

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PROCESSOS QUÍMICOS E
BIOTECNOLÓGICOS

KARLA SILVA SILVEIRA

OTIMIZAÇÃO DE EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS DE PRÓPOLIS
VERDE E APLICAÇÃO EM BIOFILME DE QUITOSANA

TOLEDO - PR

2023

KARLA SILVA SILVEIRA

**OTIMIZAÇÃO DE EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS DE PRÓPOLIS
VERDE E APLICAÇÃO EM BIOFILME DE QUITOSANA**

**Optimization of extraction of green própolis phenolic compounds and application in
chitosan biofilm**

Dissertação apresentada como requisito para obtenção do título de Mestre em Processos Químicos e Biotecnológicos da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR).

Orientadora: Prof. Dr. Tatiana Shioji Tiuman
Coorientador: Prof. Dr. Ricardo Fiori Zara

TOLEDO - PR

2023



Esta licença permite remixe, adaptação e criação a partir do trabalho, mesmo para fins comerciais, desde que sejam atribuídos créditos ao(s) autor(es) e que licenciem as novas criações sob termos idênticos. Conteúdos elaborados por terceiros, citados e referenciados nesta obra não são cobertos pela licença.



KARLA SILVA SILVEIRA

OTIMIZAÇÃO DE EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS DE PRÓPOLIS VERDE E APLICAÇÃO EM BIOFILME DE QUITOSANA

Trabalho de pesquisa de mestrado apresentado como requisito para obtenção do título de Mestra Em Processos Químicos E Biotecnológicos da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR). Área de concentração: Processos Químicos E Biotecnológicos.

Data de aprovação: 30 de Junho de 2023

Dra. Tatiana Shioji Tiuman, Doutorado - Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Dr. Clayton Antunes Martin, Doutorado - Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Dra. Cristiane Loiva Reichert, Doutorado - Prefeitura Municipal de Toledo, Paraná

Documento gerado pelo Sistema Acadêmico da UTFPR a partir dos dados da Ata de Defesa em 03/07/2023.

AGRADECIMENTOS

- A Deus, pela vida e por nunca me deixar desistir.
- Aos meus pais e irmãos, pela torcida e por sempre acreditarem no meu potencial.
- As minhas amigas, que mesmo longe, celebram minhas alegrias e conquistas.
- A minha orientadora Tatiana Tiuman e coorientador Ricardo Zara, pela paciência e por todo conhecimento compartilhado.
- Ao Laboratório Multiusuário - LABCA do Câmpus Toledo, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná pelas análises realizadas e em especial a Gabrielle Peiter, pela contribuição neste trabalho.
- Aos meus colegas do mestrado e da Prati-Donaduzzi, pela companhia, incentivo, em especial ao Diego Assunção, Jefferson Bearzi e Ricardo Aoki, por toda ajuda quando eu precisei.
- Aos professores, técnicos de laboratório, acadêmicos e funcionários da Universidade Federal do Paraná – Câmpus Toledo.

RESUMO

Própolis é uma mistura complexa, produzida pelas abelhas através de várias fontes vegetais. Apresenta importantes propriedades biológicas, tais como antioxidante, antibacteriana, antiviral e antifúngica. Devido a estas atividades biológicas, biofilmes preparados a partir de polímeros biodegradáveis, incorporados com extratos de própolis, podem ser alternativas para o desenvolvimento de embalagens de alimentos. Porém, como a própolis é um material resinoso e com alto teor de cera, é necessário realizar um processo de extração, a fim de obter os compostos de interesse. Com isso, o objetivo deste estudo foi otimizar o processo de extração de compostos fenólicos de própolis verde e aplicar o extrato otimizado em biofilmes de quitosana. Os extratos foram elaborados a partir do delineamento experimental com misturas de três solventes (água, etanol e acetato de etila), resultando em 14 planejamentos. A partir da quantificação de fenólicos totais, de todos os extratos obtidos, foi possível encontrar a melhor proporção dos solventes extratores: 47,0 % de água com 35,0 % de etanol e 18,0 % de acetato de etila. Após o preparo de um extrato no ponto otimizado, observou-se que os valores teóricos de compostos fenólicos e da concentração inibitória mínima contra *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* e *Escherichia coli* foram próximos aos obtidos experimentalmente. Na sequência, o extrato otimizado foi incorporado em biofilme de quitosana, preparado por *casting*. Após testes de caracterização foi possível verificar que não houve diferenças significativas de espessura, solubilidade em água e permeabilidade de vapor de água em relação ao biofilme sem extrato. Através da microscopia óptica e eletrônica de varredura foi possível visualizar a homogeneidade dos biofilmes formados e certificar que a adição do extrato de própolis não afetou sua microestrutura, indicando uma boa compatibilidade. A associação do extrato com o biofilme de quitosana apresentou potencial antioxidante, havendo liberação do extrato no meio, atingindo após 24 horas, um valor de 28,31 μmol equivalente Trolox L^{-1} , por meio da análise de DPPH. Quanto à atividade antimicrobiana do filme, foi observada a liberação do extrato no meio de cultura, resultando em uma menor proliferação das bactérias *Staphylococcus aureus* e *Bacillus cereus*. Desta forma, é possível considerar que a otimização da extração de compostos fenólicos de própolis apresentem ativos antioxidantes e antimicrobianos e seja viável sua incorporação em biofilmes de quitosana, que podem ser utilizados em embalagens de alimentos.

Palavras-chave: extrato de própolis; planejamento experimental; embalagem conservante de alimento; antioxidante natural; concentração inibitória mínima.

ABSTRACT

Propolis is a complex mixture produced by bees from various plant sources. It has significant biological properties, such as antioxidant, antibacterial, antiviral, and antifungal properties. Due to these biological activities, biofilms prepared from biodegradable polymers, incorporated with propolis extracts, can be alternatives for developing food packaging. However, as propolis is a resinous material with a high wax content, it is necessary to carry out an inheritance process to obtain the compounds of interest. Thus, this study aimed to optimize the process of extraction of phenolic compounds from green propolis and apply the optimized extract in chitosan biofilms. The extracts were elaborated from the experimental design with mixtures of three solvents (water, ethanol, and ethyl acetate) generated in 14 plans. From the quantification of total phenolics of all extracts obtained, it was possible to find the best proportion of extractor solvents: 47.0 % water with 35.0 % ethanol and 18.0 % ethyl acetate. After preparing an extract at the optimized point, it was observed that the theoretical values of phenolic compounds and the minimum inhibitory concentration against *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, and *Escherichia coli* were close to those obtained experimentally. Next, the optimized extract was incorporated into a chitosan biofilm prepared by casting. After characterization tests, it was possible to verify that there were no differences in thickness, water solubility, and water vapor permeability concerning the biofilm without extract. Through optical and scanning electron microscopy, it was possible to visualize the homogeneity of the formed biofilms and certify that the addition of propolis extract did not affect its microstructure, indicating good compatibility. The association of the extract with the chitosan biofilm showed antioxidant potential, with the release of the extract in the medium reaching after 24 hours, a value of 28.31 $\mu\text{mol Trolox L}^{-1}$ equivalent through DPPH analysis. As for the antimicrobial activity of the film, the release of the extract in the culture medium was observed, provoked in a more minor experience of the bacteria *Staphylococcus aureus* and *Bacillus cereus*. In this way, it is possible to consider that the optimization of the extraction of phenolic compounds from propolis presents antioxidant and antimicrobial actives, and it is feasible for incorporation in chitosan biofilms, which can be used in food packaging.

