores de CIM (0,76 mg/mL) para o extrato acetona + etanol. Siqueira (2015) obteve CIM e CFM de 64 µg/mL para a mesma espécie, apontando potencial fungicida à própolis brasileira. Por outro lado, a própolis iraniana teve a CFM para *C. glabrata* determinada em aproximadamente 5 mg/mL (SHOKR et al., 2011).

O testes de CIM do DMSO e da quitosana apontaram que nas concentrações utilizadas nos testes, estas substâncias não apresentaram atividade antimicrobiana contra as leveduras testadas. Para a atividade antifúngica do DMSO foram utilizadas concentrações  $\leq 100 \mu\text{L/mL}$  (concentração usada na diluição do extrato seco de própolis) e para a quitosana,  $\leq 20 \text{ mg/mL}$  (concentração correspondente a usada na SF), respectivamente. Assim, conclui-se que esses compostos não interferiram na determinação da CIM dos extratos de própolis.

Já a nistatina testada apresentou resultado de CFM de 0,03 mg/mL e CIM 0,06 mg/mL.

**Tabela 3** – Concentração inibitória mínima (CIM) e concentração fungicida mínima (CFM) em mg/mL dos extratos de própolis verde.

Planejamento	Extrato	<i>C albicans</i>		<i>C glabrata</i>		<i>C tropicalis</i>	
		CIM	CFM	CIM	CFM	CIM	CFM
<b>A</b>	I	2,5	2,5	3,33	4,58	2,08	2,92
	AC	3,75	3,75	1,87	1,87	1,46	1,46
	A	2,92	4,17	2,92	4,17	2,08	2,29
	AAC	2,29	5,2	1,44	1,44	2,5	2,5
	AI	2,5	2,5	1,25	1,46	1,25	1,46
	ACI	2,5	3,54	1,46	1,88	1,25	3,75
	AACI	5,00	>5,00	2,5	>5,00	5,00	>5,00
	AC	3,75	3,75	1,87	1,87	1,46	1,46
<b>B</b>	E	2,50	3,33	2,50	2,92	2,50	2,50
	I	2,50	2,50	3,33	4,58	2,08	2,92
	ACE	2,50	2,50	0,76	0,76	1,25	1,46
	ACI	2,5	3,54	1,46	1,88	1,25	3,75
	EI	4,58	4,58	1,25	1,87	3,33	2,29
	EACI	5,00	>5,00	3,75	>5,00	5,00	>5,00
	A	2,92	2,92	2,92	4,17	2,08	2,29
<b>C</b>	E	2,50	3,33	2,50	2,92	2,50	2,50
	I	2,5	2,5	3,33	4,58	2,08	2,92
	AE	2,50	2,50	0,76	0,76	1,25	1,46
	AI	2,5	2,5	1,25	1,46	1,25	1,46
	EI	4,58	4,58	1,25	1,87	3,33	2,29
	EAI	5,00	>5,00	3,75	>5,00	5,00	>5,00

Fonte: próprio autor, 2021.

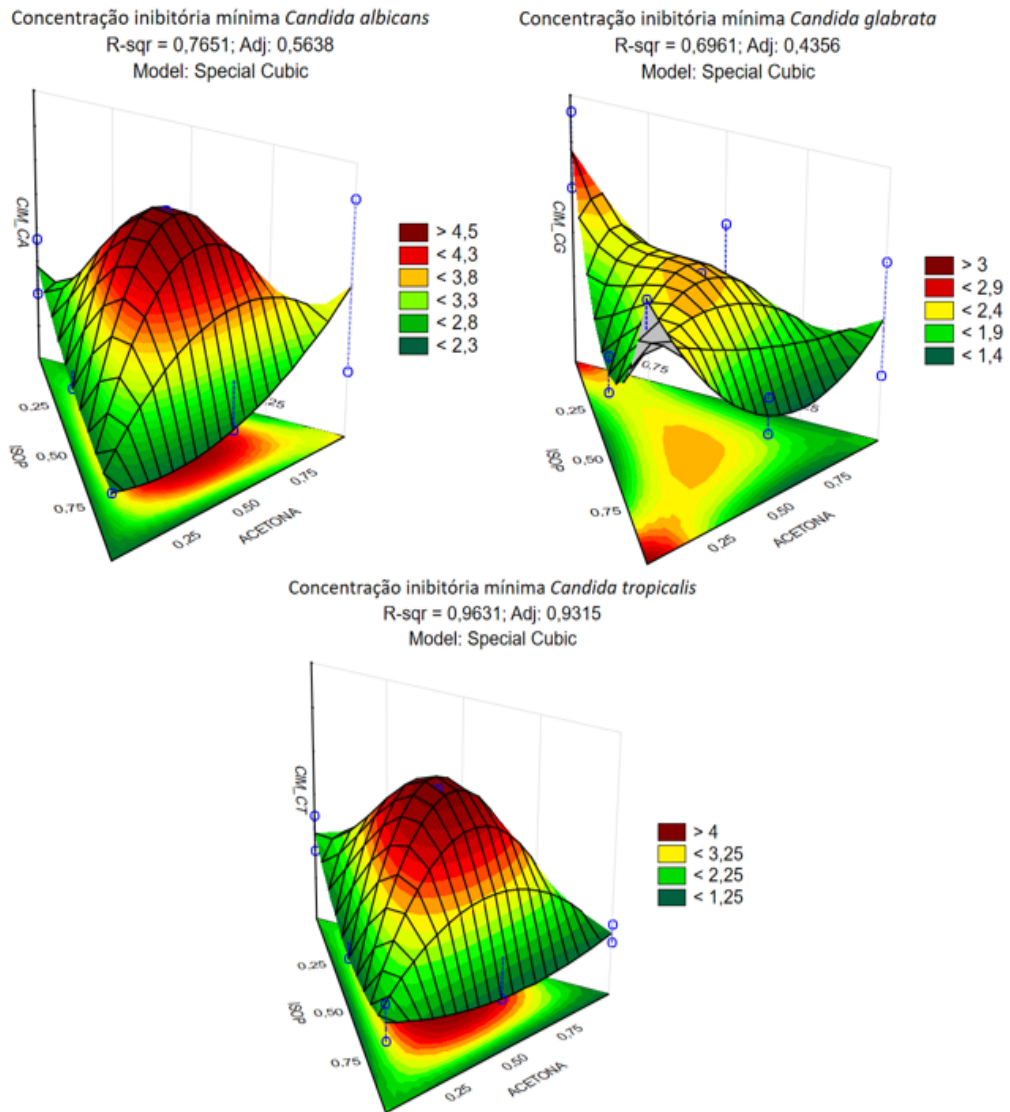
### 5.3 Otimização dos extratos de própolis verde