Keywords: propolis extract; experimental planning; food preservative packaging; natural antioxidant; minimum inhibitory concentration.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Presença da própolis na colmeia pelas abelhas (A) e própolis bruta verde (B).....	14
Figura 2 - Representação da estrutura química do fenol - grupamento básico para formação dos compostos fenólicos.....	20
Figura 3 - Estrutura geral dos flavonoides	21
Figura 4 - Estrutura das principais classes de flavonoides.....	22
Figura 5 - Estrutura química do artepelin-C.....	23
Figura 6 - Desacetilação parcial da quitina	27
Figura 7 - Foto da amostra de própolis utilizada nos experimentos.....	31
Figura 8 - Metodologia para pré-tratamento com hexano da amostra de própolis.....	32
Figura 9 - Procedimento para elaboração dos extratos de própolis.....	34
Figura 10 - Fluxograma para determinação de Compostos fenólicos.....	35
Figura 11 - Microdiluições em placa de 96 poços.....	37
Figura 12 - Fluxograma da elaboração dos biofilmes.....	39
Figura 13 - Metodologia para determinação da atividade antioxidante dos biofilmes pelo método DPPH.....	43
Figura 14 - Superfície de Resposta para a análise de compostos fenólicos totais.....	53
Figura 15 - Cromatogramas obtidos na quantificação dos compostos do extrato de própolis avaliado por CLAE (padrão e amostra).....	54
Figura 16 - Imagens dos filmes produzidos: A- controle negativo, B - controle positivo, com ampicilina, C- com antioxidante sintético (BHA), D - com extrato.....	56
Figura 17 - Resultado da microscopia óptica dos biofilmes: A- controle negativo, B - controle positivo (com ampicilina), C com antioxidante sintético - (BHA), D -com extrato, utilizando a objetiva de 10X.....	57
Figura 18 - Imagens do MEV da superfície dos biofilmes: A (controle negativo), B (controle positivo, com ampicilina), C (com antioxidante sintético - BHA), D (com extrato), com ampliação de 90X.....	58
Figura 19 - Perfil de liberação de compostos antioxidantes dos biofilmes, através do método de inibição do radical DPPH, no intervalo de 24 horas dos biofilmes com extrato de própolis (PRÓPOLIS), controle positivo com antioxidante sintético BHA (BHA) e controle neagtivo sem adição de extrato, antimicrobiano ou antioxidante (C-).....	64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Classificação da própolis brasileira conforme sua localização e cor do extrato	16
Tabela 2 - Requisitos de qualidade mínimos da própolis bruta e do extrato de própolis, e suas especificações exigidas de acordo com o regulamento do MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento)	18
Tabela 3 - Volumes em mL dos solventes utilizados na elaboração dos extratos, seguindo planejamento experimental 2 ³	33
Tabela 4 - Características físico-químicas da própolis verde exigidos pela legislação e os resultados encontrados.....	45
Tabela 5 - Variáveis não codificadas em mL e resultados da análise de compostos fenólicos dos extratos de própolis em mg EAG g ⁻¹ de extrato, elaborados à partir do planejamento experimental	47
Tabela 6 - Valores da concentração inibitória mínima (CIM) em mg mL ⁻¹ dos extratos de própolis elaborados à partir do planejamento experimental	50
Tabela 7 - Extrato de própolis verde otimizado por análise de superfície de resposta e valores teóricos estimados de concentração inibitória mínima (CIM) e compostos fenólicos e valores experimentais obtidos.	53
Tabela 8 - Resultados expressos em média e desvio padrão da espessura, solubilidade e permeabilidade de vapor de água (PVA) dos biofilmes com extrato de própolis (PRÓPOLIS), controle positivo com ampicilina (AMP), controle positivo com antioxidante sintético BHA (BHA) e controle negativo sem adição de extrato, antimicrobiano ou antioxidante (C-).	59
Tabela 9 - Resultados qualitativos da atividade antimicrobiana dos biofilmes e contagem de microrganismos viáveis, expressos em UFC mL ⁻¹	66

LISTA DE ABREVIACOES

ANOVA- Análise de variância

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

ASR – Análise de superfície de resposta

AA – Atividade antioxidante

BHA – Butil hidroxianisol

BHT – Butil-hidroxitolueno

CIM – Concentrao Inibitória Mínima

CLAE – Cromatografia líquida de alta eficiência

CTT – Cloreto de Trifeniltetrazlio

DMSO – Dimetilsulfóxido

DPPH – 2,2-difenil-1-picrilhidrazila

EAG g⁻¹ – Equivalente cido gálico por grama

EQ g⁻¹ – Equivalente a quercetina por grama

MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

MEV – Microscopia eletrônica de varredura

PG – Galato de propila

RPM – Rotao por minutos

TBHQ – Terc-butilhidroquinona

UV/Vis – Ultravioleta visível

UFC – Unidade Formadora de Colnia

UTFPR – Universidade Tecnológica Federal do Paraná

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	OBJETIVOS	13
2.1	Objetivo geral	13
2.2	Objetivos específicos.....	13
3	REVISÃO DE LITERATURA	14
3.1	Própolis.....	14
3.1.1	Mercado.....	16
3.1.2	Composição.....	17
3.1.3	Propriedades antioxidantes.....	19
3.1.4	Propriedades biológicas e farmacológicas da própolis.....	23
3.1.5	Técnicas de Extração.....	25
3.2	Quitosana	27
3.2.1	Aplicações da quitosana	28
3.2.2	Biofilmes de quitosana	29
4	PARTE EXPERIMENTAL.....	31
4.1	Amostra	31
4.1.1	Secagem por liofilização	31
4.1.2	Pré- tratamento com hexano.....	32
4.1.3	Elaboração dos extratos.....	33
4.1.4	Determinação de compostos fenólicos totais	34
4.1.5	Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)	36
4.2	Análise estatística para otimização dos extratos de própolis verde.....	37
4.3	Quantificação de compostos do extrato de própolis otimizado por cromatografia líquida de alta eficiência.....	37
4.4	Filme de quitosana incorporado com extrato de própolis	38
4.4.1	Elaboração do biofilme	38
4.4.2	Avaliação macroscópica.....	39
4.4.3	Espessura	39
4.4.4	Microscopia óptica	40
4.4.5	Microscopia eletrônica de varredura	40
4.4.6	Solubilidade em água	40
4.4.7	Permeabilidade ao vapor de água.....	41
4.4.8	Atividade antioxidante dos biofilme	41
4.4.9	Estudo de migração dos agentes ativos dos biofilmes com própolis	42
4.4.10	Atividade antimicrobiana dos biofilmes.....	43
4.5	Análise estatística	44
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	45

5.1	Características físico-químicas da amostra de própolis	45
5.2	Quantificação de compostos fenólicos totais em extratos de própolis	47
5.3	Determinação da atividade antimicrobiana em extratos de própolis	49
5.4	Otimização dos extratos de própolis verde	52
5.5	Quantificação de compostos do extrato de própolis otimizado por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)	54
5.6	Desenvolvimento e caracterização do biofilme	55
5.6.1	Microscopia óptica	57
5.6.2	Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	57
5.6.3	Características físico-químicas.....	59
5.7	Atividade antioxidante dos biofilmes.....	62
5.8	Estudo de liberação dos agentes ativos da própolis.....	63
5.9	Atividade antimicrobiana dos biofilmes.....	65
6	CONCLUSÃO	69
	REFERÊNCIAS	70

1 INTRODUÇÃO

Permanece crescendo no Brasil e no mundo um consumidor cada vez mais consciente da importância do consumo de produtos naturais para saúde e para o meio ambiente. Indústrias alimentícias e farmacêuticas têm buscado nas últimas décadas substituir aditivos sintéticos por naturais, a fim de garantir segurança e saúde ao consumidor (PEREIRA et al., 2020).

A natureza é uma fonte abundante de substâncias e moléculas bioativas que vem sendo cada vez mais explorada com importância industrial e medicinal, sendo a própolis uma delas (LAAROUSSI et al., 2020).

A própolis é uma cera de coloração e consistência variada, produzida pelas abelhas através da coleta de diversas partes de plantas e secreções salivares, com a função de garantir proteção à colmeia (BONHEVI; COLE; JORDÁ, 1994; GREENWAY; SCAYSBROOK; WHATLEY, 1990). Em geral, sua composição química é aproximadamente 50 % resina, 30 % ceras, 10 % óleos essenciais, 5 % pólen e 5 % de vários outros compostos orgânicos (Al-HARIRI, 2011). Numerosos estudos têm demonstrado que a própolis apresenta propriedades terapêuticas como anti-inflamatória, antibacteriana, antiviral, antifúngica, anticâncer (PARK et al., 1998) e também propriedade antioxidante, com um grande potencial na conservação de alimentos (BANKOVA et al., 2016).

Porém, como a própolis é um material resinoso e com alto teor de cera, não é aconselhável seu consumo na forma bruta, *in natura*. Sendo assim, é necessário realizar um processo de extração, a fim de obter os compostos de interesse. Durante o processo de extração, são muitas as variáveis que devem ser levadas em consideração para se obter maior eficiência, como: o estado físico da amostra, a escolha do solvente extrator, a agitação do processo, entre outros (BOROSKI et al., 2015). Sendo assim, a otimização é essencial para encontrar o meio mais eficiente para extração dos compostos químicos responsáveis pela atividade de interesse.

A utilização de extratos vegetais tem sido uma alternativa aos aditivos químicos convencionais, principalmente quando empregados em combinação com outras tecnologias já existentes, como é o caso de biofilmes em embalagens de alimentos (SILVA et al., 2010).

Para minimizar o uso de plásticos em embalagens alimentícias há uma busca crescente pelo desenvolvimento de novos materiais voltados para a produção vinculada à preocupação com o meio ambiente. Nesse contexto, biofilmes preparados a partir de polímeros biodegradáveis, incorporados com extratos vegetais, podem ser considerados

como uma alternativa eficaz para evitar os problemas resultantes da eliminação de embalagens e aditivos sintéticos (AZIZ; SALAMA; SABAA, 2018). Dos polissacarídeos estudados, a quitosana é um dos que vem sendo explorado para a produção de materiais termoplásticos biodegradáveis, devido ao seu baixo custo, disponibilidade e produção a partir de fontes renováveis (MOHAMED et al., 2020b).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Otimização de extração de compostos fenólicos de própolis verde e aplicação em biofilme de quitosana.

2.2 Objetivos específicos

- Elaborar um planejamento experimental para misturas de 3 componentes (água, etanol e acetato de etila);
- Quantificar compostos fenólicos por espectrofotometria UV-VIS dos extratos;
- Determinar a atividade antimicrobiana dos extratos pelo método da concentração inibitória mínima (CIM), frente aos microrganismos *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* e *Staphylococcus aureus*;
- Encontrar por meio da análise de superfície de resposta a condição otimizada para extração de compostos fenólicos totais;
- Elaborar o biofilme de quitosana incorporando o extrato de própolis produzido na condição otimizada;
- Analisar possíveis alterações físico-químicas da estrutura do biofilme após a adição do extrato;
- Verificar a atividade antimicrobiana do biofilme de quitosana, utilizando a metodologia de macrodiluição em caldo, frente aos microrganismos *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* e *Staphylococcus aureus*;
- Avaliar a capacidade antioxidante do biofilme de quitosana.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Própolis

A palavra própolis é originada do grego: pro (em defesa de) e polis (cidade /colmeia), isto é, em defesa da colmeia. Consiste em um material resinoso complexo, produzido pelas abelhas através de várias fontes vegetais (ramos, flores, pólen e brotos de árvores), com secreções salivares e enzimas contidas em sua saliva. Esse material é utilizado pelas abelhas para fechar frestas e rachaduras, garantindo proteção contra insetos intrusos e microrganismos prejudiciais à colmeia, mantendo o ambiente asséptico. Além de permitir que a temperatura da colmeia se mantenha estável (BURDOCK, 1998; PEREIRA, SEIXAS, NETO, 2002). A presença da própolis na colmeia produzida pelas abelhas pode ser visto a seguir na Figura 1-A, e própolis verde bruta na Figura 1-B.

Figura 1- Presença da própolis na colmeia pelas abelhas (A) e própolis bruta verde (B).



B



Fonte: Figura A- FRANÇA - www.emater.mg.gov.br (acessado em 12/05/20); Figura B- ATMAN - www.vitalatman.com.br (acessado em 12/05/20)

A utilização da própolis começou há séculos por diferentes povos devido às suas propriedades biológicas e terapêuticas. Os egípcios a utilizavam para embalsamar seus mortos e evitar a decomposição dos corpos. Gregos e romanos utilizavam frequentemente como agente antisséptico e cicatrizante, e os incas como antitérmico (SFORCIN, BANKOVA, 2011).

Como a própolis é um produto natural, derivado da extração de resinas de plantas e do trabalho das abelhas, estudos confirmam que sua composição química é bastante variada e está relacionada à biodiversidade da flora regional, localização geográfica e também da sazonalidade de coleta (SFORCIN et al., 2001). De modo geral, seus principais componentes são 50 a 55 % de resinas e bálsamos, 30 % de cera, 5 % de pólen, 10 % de óleos essenciais, além de diversas outras substâncias em pequenas quantidades como, vitaminas, minerais, flavonoides e ácidos fenólicos (PEREIRA, SEIXAS, NETO, 2002).

Sua coloração varia de marrom escuro passando a uma tonalidade esverdeada até o marrom avermelhado. Possui odor e sabor característico, que varia de uma amostra para outra. De acordo com sua origem botânica, seu sabor varia de suave balsâmico a forte picante (BURDOCK, 1998; MARUCCI, 1996).

Apresenta uma consistência rígida à temperatura próxima de 15 °C, tornando-se maleável a partir de 30 °C. O ponto de fusão varia entre 60-70 °C podendo atingir até 100 °C. Contém uma parte insolúvel constituída de matéria orgânica e tecidos vegetais. Os compostos solúveis da própolis são constituídos por materiais cerosos, bálsamos, óleos essenciais e derivados fenólicos (MARCUCCI, 1995).

As abelhas encontradas no Brasil são geneticamente diferentes das abelhas encontradas na Europa e América do Norte. No Brasil, houve uma efetiva hibridização entre as abelhas europeias (*Apis mellifera* e *Apis mellifera linguistica*), com as abelhas africanas (*Apis scutellata*). Dessa forma as abelhas *Apis mellifera* no Brasil são chamadas de africanizadas e são as responsáveis pelo desenvolvimento apícola do país (NEGRI et al., 1998).

No Brasil, devido à sua diversidade climática e de vegetação, a própolis produzida apresenta variações em sua coloração e composição, principalmente no que se refere a compostos fenólicos. Já em países de clima temperado como da Europa e América do Norte, são poucas as variedades de vegetais produtores da resina para a produção de própolis (MARCUCCI, 1995).

Embora existam diversas espécies vegetais para a retirada de resina utilizadas pelas abelhas para a produção de própolis, ainda são poucas as espécies identificadas, sendo a *Araucaria angustifolia* (pinheiro brasileiro), o alecrim do campo ou vassourinha (*Baccharis* sp.), o eucalipto (*Eucalyptus* sp.), a aroeira (*Schinus terebinthifolius Raddi*) e o assa-peixe (*Vernonia polyanthes* Less.), alguns exemplos de vegetais dos quais as abelhas utilizam a matéria-prima para a produção de própolis (PARK, IKEGAKI, ALENCAR, 2000; BANKOVA et al.,1999).

Park, Ikegaki e Alencar (2000) realizaram uma análise com 500 amostras de própolis *in natura* em todo o território brasileiro e classificaram-nas em 12 grupos, de acordo com sua origem botânica e propriedades biológicas, conforme mostra a Tabela 1.

Tabela 1- Classificação da própolis brasileira conforme sua localização e cor do extrato

Grupo	Cor do extrato	Região
Grupo 1	Amarelo	Região Sul
Grupo 2	Castanho claro	Região Sul
Grupo 3	Castanho escuro	Região Sul
Grupo 4	Castanho claro	Região Sul
Grupo 5	Marrom esverdeado	Região Sul
Grupo 6	Marrom avermelhado	Região Nordeste
Grupo 7	Marrom esverdeado	Região Nordeste
Grupo 8	Castanho escuro	Região Nordeste
Grupo 9	Amarelo	Região Nordeste
Grupo 10	Amarelo escuro	Região Nordeste
Grupo 11	Amarelo	Região Nordeste
Grupo 12	Verde ou marrom esverdeado	Região Sudeste

Fonte: PARK, IKEGAKI e ALENCAR, 2000

3.1.1 Mercado

No Brasil, o mel é o principal produto que impulsiona o mercado da apicultura. Porém, nos últimos anos a produção de própolis vem ganhando destaque no agronegócio apícola em consequência dos resultados altamente promissores quanto às suas propriedades, tornando-o um produto com alto valor agregado (EVANS, 2016).

Atualmente, o país ocupa o terceiro lugar no ranking mundial em termos de produção de própolis. As condições climáticas, geográficas e as características da vegetação, são fatores que favorecem a produção e garantem a qualidade do produto (FRANÇA, 2019).

Nas últimas três décadas a produtividade de própolis verde aumentou consideravelmente, passando de 250 gramas/colméia/ano para 1,5 Kg/colméia/ano, com uma produção de aproximadamente 100 toneladas anuais, graças à utilização de métodos e estratégias mais eficientes na colheita (FRANÇA, 2019; SEBRAE, 2014).