Por meio da ASR primeiramente foram obtidas as melhores proporções dos solventes extratores (etanol, acetona, acetato de etila e isopropanol) para cada espécie de *Candida* em cada um dos planejamentos A, B e C separadamente.

Como é possível visualizar nos gráficos (Figura 4), quanto mais verde a região, menor é o valor da CIM. Isso indica a região de localização do ponto ótimo dos solventes do extrato pela CIM. Portanto, no planejamento A, para as espécies *C. albicans*, o que se observa é que o aumento da fração de isopropanol nas misturas binárias acetato de etila + isopropanol e acetona + isopropanol atua diminuindo os valores de CIM, que alcança o menor valor para o extrato obtido com isopropanol 100 %. Para *C. glabrata* os menores valores de CIM estão entre a mistura binária de acetona + acetato de etila. Por fim, *C. tropicalis* apresentou os valores baixos de CIM na região da mistura de proporção semelhante de acetona e isopropanol, mas houveram valores ainda mais baixos para a extração apenas com acetona.



**Figura 4** – Análise de Superfície de Resposta para *Candida albicans*, *Candida glabrata* e *Candida tropicalis* no planejamento A: acetato de etila, acetona e isopropanol.

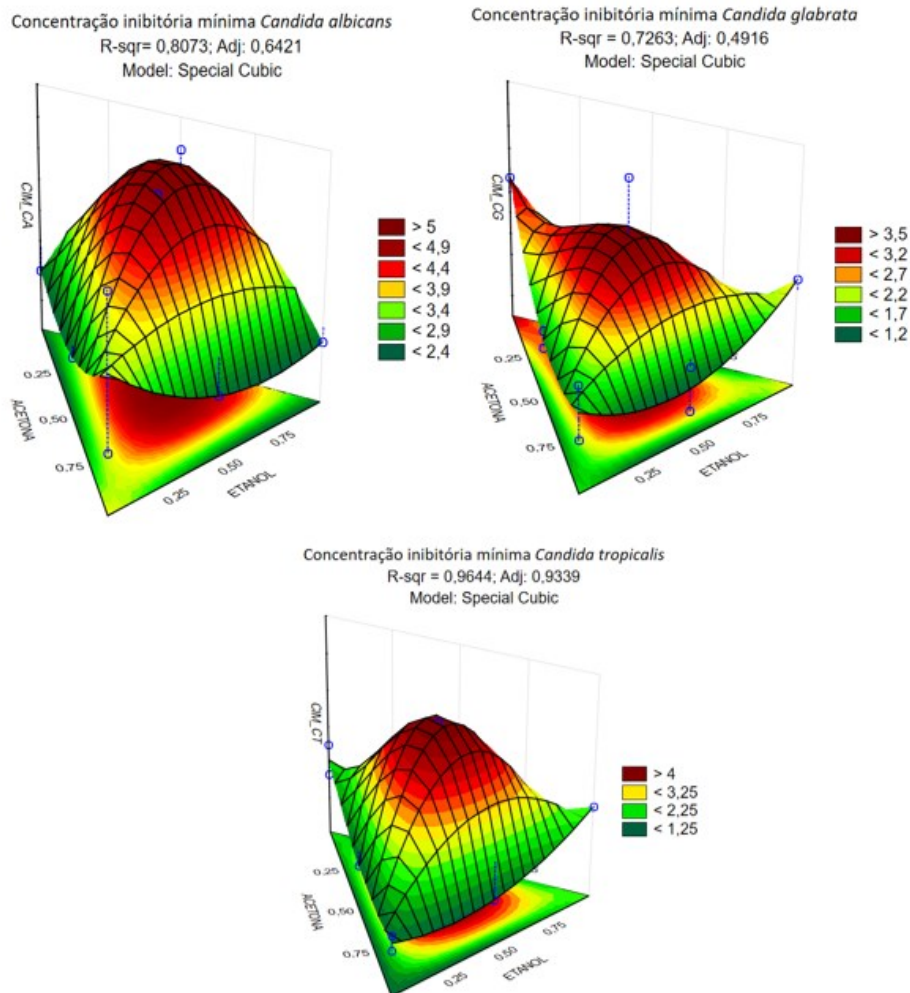


Fonte: próprio autor, 2021.

Para o planejamento B (Figura 5), *C. albicans* teve menores valores de CIM na mistura de acetona + etanol com resultados ainda menores para a extração realizada com etanol 100 %. Na ASR da *C. glabrata*, os melhores resultados encontram-se na mistura binária de acetona + etanol com o menor valor de CIM localizado entre 75 % acetona e 25 % de etanol. Para a *C. tropicalis*, mais uma vez, os menores valores de CIM estão entre a mistura de acetona + etanol. No entanto, o resultados ainda

menores de CIM são encontrados para acetona 100 %.