A maior parte da produção é exportada, sendo o Japão o maior comprador da própolis verde brasileira, onde 90 % da própolis *in natura* consumida no país é de origem brasileira. As exportações também se expandiram para China, Coréia, Estados Unidos e Europa, ampliando a atuação da própolis brasileira no mercado internacional (FRANÇA, 2019).

A própolis verde derivada do alecrim do campo (*Baccharis* sp.), produzida em vários estados do Brasil como Minas Gerais, São Paulo e Paraná, é a que apresenta maior aceitação no mercado internacional, por apresentar propriedades biológicas atrativas do ponto de vista farmacológico (FRANÇA, 2019; MARTINEZ; SOARES, 2012).

3.1.2 Composição

A própolis apresenta uma composição química bastante complexa e variada, que está relacionada com a flora local e o período de coleta da resina (MOREIRA, 1986; SOUSA et al., 2007).

Já foram identificados mais de 300 tipos diferentes de compostos na própolis, incluindo carboidratos, ácidos aromáticos, ésteres, cetonas, aminoácidos, vitaminas, ácidos graxos, aldeídos, fenóis e substâncias inorgânicas (MARCUCCI, 1995). Uma única amostra de própolis pode vir a conter mais de 100 compostos, com algumas substâncias encontradas somente em determinadas espécies de plantas, enquanto outras são comuns na grande maioria das amostras (OLDONI et al., 2011; VARGAS et al., 2004).

No Brasil, a fim de estabelecer a identidade e qualidade da própolis, há um regulamento presente na normativa nº. 03, de 19 de Janeiro de 2001 do MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento) que estabelece os requisitos mínimos de qualidade que devem ser atendidos. O presente regulamento aplica-se tanto a própolis

destinada ao comércio nacional, como também no comércio internacional. A Tabela 2 apresenta os requisitos para a própolis e para o extrato de própolis.

Tabela 2 - Requisitos de qualidade mínimos da própolis bruta e do extrato de própolis, e suas especificações exigidas de acordo com o regulamento do MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento)

Requisitos	Especificação da própolis bruta	Especificação do extrato de própolis
Aroma	Característico (balsâmico e resinoso), dependendo da origem botânica	Característico (balsâmico e resinoso), dependendo da origem botânica
Cor	Amarelada, parda, esverdeada, marrom e outras, variando conforme a origem botânica	Âmbar, avermelhada ou esverdeada, variando conforme a origem botânica e concentração
Sabor	Característico de suave balsâmico a forte e picante, dependo da origem botânica	Característico de suave balsâmico a forte, amargo e picante
Consistência\ Aspecto	Maleável a rígida, dependendo da origem botânica	Líquido límpido e homogêneo
Granulometria	Heterogênea	NA
Extrato seco	NA	Mínimo de 11 % (m/m)
Perda por Dessecação	Máximo 8 % (m/m)	NA
Cinzas	Máximo 5 % (m/m)	NA
Cera	Máximo 25 % (m/m)	Máximo 1 % do extrato seco (m/m)
Teor Alcoólico	NA	Máximo 70 %
Compostos Fenólicos	Mínimo 5 % (m/m)	Mínimo 0,5 % (m/m)
Flavonoides	Mínimo 0,5 % (m/m)	Mínimo 0,25 % (m/m)
Atividade de Oxidação	Máximo de 22 s	Máximo de 22 s
Massa Mecânica	Máximo 40 % (m/m)	Máximo 40 % (m/m)
Solúveis em Etanol	Mínimo 35 % (m/m)	Mínimo 35 % (m/m)

Onde: NA= não se aplica
Fonte: BRASIL (2001b)

Segundo Lima et al. (2006), de todos os compostos encontrados na própolis, o que chama mais atenção dos pesquisados são os fenólicos e, dentre eles, os flavonoides. A sua importância se deve ao fato de possuírem propriedades antibacteriana, antiviral e antioxidante (VOLPI, BERGINZINI, 2006).

3.1.3 Propriedades antioxidantes

Através de um processo contínuo e fisiológico, o organismo produz radicais livres, que são moléculas altamente instáveis, que buscam atingir a estabilidade através de reações químicas de transferência de elétrons (oxirredução) com células vizinhas. Esses agentes oxidantes (radicais livres) são capazes de cumprir funções biológicas relevantes, sendo fundamentais para a saúde. Porém, quando em excesso, pode conduzir danos oxidativos, atacando células saudáveis, como proteínas, lipídios e DNA, causando problemas para a saúde como: envelhecimento, doenças degenerativas, câncer, diabetes, entre outros (OLDONI, 2007; OLIVEIRA et al., 2009; SCHELLER et al., 1994).

Os radicais livres podem ser produzidos por fontes endógenas, através do metabolismo normal e também por fontes exógenas, por consequência da dieta, poluição ambiental, medicamentos, estresse, tabagismo, radiações, entre outros. Além dos danos causados à saúde humana, a oxidação pelos radicais livres ocorre também em alimentos, afetando lipídios e proteínas, resultando em menor qualidade nutricional, menor segurança alimentar, podendo levar a formação de produtos tóxicos e o aparecimento de odores e sabores indesejados (BOROSKI et al., 2015; RAMALHO; JORGE, 2006; SILVA; BORGES; FERREIRA, 1999).

Uma forma de prevenir a oxidação lipídica é a adição de pequenas quantidades de antioxidantes, que são compostos capazes de retardar ou prevenir a extensão do dano oxidativo. Os antioxidantes utilizados em alimentos devem ser atóxicos, baratos, efetivos em baixas concentrações e estáveis durante todas as etapas de fabricação do produto (AKOH; MIN, 1998; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

Na indústria alimentícia os antioxidantes comumente utilizados são os sintéticos, como o BHA (butil-hidroxianisol), BHT (butil-hidroxitolueno), TBHQ (terc-butilhidroquinona) e PG (galato de propila). Esses antioxidantes são adicionados em matrizes alimentares sem a intenção de nutrir, mas sim, de retardar o aparecimento de

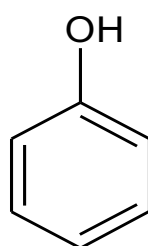
alterações oxidativas. Entretanto, apresentam o inconveniente de serem voláteis, podendo se decompor em temperaturas elevadas. Além disso, estudos realizados recentemente têm mostrado a ação tóxica desses antioxidantes sintéticos à saúde, levando-os a proibição em diversos países. Assim, vem aumentando a busca por substitutos naturais que garantem efetividade, sem apresentar risco à saúde do consumidor (RAMALHO; JORGE, 2006; TAKEMOTO; TEIXEIRA FILHO; GODOY, 2009).

Os organismos apresentam um sistema antioxidante formado por algumas enzimas, mas os antioxidantes provenientes da dieta, como os compostos fenólicos, tocoferóis, carotenoides e ascorbatos, constituem o principal mecanismo antioxidante não enzimático (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007; RAMALHO; JORGE, 2006).

A própolis consiste em um composto interessante por ser um antioxidante natural, capaz de prevenir ou retardar processos oxidativos. Na indústria alimentícia, sua aplicação agrega valor aos alimentos, aumentando seu “tempo de prateleira”, além de trazer benefícios à saúde do consumidor, por ser um antioxidante natural (GÜLÇIN, 2012).

Os compostos fenólicos são os antioxidantes mais abundantes encontrados na natureza, abrangendo uma série de substâncias. São os principais componentes químicos encontrados na própolis, e sua estrutura química contém no mínimo um anel aromático, com um ou mais grupos hidroxilas ligados à estrutura cíclica (Figura 2) (BURDOCK, 1998).

Figura 2 - Representação da estrutura química do fenol - grupo básico para formação dos compostos fenólicos.



Fonte: autoria própria (2020).

Segundo Angelo e Jorge (2007), a capacidade de atuação antioxidante dos compostos fenólicos está relacionada com o número de hidroxilas presentes na sua estrutura e sua localização. Pois através do mecanismo de doação de hidrogênio ou transferência de elétrons, atua como sequestradores de radicais livres.