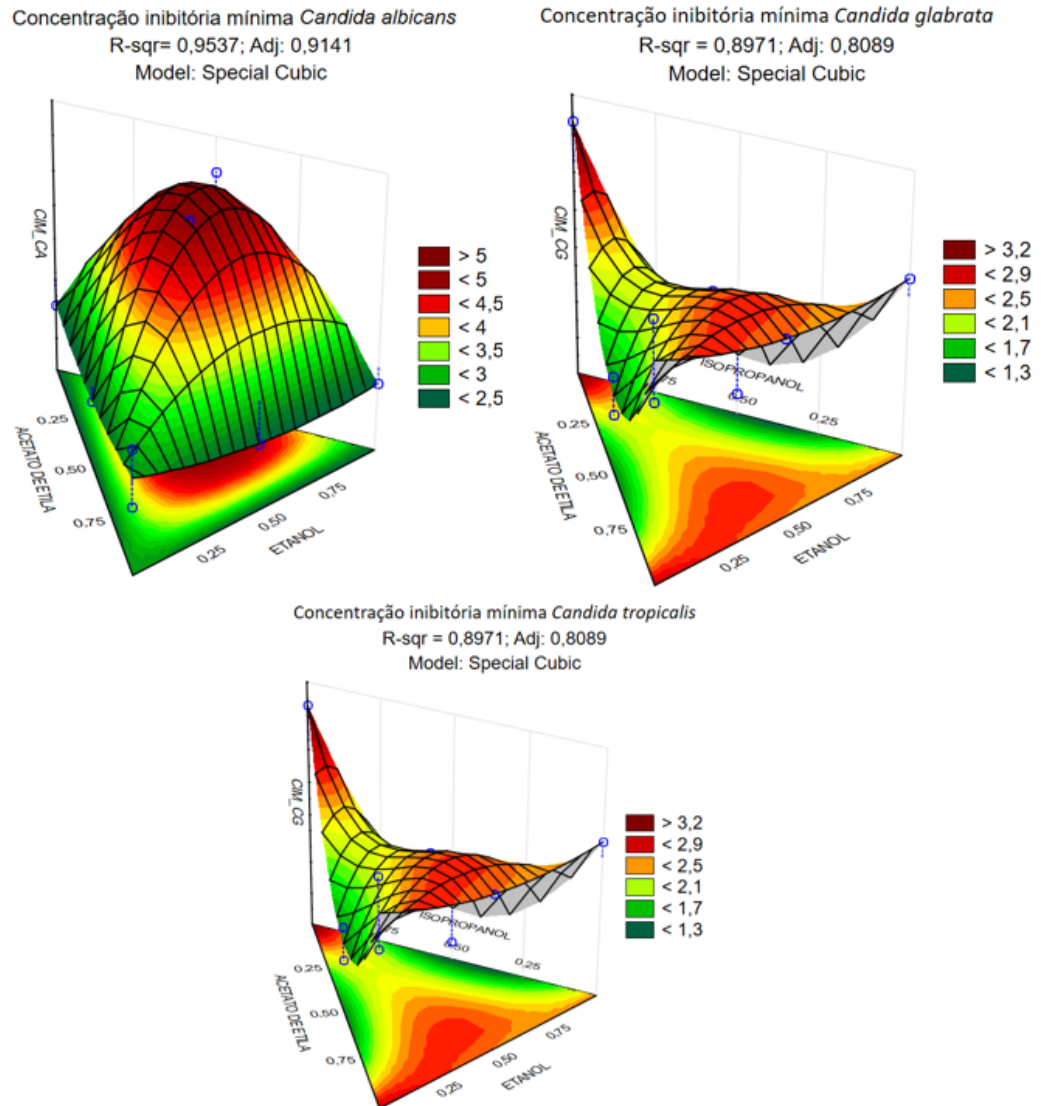
**Figura 5** – Análise de Superfície de Resposta para *Candida albicans*, *Candida glabrata* e *Candida tropicalis* no planejamento B: acetona, etanol e isopropanol.



Fonte: próprio autor, 2021.

No planejamento C (Figura 6), apenas *C. albicans* demonstrou menores CIMs para etanol + acetato de etila, tendo os melhores resultados em etanol 100 %. As espécies *C. glabrata* e *C. tropicalis*, por sua vez, apresentaram gráficos semelhantes, com os menores valores de CIM para a mistura de acetato de etila + isopropanol 1:1.

**Figura 6** – Análise de Superfície de Resposta para *Candida albicans*, *Candida glabrata* e *Candida tropicalis* no planejamento C: acetato de etila, etanol e isopropanol.



Fonte: próprio autor, 2021.

Esses resultados foram aplicados a equação de desejabilidade global, a fim de encontrar estatisticamente a melhor condição de extração, a partir da minimização da CIM, de modo justo para todas as espécies testadas (Tabela 4).

**Tabela 4** – Extratos de própolis verde otimizados por análise de superfície de resposta de acordo com os planejamentos experimentais A, B e C, valores teóricos estimados de concentração inibitória mínima para cada extrato (CIM) e valores experimentais obtidos .