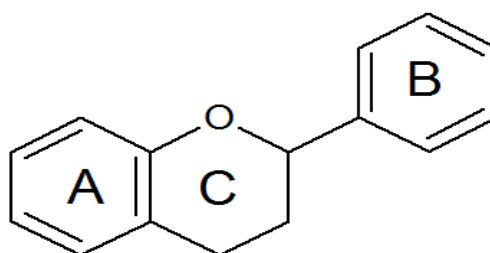
A capacidade antioxidante dos compostos fenólicos está relacionada com mecanismos distintos, tais como, sequestro de radicais livres, inibição da enzima

lipoxigenase, cicloxigenase e quelantes de íons metálicos que catalisam reações de peroxidação lipídica, prevenindo a geração de radicais livres (BARREIROS, DAVID E DAVID, 2006).

Dentre os compostos fenólicos, os flavonoides constituem a mais ampla classe, com mais de 400 estruturas elucidadas, correspondendo aproximadamente dois terços dos compostos antioxidantes encontrados em frutas e vegetais (BALASUNDRAM; SUNDRAM; SAMMAN, 2006).

A propriedade antioxidante dos flavonoides se deve à sua estrutura, apresentada na Figura 3, que consiste em 2 anéis aromáticos, denominados A e B, ligados por um anel pirano C. São compostos de baixo peso molecular e apresentam 15 átomos de carbono, arranjados na configuração C₆-C₃-C₆ (PIETTA, 1999).

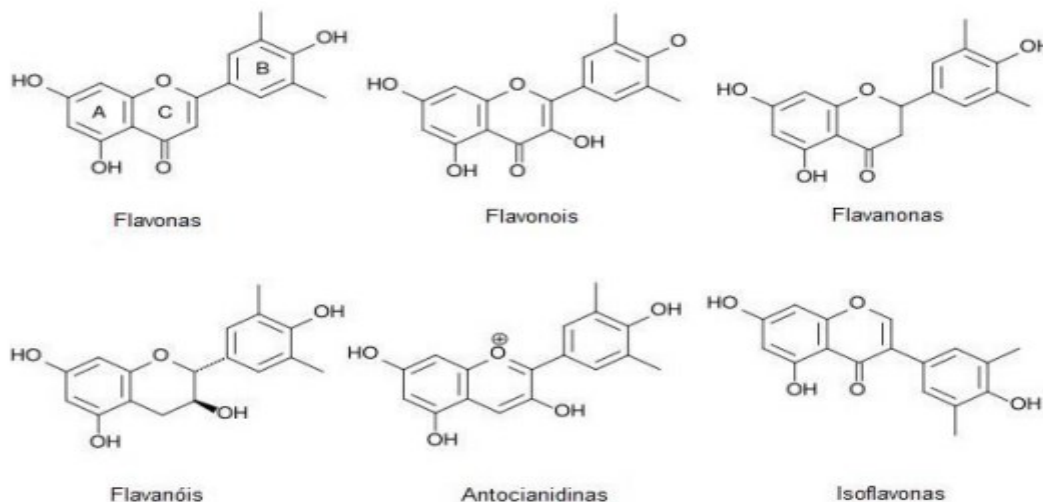
Figura 3- Estrutura geral dos flavonoides



Fonte: autoria própria (2020)

A grande diversidade estrutural dos flavonoides ocorre devido às várias modificações que esses compostos podem sofrer, como hidroxilação, metilação, acilação, glicosilação, entre outras. As classes de flavonoides são diferenciadas devido ao número e natureza dos grupos substituintes ligados aos anéis, além do grau de instauração e oxidação. A Figura 4 apresenta as diferentes classes de flavonoides, como os flavonóis (quercetina, kaempferol, miricetina, galangina, fisetina), flavonas (apigenina, crisina, luteolina), flavonóis (catequina, epicatequina, epigallocatequina, galato de epicatequina, galato de epigallocatequina), flavanonas (nariagenina, hesperitina, erio dictiol), antocianidinas (cianidina, malvidina, pelagomidina, delfinidina, peonodina), isoflavonas (genisteína, daidzeina, gliciteína, fomononetina) (BALASUNDRAM; SUNDRA; SAMMAN, 2006; LIU, 2004; OLDONI, 2007).

Figura 4 - Estrutura das principais classes de flavonoides.



Fonte: HOLLMAN e KATAN, 1999.

Esses flavonoides possuem propriedades diversas, como: proteção dos vegetais contra a incidência de raios UV e visível, proteção contra fungos e bactérias, controle dos hormônios vegetais, inibição de enzimas e propriedades antioxidantes (ZUANAZZI, 1999).

Os flavonoides são compostos polares, ou moderadamente polares, sendo solúveis em etanol, metanol, butanol e combinações de solventes com água. Através da utilização da técnica espectrofotométrica é possível quantificar o teor de flavonoides em determinadas amostras, através de uma reação de complexação com o metal alumínio (PAPOTI et al., 2011).

A própolis verde brasileira diferencia-se das demais por apresentar composição química característica, principalmente pela presença de compostos fenólicos exclusivos, como ácido cumárico, ácido ferúlico, galangina, quercetina, canferol e o artepelin-C (Figura 5). São substâncias encontradas na própolis que dependendo da sua quantidade irão estabelecer a qualidade do produto. Essa classificação de qualidade varia de acordo com as exigências do mercado consumidor, sendo o Japão o país com maiores exigências quanto ao controle de qualidade da própolis (BRASIL, 2001a; MATSUDA, 2008).

Tais substâncias apresentam atividades biológicas interessantes do ponto de vista farmacológico e, dependendo da sua quantidade, irão estabelecer a qualidade do produto (COSTA et al., 2018; RIBEIRO et al., 2018).

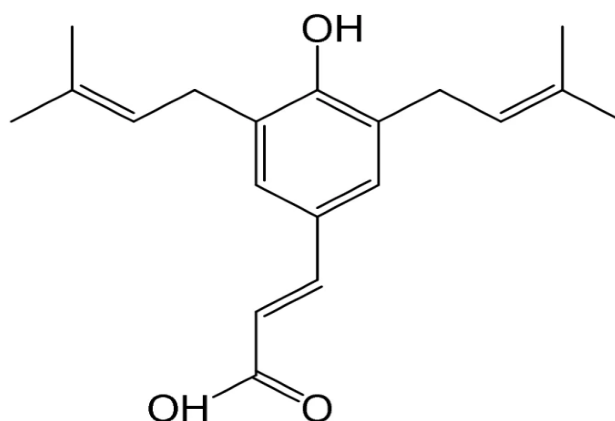
Os ácidos ferúlico e cumárico têm sido amplamente estudados nas últimas décadas por apresentarem propriedades terapêuticas para combater um grande número de doenças crônicas, como diabetes, mal de Parkinson, Alzheimer e câncer. (FERREIRA et al., 2019;

Li et al., 2021). Esses ácidos também têm sido investigados como ingredientes promissores para cosméticos, devido às suas atividades antioxidante, fotoprotetora e antimelanogênica (MAIA et al, 2023).

Estudos clínicos realizados com a quercetina demonstraram atividades antiinflamatória e antitumoral significativa, observando também melhora na anemia e redução da pressão arterial (DABEEK, MARRA, 2019; TANG et al., 2020).

O artepelin-C (ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico) é encontrado em grandes quantidades na própolis verde brasileira e é o componente mais estudado e valorizado, contribuindo para o alto valor comercial da própolis brasileira, devido suas atividades biológicas (gastroprotetora, citotóxica, anti- inflamatórias, antidiabetes, antigenotóxicas, além de apresentar atividade antioxidante e antimicrobiana) (COSTA et al., 2018; MOACIR et al., 2011; PAULINO et al., 2008).

Figura 5 - Estrutura química do artepelin-C



Fonte: CUNHA et al., 2004

A própolis verde brasileira é proveniente de áreas cuja flora é rica em vegetação de *Baccharis dracunculifolia*, encontrada principalmente no sudeste do Brasil, nos estados de São Paulo e Minas Gerais (COSTA et al., 2018).

3.1.4 Propriedades biológicas e farmacológicas da própolis

A própolis é utilizada desde a antiguidade. Através das escrituras das antigas civilizações egípcia, greco-romana e chinesa tibetana, encontram-se receitas utilizando o mel e a própolis para combater doenças provocadas por fungos e bactérias (MARCUCCI, 1996).

Após a Segunda Guerra Mundial e em várias clínicas soviéticas, a própolis foi utilizada em pessoas feridas graças ao seu poder cicatrizante (PEREIRA, SEIXAS, NETO, 2002).