Planejamento	Extrato otimizado	Concentração	CIM esperada (mg/mL)	CIM experimental (mg/mL)
A	Acetona + isopropanol (ACI)	1:1	2,54 para <i>C. albicans</i>	2,50 para <i>C. albicans</i>
			1,41 para <i>C. glabrata</i>	1,46 para <i>C. glabrata</i>
			1,23 para <i>C. tropicalis</i>	1,25 para <i>C. tropicalis</i>
B	Acetona + etanol (ACE)	1:1	2,50 para <i>C. albicans</i>	2,50 para <i>C. albicans</i>
			1,14 para <i>C. glabrata</i>	0,76 para <i>C. glabrata</i>
			1,25 para <i>C. tropicalis</i>	1,25 para <i>C. tropicalis</i>
C	Acetato de etila + isopropanol (AI)	1:1	2,54 para <i>C. albicans</i>	2,50 para <i>C. albicans</i>
			1,45 para <i>C. glabrata</i>	1,25 para <i>C. glabrata</i>
			1,25 para <i>C. tropicalis</i>	1,25 para <i>C. tropicalis</i>

Fonte: próprio autor, 2021.

As misturas de solventes orgânicos como líquidos extratores foram determinadas como condições ótimas de extração nos três planejamentos, resultado já esperado, devido aos resultados da CIM e CFM. Ademais, sabe-se que na composição da própolis estão presentes compostos com potenciais bioativos variados que dependem da sua solubilidade e da constante dielétrica do solvente para que ocorra a extração (VOLPI; BERGONZINI, 2006). Nesse sentido, é mais provável que sejam extraídos uma maior quantidade e variedade de compostos distintos utilizando

uma combinação de solventes (SHAIDI; NACZK,1995).

As proporções determinadas pela ASR foram semelhantes às concentrações já testadas anteriormente. Além disso, os valores teóricos de CIM, gerados pela ASR, foram próximos aos valores de CIM obtidos experimentalmente. Ou seja, os dados analisados apresentaram resultados condizentes, justificando os bons valores de ajuste (R-sqr) do modelo estatístico empregado.

AA acetona mais uma vez se destacou nos resultados, estando presente em 2 dos 3 extratos otimizados, bem como o isopropanol que embora não tenha desempenhado as melhores atividades na CIM e CFM isoladamente, se mostrou eficaz quando combinado com outros solventes. Esses resultados abrem margem para a investigação mais profunda do potencial extrativo dos solventes citados em relação à própolis.

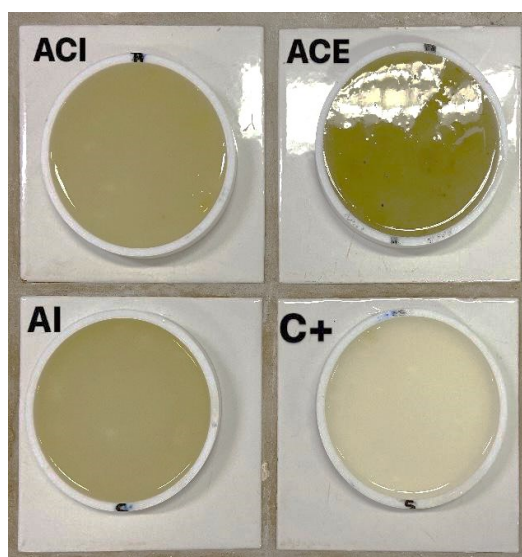
#### **5. 4 Desenvolvimento e caracterização dos biofilmes**

Os extratos resultantes da otimização foram incorporados à formulação do biofilme de quitosana para avaliar suas influências em relação à CIM e algumas características físico-químicas quando combinados com a quitosana. Dessa forma, foram produzidos filmes, incorporando separadamente, os extratos de acetona + isopropanol (ACI), acetona + etanol (ACE) e acetato de etila + isopropanol (AI). Além disso, foram elaborados biofilmes sem nenhum extrato incorporado para o controle negativo (C-) e com nistatina incorporada para o controle positivo (C+).

Os biofilmes foram produzidos com sucesso pela técnica de *casting*. Após secos, foi possível retirá-los das placas de teflon manualmente e com facilidade. Em se tratando dos aspectos visuais, foi observado a coloração branca no controle negativo, enquanto o controle positivo exibiu tons amarelados. Ambos resultaram em uma película homogênia, de superfície lisa e opaca.

Já os filmes contendo os extratos incorporados demonstraram coloração verde, também de nuances opacas e superfície lisa. Os filmes com ACI e AI apresentaram homogeneidade, mas em contrapartida, no filme com ACE, notou-se pequenos pontos de cor verde mais intensa, indicando que não houve solubilização uniforme entre a SF e o extrato (Figura 7).

**Figura 7** – Soluções filmogênicas incorporadas com extrato de própolis verde utilizando soluções de acetona + isopropanol (ACI), acetona + etanol (ACE), acetato de etila + isopropanol (AI) e nistatina (C+) dispostas em placas de teflon.



Fonte: próprio autor, 2021.

De acordo com Jimenez et al. (2012), para impedir problemas mecânicos e de conservação, o biofilme deve ter a espessura mais homogênea possível. Por isso, a espessura dos biofilmes é um parâmetro de controle fundamental. Apesar disso, na técnica de *casting* é difícil haver alta uniformidade de espessura em decorrência ao processo de secagem e evaporação do solvente (SOBRAL, 1999). Os resultados das características físico-químicas avaliadas do biofilme, estão apresentados na Tabela 5.

**Tabela 5** - Resultados expressos em média e desvio padrão da espessura, permeabilidade de vapor de água (PVA) e solubilidade dos biofilmes.

Biofilme	Espessura (mm)	PVA (g/diam <sup>2</sup> kPa)	Solubilidade (%)
C+	0,18 ± 0,01	16,41 ± 0,97	30,44 ± 1,16
C-	0,18 ± 0,01	11,57 ± 1,12	27,62 ± 1,30
ACI	0,25 ± 0,01	12,63 ± 0,46	27,60 ± 1,43
ACE	0,16 ± 0,00	16,96 ± 1,15	27,72 ± 0,70
AI	0,23 ± 0,01	14,65 ± 104	28,73 ± 0,76

Fonte: próprio autor, 2021.

A respeito da espessura, notou-se que os extratos ACI e AI aumentaram a espessura do filme. Este comportamento também foi observado por Galindo (2017) em biofilmes de quitosana incorporado com óleos essenciais.

Os fatores externos como temperatura, pressão e umidade relativa influenciam diretamente na PVA, por isso, o experimento foi reproduzido em condições externas padronizadas. No entanto, fatores físico-químicos também interferem nessa característica. Dentre as amostras de biofilme testadas, o filme com o extrato ACE incorporado apresentou maior resultado, seguido do filme C+ e esses mesmos biofilmes apresentaram anteriormente valores mais baixos de espessura. Como a PVA se trata da quantidade de vapor de água que consegue adentrar as placas seladas com o biofilme, espessuras menores permitem a permeação do vapor de modo mais fácil, pois a barreira a ser ultrapassada é menor (WOLF, 2007).

Os valores de PVA determinados são próximos aos exibidos por Nascimento et al (2013) que desenvolveram experimentos com biofilmes de quitosana com argila na composição. O autor chegou a 10,29 g/diam<sup>2</sup>kPa para o biofilme apenas com quitosana e 13,2 g/diam<sup>2</sup>kPa para o filme com argila incorporada, que foram resultados próximos aos obtidos nesse trabalho.

Já para a solubilidade, houve uma pequena variação de 27,60 a 30,44 %, indicando baixa solubilidade em água. O filme apresentou comportamento hidrofílico com toda a água absorvida resultando na expansão do material. Os valores encontrados compactuam com a solubilidade de 30,92 %, determinada por Hafsa et al. (2016) que também relataram o inchaço do filme. Já os autores Zaman et al. (2018) e Nascimento et al. (2013) encontraram solubilidades ainda mais baixas, 21,17 % para filme de 1,5 % (m/v) de quitosana e 12,5 % para filme de 2 % (m/v) de quitosana, respectivamente.

## **5.5 Atividade antifúngica dos biofilmes**

Para verificar a eficácia antifúngica dos biofilmes produzidos foram reproduzidas macrodiluições nas mesmas condições da microdiluição, mas dessa vez, testando fragmentos de biofilme de 1,0 cm<sup>2</sup> e 0,5 cm<sup>2</sup> (Tabela 6).

**Tabela 6** – Atividade antimicrobiana dos biofilmes por macrodiluição.

Área do filme (cm <sup>2</sup> )	Biofilme	<i>C. albicans</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. tropicalis</i>
1	C+	-	+	+
	C-	-	-	-
	ACI	-	+	+
	ACE	-	+	+
	AI	-	-	+
0,5	C+	-	+	+
	C-	-	-	-
	ACI	-	+	+
	ACE	-	+	-
	AI	-	-	+

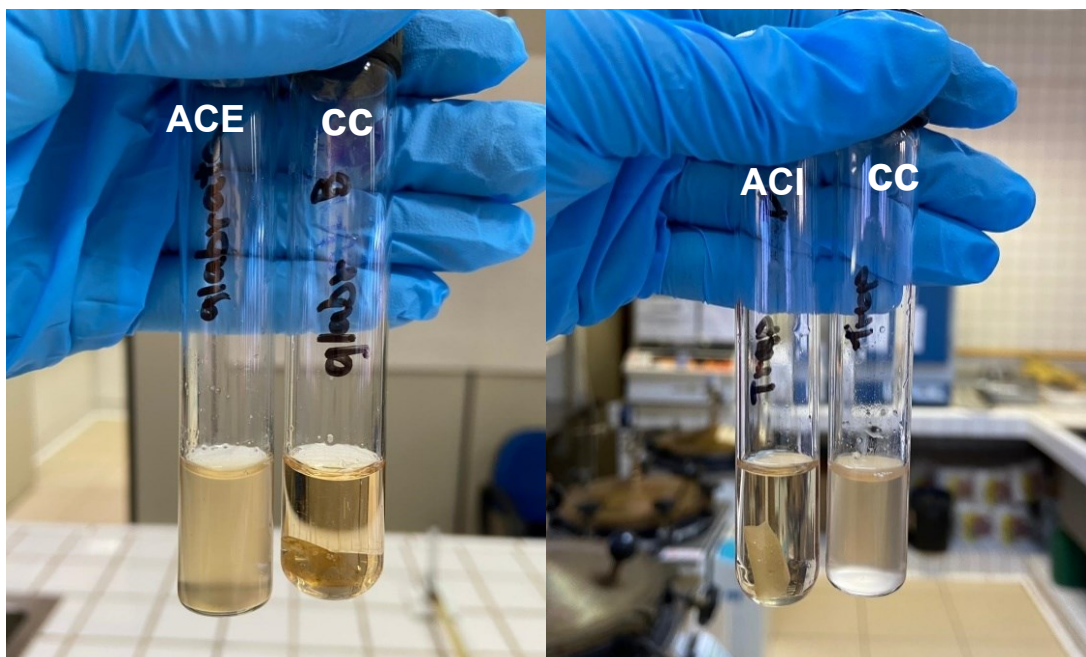
(+= apresentou atividade antimicrobiana; -= sem atividade antimicrobiana)

Fonte: próprio autor, 2021.

O biofilme incorporado com extrato ACI possibilitou a liberação do extrato no meio de cultura e inibiu o crescimento de *C glabrata* e *C tropicalis* quando testado com 1,0 e 0,5 cm<sup>2</sup>. Já o biofilme contendo ACE também apresentou atividade antifúngica para essas duas espécies quando testado com 1,0 cm<sup>2</sup> (Figura 8), enquanto que com 0,5 cm<sup>2</sup> sua eficácia foi comprovada apenas para *C glabrata*. O biofilme com AI foi o único a demonstrar atividade apenas para espécie *C. tropicalis*. No entanto, manteve sua atividade mesmo utilizando uma fração menor do biofilme.