Diversos estudos científicos foram publicados demonstrando as propriedades biológicas da própolis como um potencial para infinitos usos como, por exemplo, antimicrobiana (PARK et al., 1998), antifúngica (FARNESI, 2007; FERNANDES et al., 2007), antiviral (BURDOCK, 1998), antitumoral, regeneração tecidual, citotóxica (BANKOVA et al., 2016), antioxidante, cicatrizante e anestésico (LOTFY, 2006).

Apresenta importância para o homem na indústria de alimentos (pastilhas, bombons, chicletes), na indústria de cosméticos (cremes de beleza, pasta dental, shampoos, sabonetes) e no uso veterinário (cicatrização de feridas, cortes pós-operatórios, no combate de hemorragias, no tratamento de mastite) (POBIEGA; KRAŚNIEWSKA; GNIEWOSZ; 2019; SFORCIN, 2016).

Jaski et al. (2019) avaliaram o extrato etanólico de própolis verde na proteção de plantas de feijoeiro contra duas fitobactérias (*Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*), e *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*). Usando concentrações de 0,5, 1,0, 2,5 e 5,0 % o extrato de própolis apresentou atividade antimicrobiana sobre ambas fitobactérias, indicando o potencial da própolis no controle de bacterioses.

Correa et al. (2019) realizaram um estudo identificando os principais microrganismos aeróbios presentes na superfície dos queijos do tipo gorgonzola e avaliou os efeitos antimicrobianos do extrato de própolis no desenvolvimento desses microrganismos e também uma avaliação sensorial. Em relação aos atributos sensoriais, o extrato de própolis pode ser aplicado com segurança a uma concentração de 5,0 % na superfície do queijo do tipo gorgonzola, porque nessa concentração não há interferência no paladar e no odor, e os microrganismos de interesse são completamente inibidos.

Estudos realizados com extratos de própolis aplicados na formulação de linguiça toscana em porcentagem de 0,5 a 1,0 % (m/m), indicam eficiência na prevenção da oxidação lipídica e conseqüentemente aumento da vida de prateleira (VIEIRA, 2012).

O efeito medicinal da própolis é de grande interesse também no campo da Odontologia. Em casos de cárie dentária profunda, as bactérias encontradas são o *Lactobacillus acidophilus*, classificadas como bactérias gram-positivas e aeróbios facultativos. De acordo com a pesquisa desenvolvida por Widjiastuti, Soetojo e Cahyani

(2017) o extrato etanólico de própolis com concentração de 1,56 % pode ser utilizado como um eficiente produto no combate às bactérias *Lactobacillus acidophilus*.

Estudos clínicos realizados por Mohsin et al. (2015) e Prabhakar et al. (2015), reforçaram o papel da própolis, em sua forma de extrato ou incorporada em pasta de dentes, para reduzir a carga microbiana em toda a cavidade oral.

Segundo os estudos de Marcucci (1995) a própolis também demonstrou ser efetiva no campo da dermatologia, para a cicatrização de ferimentos, regeneração de tecidos, tratamento de queimaduras, dermatite de contato e eczemas.

Li et al. (2007) observaram que os extratos etanólicos da própolis brasileira inibiram significativamente o crescimento de células em metástase derivados de carcinomas de próstata e tumores primários derivados de células de câncer de próstata em humanos.

A atividade citotóxica da própolis foi demonstrada por Grunberger et al. (1988) em culturas de tumores tanto em animais como humanos, incluindo carcinoma de mama, melanoma, tumores no cólon e rins.

Segundo estudo realizado por Matsuno et al. (1997), a citotoxicidade em tumores e em células leucêmicas deve-se ao composto artepelin-C isolado da própolis, que exibe efeito citotóxico contra células malignas tanto *in vivo* quanto *in vitro*.

3.1.5 Técnicas de Extração

Para que se consiga obter os compostos de interesse da própolis, não se pode utilizar a própolis bruta (*in natura*) diretamente, é preciso realizar um processo de extração. Inicialmente as amostras sólidas são trituradas, aumentando a superfície de contato da amostra com o solvente e, através de solventes apropriados, consegue-se remover o material indesejável e extrair os compostos bioativos (PIETTA, GARDANA E PIETTA, 2002).

São muitos os fatores que interferem no processo de extração e que devem ser considerados para se obter maior eficiência. O estado físico da amostra, a natureza do solvente, a dissolução das substâncias extraíveis, temperatura, pH, tempo e o procedimento utilizado no processo, são alguns exemplos de fatores que influenciam a natureza dos compostos químicos extraídos (ESCRICHE, BORRAS, 2018; RIGHI, NEGRI e SALATINO, 2013).

O processo de extração ocorre em função da solubilidade dos compostos químicos, e a escolha do solvente é uma etapa de grande importância, pois irá influenciar nas substâncias que serão extraídas. Como a própolis é um material complexo e de substâncias variadas, não existe um único solvente capaz de extrair todos os compostos, devido à diferença de polaridade de cada substância (BOROSKI et al., 2015).

Solventes hidrofílicos, como o metanol, etanol e acetona, e misturas com diferentes proporções com água, são comumente utilizados em processos extrativos por apresentarem os maiores rendimentos quando se deseja extrair compostos fenólicos (BOROSKI et al., 2015).

Segundo estudos, o etanol é o solvente mais utilizado na extração de própolis, apresentando sempre bons rendimentos (SFORCIN, BANKOVA, 2011; PARK et al., 1998, SFORCIN, 2016). Utilizando-o em concentrações variadas (30, 50, 70, 80 e 96 %), o melhor rendimento do extrato de própolis foi obtido na concentração de 70 %, se estabilizando com o aumento da concentração de etanol (CUNHA et al., 2004; OROIAN, DRANCA, URSACHI, 2020).

A preferência por esse solvente se dá pelo fato de ser um solvente não tóxico, permitido pela legislação e por ser um solvente apropriado para a extração de flavonoides e polifenóis da própolis (ELDEEN et al., 2017; ESCRICHE, BORRAS 2018).

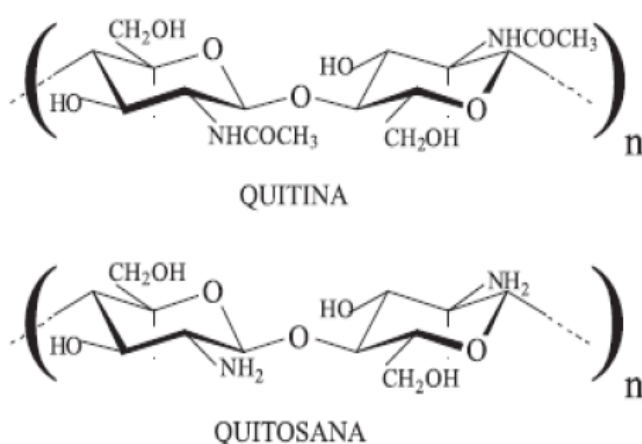
O processo de maceração é um método antigo, utilizado ao longo de décadas para a produção de extratos. A técnica consiste em colocar o material vegetal em contato com o líquido extrator, por um período de tempo pré-estabelecido. Podendo esta maceração ser estática (repouso) ou dinâmica (com movimento/agitação). Esta técnica é indicada quando se tem extratos sensíveis à degradação térmica, a fim de manter as propriedades da planta (AZMIR et al., 2013).

A estabilidade da própolis é um fator importante a ser considerado. Pois, segundo um estudo realizado por Arruda et al. (2020), a temperatura, luz e o oxigênio naturalmente presente no ar, são fatores que interferem significativamente na qualidade da própolis. Conclui-se que a melhor condição de armazenamento da própolis *in natura* é em recipientes herméticos, a temperatura inferior a - 2,5 ° C e protegida da luz.

3.2 Quitosana

A quitosana consiste em um polissacarídeo composto por 2 unidades de 2-acetamida-2-deoxi-D-glicopirranose e de 2-amino-2-deoxi-D-glicopirranose obtido pela desacetilação parcial da quitina em meio alcalino (Figura 6) (FAI et al., 2008). Quando o grau de acetilação é menor que 50 %, a quitina passa a ser chamada de quitosana, tornando-se solúvel em ácidos diluídos, como ácido acético, maleico e lático (DUTTA et al., 2011).

Figura 6- Desacetilação parcial da quitina



Fonte: COSTA et al., 2018.

A quitina é o segundo polissacarídeo mais abundante na natureza, depois da celulose. É o principal componente do exoesqueleto de crustáceos, insetos, artrópodes, sendo encontrada também nas paredes celulares de fungos e leveduras (AHSAN et al., 2018; KURITA, 2006).