**Figura 8** – Comparação visual da atividade antifúngica em relação ao controle de crescimento (CC): (A) resultado positivo do extrato ACE contra *Candida glabrata* e (B) resultado do extrato ACI com *Candida tropicalis*.

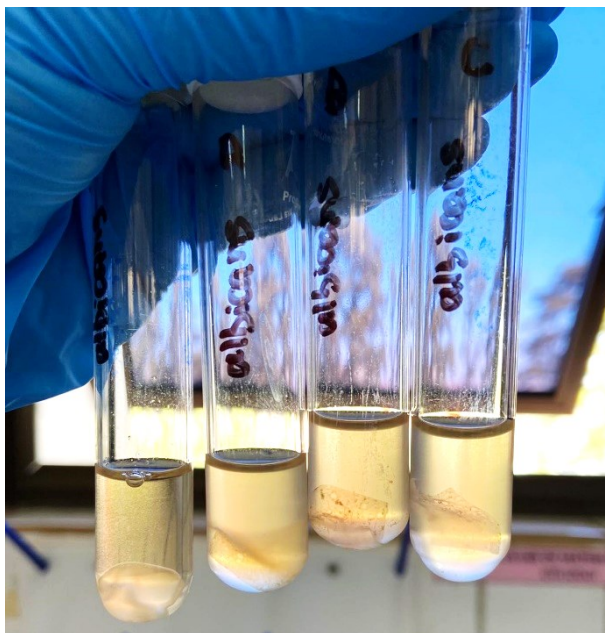


Fonte: próprio autor, 2021.

A partir desses resultados qualitativos (Tabela 6) admite-se que o extrato de própolis extraído por acetona + etanol (ACE) teve maior influência no efeito antifúngico dos biofilmes testados. Esse extrato, por sinal, foi o que apresentou menor valor de CIM e CFM para as espécies de *Candida* (0,76 – 2,5 mg/mL). Dessa forma, os resultados da atividade do biofilme corroboram as CIM determinadas.

Nenhum dos biofilmes testados, nem mesmo o C+ (nistatina), inibiu o crescimento da *C. albicans* (Figura 9). Mesmo sendo de prévio conhecimento que essa espécie tem maior resistência antibiótica, esse é um fato incompatível (HOSETO, 2016). Pode-se atribuir esse comportamento à liberação do extrato pelo biofilme, uma vez que as moléculas de quitosana envolvem o extrato durante a incorporação e podem restringir a sua difusão para o meio em quantidade necessária para inibir a *C. albicans* (LAMIM, 2006). Para verificar as causas dessa ocasião, são necessárias mais repetições do teste.

**Figura 9** – Resultado negativo para atividade antifúngica da *Candida albicans* para os biofilmes testados a 1cm<sup>2</sup> (C+; ACI; ACE E AI).



Fonte: proprio autor, 2021.

Em todas as placas de ágar Sabouraud com cloranfenicol estriadas com o conteúdo dos tubos que apresentaram atividade antimicrobiana ocorreu o crescimento de poucas colônias de *Candida sp.* Assim, fica determinada, que nas condições avaliadas, a atividade antimicrobiana dos biofilmes testados é de caráter inibitório e não fungicida.

## 6 CONCLUSÃO

As propriedades da própolis já são bastante conhecidas na área de produtos naturais. Diante disso, nos últimos anos, as pesquisas científicas relacionadas a investigação e comprovação de tais propriedade estão se intensificando.

Em relação aos solventes utilizados para o preparo dos extratos de própolis, a acetona e a mistura de acetona com etanol, de modo geral, exibiram as melhores atividades apresentando menores concentrações de CIM e CFM, proporcionando um extrato de maior atividade antimicrobiana. Entretanto, nas análises de superfície de resposta para cada planejamento, foram os extratos de acetona + isopropanol (ACI do planejamento A); acetona + etanol (ACE do planejamento B) e acetato de etila + isopropanol (AI do planejamento C) que apresentaram as melhores CIM e CFM com o mesmo nível de prioridade para todas as espécies. Por isso, a produção dos biofilmes ocorreu com a incorporação desses extratos separadamente.

Os biofilmes testados demonstraram que a adição dos extratos de própolis verde à fórmula não teve influência expressiva na solubilidade em água, enquanto a permeação de vapor de água sofreu aumento nas formulações com os extratos.

Por fim, constatou-se a atividade inibitória dos biofilmes com extratos orgânicos de própolis verde frente a *C. tropicalis* e a *C. glabrata*, enfatizando a viabilidade de uso desse biomaterial como barreira de proteção e inibição de microrganismos patogênicos. Esses resultados possibilitam uma nova gama de investigações científicas relacionadas ao desenvolvimento de bioprodutos à base de quitosana e extratos de própolis.

## REFERÊNCIAS

- ANDRADE, A. N. C. **Banco de imagens ultraestruturais de espécies fúngicas de importância médica**. 77 f. Trabalho de conclusão de curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Centro de ciências, Fortaleza, 2016.
- ARAÚJO, Grace K. P. **Desenvolvimento de filmes biodegradáveis de amido incorporados com extrato de própolis**. 2014. 43 p. (Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação do Curso Superior de Tecnologia de Alimentos). Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR. Campo Mourão, 2014.
- ASTM Standard D882-02. Standard test method for tensile properties of thin plastic sheeting Annual book of ASTM standards, **ASTM International**, West Conshohocken, PA (2002).
- AZEVEDO, V. et al. Quitina e Quitosana: aplicações como biomateriais. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**, v.2, n. 3, p. 27-34, 2007.
- BALOUIRI, M. et al. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. **Journal of Pharmaceutical Analysis**. v.6, p. 71–79, 2006.
- BERGER et al. Perspectivas para o uso da quitosana na agricultura. **Revista Iberoamericana de Polímeros**. v. 12, n. 4, p. 195-215, 2011.
- BITTENCOURT, F. **O.Desenvolvimento e avaliação da atividade antimicrobiana contra Candida albicans de formulações semi-sólidas contendo própolis vermelha**. 2008. 74 f. Dissertação (Mestrado em Saúde e Ambiente) - Universidade Tiradentes, Aracaju, 2008.
- BONDINI, Renata Barbosa. **Desenvolvimento de materiais poliméricos bioativos à base de gelatina e própolis**. 2011. 86f. Dissertação (mestrado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2011.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA. Instrução Normativa nº 3 – ANEXO VI – **Regulamento técnico para fixação de identidade e qualidade de própolis**. Diário Oficial da República Federativa do Brasil. Brasília, 19 jan. 2001.
- BREYER, H.F.E.; BREYER, E.D.H.; CELLA, I. **Produção e beneficiamento da própolis (Boletim técnico, 138)**. p. 31, Florianópolis, 2016.
- CABRAL et al. **Composição fenólica, atividade antibacteriana e antioxidante da própolis vermelha brasileira**. *Quim. Nova*, v. 32, n. 6, p. 1523-1527, 2009.
- CARVALHO, M. **Características fenotípicas associadas à virulência e ao perfil de suscetibilidade aos antifúngicos em isolados clínicos do complexo candida glabrata**. 2017. 166 f. Tese (Doutorado) – Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas. Rio de Janeiro, 2017.

COSTA, A. et al. Levantamento dos estudos com a própolis produzida no estado da Bahia. **Sit. Cien. Biol.**, 2014.

COSTA, B. **Inibitório da solução de nanopartículas de quitosana na aderência e no biofilme maduro de *Streptococcus mutans*.**

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal da Paraíba. 2015.

COSTA, D. **Otimização da extração de própolis em solução aquosa e caracterização do extrato.** 2020. 81 p. Dissertação (mestrado) – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Riberão Preto, Universidade de São Paulo, 2020.

CUNHA, G. **Biofilmes à base de amido incorporados com extrato etanólico de própolis.** Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano, Rio Verde. 2017.

DOS SANTOS et al. Otimização do processo de extração de própolis através da verificação da atividade antimicrobiana. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v. 13, p. 71-74, 2003.

ENDO, E. **Efeito antifúngico do extrato bruto e de frações de *Punica granatum* contra *Candida Albicans* e sinergismo com Fluconazol.** 2007. 57f. Dissertação (mestrado) – Fundação Universidade Estadual de Maringá, 2007.

FERNANDES JR. et al. In vitro activity of propolis against bacterial and yeast pathogens isolated from human infections. **J. Venom. Anim. Toxins.**, Botucatu, v.2, n. 1, 1995.

FIDEL, P. et al. *Candida glabrata*: Review of Epidemiology, Pathogenesis, and Clinical Disease with Comparison to *C. albicans*. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 12, n. 1, p. 80–96, 1999.

GALINDO, M. V. **Filmes biodegradáveis de gelatina e quitosana com adição de óleos essenciais na conservação de presunto embalado a vácuo.** Trabalho de conclusão de curso – Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Londrina, 2017.

HAFSA, J. et al. Physical, antioxidant and antimicrobial properties of chitosan films containing *Eucalyptus globulus* essential oil. **LWT- Food science and technology**, v. 68, p. 356-364, 2016.

HOSETO et al. **Atividade antifúngica do extrato do subproduto da própolis frente a espécies de *Candida sp*.** In: II Congresso Paranaense de Microbiologia, Simpósio Sul-Americano de Microbiologia Ambiental. Anais eletrônicos, Campinas, Galoá, 2016.

JENSEN, et al. Stepwise emergence of azole, echinocandin and amphotericin B multidrug resistance in vivo in *Candida albicans* orchestrated by multiple genetic alterations. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.70, n.9, p.2551-2555, 2015.

JIMÉNEZ, A.; FABRA, M. J.; TALENS, P.; CHIRALT, A. Edible and Biodegradable Starch Films: A Review. **Food Bioprocess Technology**. v.4, 2012.

KHODABAKHSHI et al. In vitro and in vivo performance of a propolis-coated polyurethane wound dressing with high porosity and antibacterial efficacy. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**. v. 178. p.177–184, 2019.

LAMIM, Roberta. **Quitosana e N-carboximetilquitosana: desenvolvimento de biofilmes para aplicações farmacêuticas**. 2006. 78f. Dissertação (mestrado) – Universidade do Vale do Jataí, Centro de Ciências da Saúde, 2006.

LARONE, D. Medically Important Fungi: A Guide to Identification. Washington: **DC: American Society for Microbiology Press**, ed. 4, 2002.

LIBERATO, K. B. C. **Atividade antifúngica de extratos de plantas do semiárido paraibano frente a leveduras do gênero cândida**. 2018. 41f. Dissertação (Mestrado em Sistemas Agroindustriais) – Universidade federal de Campina Grande, Centro de Ciências e Tecnologia Agroalimentar, 2018.

LIMBERGER, M. B. C. **Desenvolvimento de filme polimérico combinado a ingrediente com propriedades antioxidantes aplicados em maçãs**. Trabalho de conclusão de curso (Tecnologia de processos químicos) Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Toledo. 2017.

LONGHINI et al. Obtenção de extratos de própolis sob diferentes condições e avaliação de sua atividade antifúngica. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v. 17, p. 388-395, 2007.