É uma matéria prima de baixo custo, biodegradável e não tóxica. Sua utilização reduz o impacto ambiental causado pelo acúmulo de carapaças de crustáceos, resíduos abundantes e rejeitados pela indústria pesqueira (DUGGAN et al., 2017).

A quitosana ganhou considerável atenção nas últimas décadas por apresentar uma potente atividade antioxidante e antimicrobiana, podendo ser usada sozinha ou combinada com outros polímeros (QIN e LI, 2020).

Devido às suas propriedades, a quitosana vem sendo cada vez mais estudada e aplicada em diversas áreas: componente de cosméticos, produtos para cicatrização de feridas, agente floculante no tratamento de efluentes, formação de biofilmes, carreador de

fármacos de liberação gradual, regeneração de tecidos epiteliais, confecção de membranas artificiais, entre outros (DAS et al., 2020; FAI et al., 2008; ISLAM et al., 2020; PEERS, MONTEBAULT e LADAVIÈRE, 2020; ROWE, SHESKEY e QUINN, 2009).

3.2.1 Aplicações da quitosana

A quitosana e seus produtos são capazes de promover a cicatrização de feridas e prevenir infecções bacterianas devido à sua capacidade antimicrobiana, anti-inflamatória e formadora de filme. Assim, há atualmente disponível no mercado um grande número de curativos para feridas à base de quitosana e quitina que apresentam propriedades desejáveis. Pois, um curativo ideal, tem as seguintes propriedades: atua como uma barreira para patógenos, mantém a umidade na superfície da ferida, permite a troca gasosa e tem a capacidade de absorção e drenagem da ferida. Além de ser atóxico, não alérgico e de fácil remoção (JAYAKUMAR et al., 2011).

Estudos mostram que a quitosana pode servir como um sistema de liberação controlada de drogas anticâncer, antibióticos, vacinas e drogas peptídicas (SINHA et al., 2004). Pois, devido à sua biodegradabilidade e biocompatibilidade, é um polímero que pode incorporar ativos farmacêuticos, permanecer com eles contra a degradação e permitir sua descarga por um período prolongado (MORGANTI, MORGANTI e MORGANTI, 2011).

Em cosméticos, a quitosana e seus derivados, têm sido empregados para manter a umidade, melhorar a elasticidade do cabelo, tratar acne, tonificar a pele e também em produtos de cuidados dentários, como pasta dente e clareador dentário (SENEVIRATHNE, M. et al., 2011; STRUSZCZYK, 2002). Através das propriedades da quitosana, esses produtos são eficientes contra microrganismos patogênicos e também considerados antioxidantes, bem como seguros para a saúde, o que os torna desejáveis para muitos consumidores (CHALONGSUK e SRIBUNDIT, 2013; JIMTAISONG e SAEWAN, 2014).

A quitina e a quitosana têm sido um tópico de interesse no tratamento de águas residuais devido à sua capacidade de floculação, biodegradabilidade e não toxicidade (KAUR e DHILLON, 2014).

Para remover metais pesados de águas residuais, vários tratamentos físico-químicos são usados antes que as águas residuais sejam descarregadas no meio ambiente. Porém, muitos métodos aplicados atualmente causam poluição ambiental devido ao uso de produtos químicos sintéticos, como sulfato de alumínio e polímeros sintéticos. Assim, alternativas

“mais verdes” e seguras são uma necessidade ecológica (KAUR e DHILLON, 2014; SAIFUDDIN e KUMARAN, 2005). Com isso, estudos realizados com quitosana tem mostrado que esse polímero natural apresenta alta eficácia no desenvolvimento de biossorventes capazes de remover íons metálicos tóxicos e oferecer um desempenho superior em comparação com os adsorventes de polímero comercial (SAIFUDDIN e KUMARAN, 2005; WANG et al., 2019).

Na agricultura, a quitosana é uma alternativa natural e segura, em contrapartida ao uso de agroquímicos e agrotóxicos, que apresentam um efeito negativo a longo prazo. (KAUR e DHILLON, 2014). Capaz de provocar respostas de defesa exógenas semelhante às vacinas, a quitina tem sido usada como revestimento de sementes, garantindo proteção para frutas e vegetais, além de estimular o sistema imunológico das plantas, bem para aumentar o conteúdo fenólico, e conseqüentemente estimulando o crescimento das plantas (BENHAMOU, LAFONTAINE e NICOLE, 1994; DUTTA et al., 2009; UTHAIRATANAKIJ, TEIXEIRA e OBSUWAN, 2007; WU e LIU 2008).

3.2.2 Biofilmes de quitosana

A quitosana tem recebido atenção especial também para a formação de filmes biodegradáveis para a indústria alimentícia, na conservação de alimentos perecíveis, em função da excelente capacidade filmogênica e por apresentar boa barreira ao oxigênio e dióxido de carbono. Além disso, pode atuar como um antioxidante natural devido à quelação de íons metálicos em alimentos contendo lipídios, prolongando assim a vida útil (BOGUSLAWSKI, BUNZEIT e KNORR, 1990; PELISSARI, 2009).

Recentemente, os polissacarídeos têm atraído muita atenção como materiais de embalagem verdes, por apresentarem ampla disponibilidade, baixo custo, biodegradabilidade, além de serem reconhecidos como seguros pela *Food and Drug Administration* (FDA) (YU et al., 2022).

A quitosana é um polissacarídeo de particular interesse na indústria e na ciência de alimentos, capaz de competir com polímeros sintéticos devido à sua fácil capacidade de formação de filme, biocompatibilidade, biodegradabilidade, alta capacidade de adsorção e propriedades bactericidas e materiais de embalagem de alimentos (RAFIQUE et al., 2016).

Os filmes de quitosana já são utilizados como embalagens para diversos produtos, incluindo carnes, frutas e vegetais, explorando as propriedades conservantes intrínsecas do material (LIU et al., 2019).

Como um filme de embalagem com potencial bioativo, os grupos amino livres na estrutura da quitosana conferem-lhe certas capacidades antibacterianas e antioxidantes. No entanto, o peso molecular e a concentração de quitosana têm um efeito significativo sobre essas habilidades (ZHANG et al., 2021).

Além disso, as fracas habilidades antibacterianas e antioxidantes da quitosana não são suficientes para a preparação de filmes de embalagem de alimentos de alta qualidade. Assim, agentes antibacterianos e antioxidantes adicionais precisam ser incorporados para melhorar seu desempenho. Nos últimos anos, nanopartículas metálicas (como prata, óxido de zinco e nanomateriais de cobre) e óleos essenciais de plantas têm sido amplamente empregadas como agentes antibacterianos (JAFARZADEH, JAFARI, 2021; JU et al., 2019).

As principais desvantagens para o uso generalizado de filmes de quitosana são as propriedades mecânicas e de barreira à umidade, pois os filmes de quitosana puros tendem a ser duros e frágeis, limitando as aplicações em embalagens de alimentos. Assim, a adição de plastificantes é considerada uma das abordagens mais eficazes e práticas para melhorar as propriedades mecânicas e físicas dos filmes de quitosana (FUNDO et al., 2015).

Na forma diluída, a quitosana também pode ser pulverizada em frutas e vegetais para criar um filme protetor comestível, conhecidos como filmes bioativos, que apresentam propriedades mecânicas, antimicrobianas e promovem maior capacidade nutricional ao alimento (EL-DIASTY et al., 2012; MUZZARELLI e MUZZARELLI, 2005; RIBEIRO et al., 2007).

4 PARTE EXPERIMENTAL

4.1 Amostra

Para o estudo, foi utilizada uma amostra de própolis verde, cedida pela empresa Apis Global Produtos Alternativos Ltda., proveniente majoritariamente do alecrim do campo (*Baccharis dracunculifolia*), lote 001/19, coletada na região de Caxambú/MG, Brasil nos meses de outubro, novembro e dezembro de 2019.

Foi realizada a caracterização da amostra pela PROBee Consultoria e Controle de Qualidade de Produtos Apícolas e naturais, através das análises de: determinação do teor de cinzas, umidade, cera, impurezas mecânicas, fenólicos, flavonoides e solubilidade em álcool. O laudo foi fornecido pela empresa Apis Global.

A amostra foi acondicionada em embalagem plástica à vácuo, conforme exibido na Figura 7, e armazenada sob refrigeração e protegida da luz até sua utilização.