LONGHINI, R. Et al. Obtenção de extratos de própolis sob diferentes condições e avaliação de sua atividade antifúngica. **Rev. bras. farmacogn.**v. 17, n.3, 2007.

MARCHETTI et al. Potent synergism of the combination of fluconazole and cyclosporine in *Candida albicans*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. Bethesda, v. 44, n. 9, p. 2373-2381, 2000.

MARIANO, M. M.; HORI, J, I. O potencial terapêutico da própolis verde Brasileira. **E- Revista**. Ribeirão Preto: SP. 2018.

MORAES, C. S. **Isolamento e identificação de formononetina da própolis vermelha de João Pessoa – PB, estudo de sua sazonalidade e avaliação de suas atividades biológicas**. 2009. 188 f. Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas. Campinas, SP: 2009.

MUKHERJEE et al. Combination treatment of invasive fungal infections. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 18, n. 1, p. 163-194, 2005.

NASCIMENTO et al. Efeito da adição de argila nas propriedades de biofilme de quitosana. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v. 8, n. 1, p. 306-312, 2013.

NCCLS. **Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para a Determinação da Sensibilidade a Terapia Antifúngica das Leveduras;** Norma Aprovada—Segunda Edição. Norma M27-A2 do NCCLS (ISBN 1-56238-469-4). NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 Estados Unidos, 2002.

PEREZ, N. **Investigação da influência do solvente nas transições eletrônicas e na liberação de CO de carboxilatostrinucleares de rutênio.** 2018. 115 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 2018.

SANTOS, M. C. **Efeitos do subproduto de aroeira e do biofilme de quitosana na pós colheita e controle da antracnose em goiabas “paluma”.** 2012. II. 93 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Sergipe, 2012.

SAVI, Aline. **Otimização do processo de extração de compostos bioativos de folhas de jambo (*Syzygium malaccense*),** 2015. 48 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Química Industrial) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Pato Branco, 2015.

SFORCIN, J. M. et al. Seasonal effect of brazilian propolis on *Candida albicans* and *Candida tropicalis*. **J. Venom. Anim. Toxins.**, Botucatu , v.7, n.1, p. 139-144, 2001.

SFORCIN, J.M.; FERNANDES Jr, A.; LOPES, C.A.M.; BANKOVA, V.; FURANI, 54 S.R.C. Seasonal effect on Brazilian propolis antibacterial activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v.73, n.1, p.243-249, 2000.

SHAHIDI, F., NACZK M. Food phenolics: sources, chemistry, effects and applications. **Technomic.**, Lancaster, 1995.

SHOKRI et al. Antifungal efficacy of propoliprópolis against fluconazole-resistant *Candida glabrata* isolates obtained from women with recurrent vulvovaginal candidiasis. **Int. J. Gyn. Obst.** 2011.

SILVA et al. Sensibilidade de Agentes Bacterianos Patogênicos Frente à Ação Antibacteriana da Própolis. **Revista Brasileira de Agrotecnologia.** v.5, n.1,p. 07-13, Garanhuns, 2015.

SILVA, J. L. M. **Estudo das propriedades mecânicas de membranas modificadas de quitosana.** 2018.Trabalho De Conclusão De Curso – Universidade Federal Rural Do Semiárido, Mossoró, 2018.

SIMÕES, Livia de Souza. **Extração e caracterização de oleorresina de *Capsicum* obtida a partir de pimentas malagueta (*Capsicum frutescens*) e dedo-de-moça (*Capsicum baccatum* var. *pendulum*).** 2014. 63 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. 2014.

SOBRAL, P. J. do A. Propriedades funcionais de biofilmes de gelatina em função da espessura. **Ciência & Engenharia**, v. 8, n. 1, p. 60-67, 1999.

SOBREIRA, et al. Atividade antifúngica do extrato etanólico de própolis vermelha contra isolados patogênicos de *Candida* spp. **Revista Verde**, v.15, n.4, p.429-433, 2020.

SPIN-NETO, R. et al. Biomateriais à base de quitosana com aplicação médica e odontológica: revisão de literatura. **Revista de Odontologia da UNESP**, v.37, p. 155- 161, 2008.

TAKAISI-KIKUNI, N.B.; SCHILCHER, H. Electron microscopic and microcalorimetric investigations of the possible mechanism of the antibacterial action of a defined propolis provenance, **Planta Med.** v.60. n.3, p.222–227, 1994.

TAVARIA, F. K. A quitosana como biomaterial odontológico: estado da arte. **Rev. Bras. Eng. Bioméd.** [online] v. 29. 1. p. 110-120, 2013.

TRÓCOLLI, R. **Desenvolvimento e avaliação de biofilmes conjugados de quitosana e quitosana/insulina.** 2015. 71f. Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Campina Grande, Campina Grande, 2015.

VICENTINI, Nívea Maria. **Elaboração e caracterização de filmes comestíveis à base de fécula de mandioca para uso em pós-colheita.** 2003. xvii, 198 f. Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrônomicas, 2003.

VOLPI, N.; BERGONZINI, G. Analysis of flavonoids from propolis by on-line HPLC-electrospray mass spectrometry. **J Pharm Biomed Anal.** v.42, n. 3, p. 356, 2006.

WANDERLEY, D. M. S. **Estudo comparativo de metodologias de obtenção de biofilmes de quitosana e quitosana/insulina.** 2016. 41f. Trabalho de Conclusão de Curso - Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, 2016.

WOLF, K.. **Propriedades físico-químicas e mecânicas de biofilmes elaborados a partir de fibra e pó de colágeno.** Dissertação (mestrado) – Univerdade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, 2007.

ZAMAN et al. Chitosan film incorporated with *Garcinia atroviridis* for the packaging of Indian mackerel (*Rastrelliger kanagurta*). **Animal Science and Veterinary**, v. 6, p. 42, 2018.