Figura 7- Foto da amostra de própolis utilizada nos experimentos.



Fonte: autoria própria (2020).

4.1.1 Secagem por liofilização

Inicialmente a amostra foi triturada manualmente por meio de um gral com pistilo. Foi pesada em balança analítica (Shimadzu ATY224), sendo congelada a $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$ em

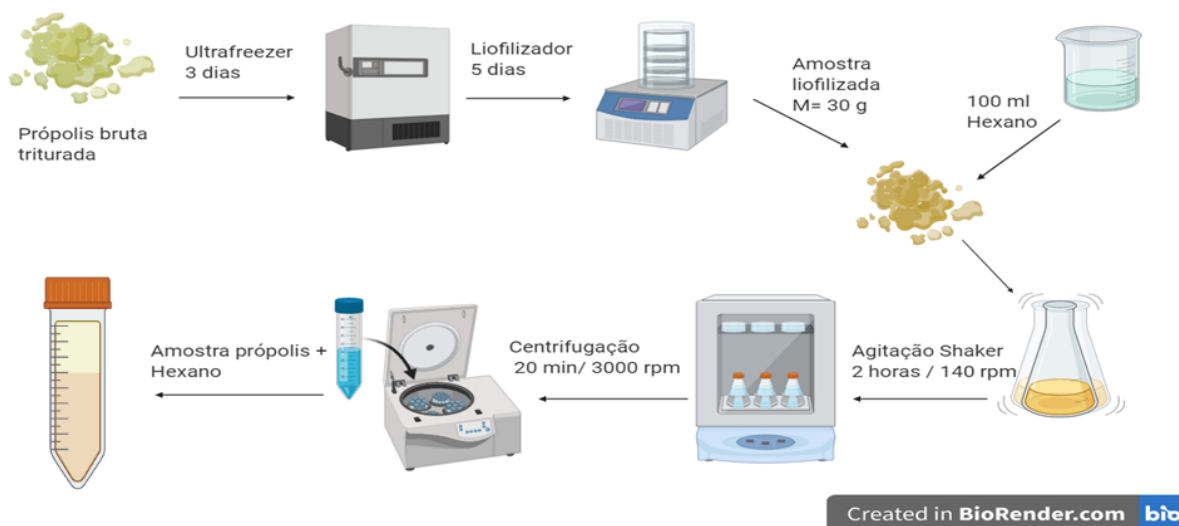
ultrafreezer (Coldlab) por 3 dias e posteriormente submetida a um liofilizador (Liotop-L101) por 5 dias, para retirada de água.

4.1.2 Pré- tratamento com hexano

Depois de liofilizada, pesou-se aproximadamente 30,0 g da amostra (Shimadzu ATY224) em um erlenmeyer, adicionando 100,00 mL de hexano ($d= 0,6669 \text{ g mL}^{-1}$, Neon) e mantida sob agitação de 140 rpm, em agitador (Thoth 6430) a 25 °C, por um período de 2 h.

Posteriormente, as amostras foram centrifugadas (Parsec – CT-0603) a 3000 rpm por um período de 20 minutos e após a separação das fases, a fração de hexano foi armazenada em frasco âmbar e a amostra de própolis foi seca em capela de exaustão por aproximadamente 12 h. O diagrama esquemático do procedimento do pré-tratamento pode ser visualizado na Figura 8.

Figura 8 - Metodologia para pré-tratamento com hexano da amostra de própolis.



Fonte: autoria própria (2020).

4.1.3 Elaboração dos extratos

Para a elaboração dos extratos foram utilizados 3 solventes com diferentes polaridades (água, etanol e acetato de etila), com o intuito de obter compostos bioativos diferentes.

Os extratos foram elaborados de acordo com o planejamento experimental obtido com auxílio do programa DesingExpert (Statease) versão trial 13.0 , para misturas de 3 componentes (água, etanol e acetato de etila), discriminados na Tabela 3.

Tabela 3 - Volumes em mL dos solventes utilizados na elaboração dos extratos, seguindo planejamento experimental 2³

Extrato	Solvente		
	Água	Etanol	Acetato de etila
1	100,00	-	-
2	-	100,00	-
3	33,33	33,33	33,33
4	-	-	100,00
5	50,00	50,00	-
6	50,00	50,00	-
7	50,00	-	50,00
8	16,67	66,67	16,67
9	-	-	100,00
10	-	100,00	-
11	16,67	16,67	66,67
12	100,00	-	-
13	50,00	-	50,00
14	66,67	16,67	16,67

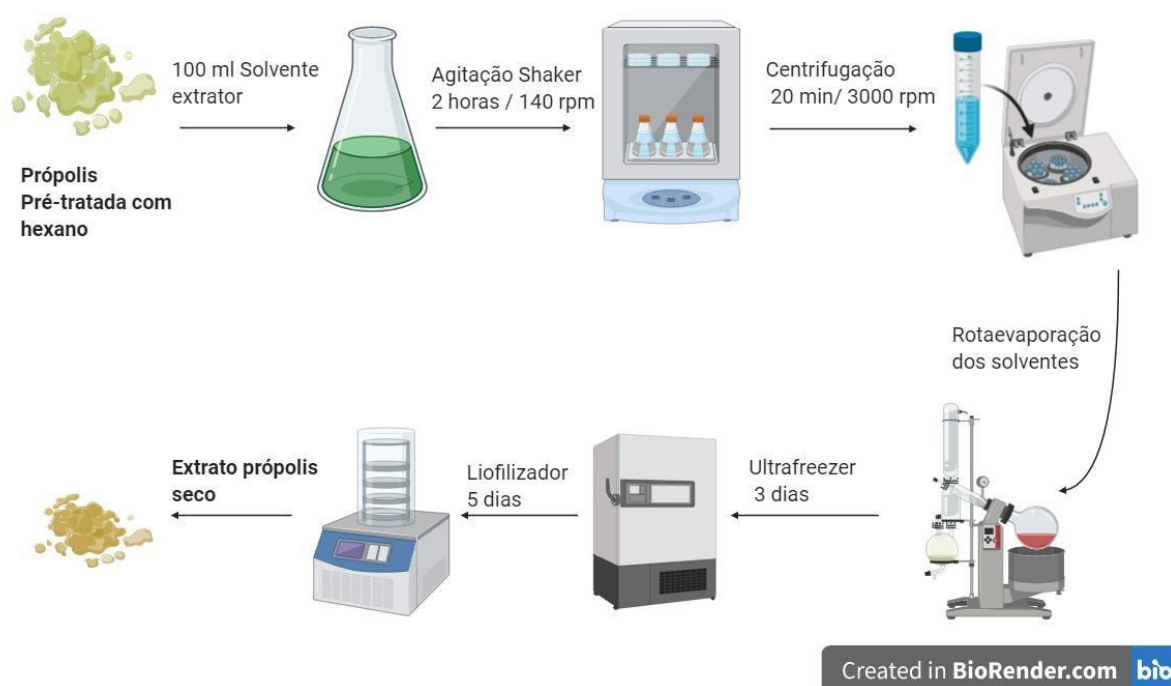
Fonte: autoria própria (2020).

Para a elaboração dos extratos, 5,0 g da amostra pré-tratada com hexano foi pesada em um erlenmeyer e extraído com 100 mL de solvente, de acordo com a Tabela 1, sob agitação de 140 rpm em agitador (Thoth 6430), por 2 h a 25 °C. A porção insolúvel foi separada por centrifugação (Parsec – CT-0603) a 3000 rpm durante 20 minutos.

Posteriormente, os solventes foram levados a evaporador rotativo (Solab-126), para retirada dos solventes orgânicos, os extratos foram congelados em ultrafreezer (Coldlab) por 3 dias e em seguida, liofilizados (Liotop-L101) por 5 dias, em frascos previamente pesados, para cálculo de rendimento. Os extratos que continham apenas água foram levados ao ultrafreezer por 3 dias e depois ao liofilizador por 5 dias.

O diagrama esquemático do procedimento de elaboração dos extratos pode ser visualizado na Figura 9.

Figura 9 - Procedimento para elaboração dos extratos de própolis.



Fonte: autoria própria (2020)

4.1.4 Determinação de compostos fenólicos totais

Para a quantificação dos compostos fenólicos foi utilizado o método de Folin-Ciocalteu modificado por Boroski et al., (2015).

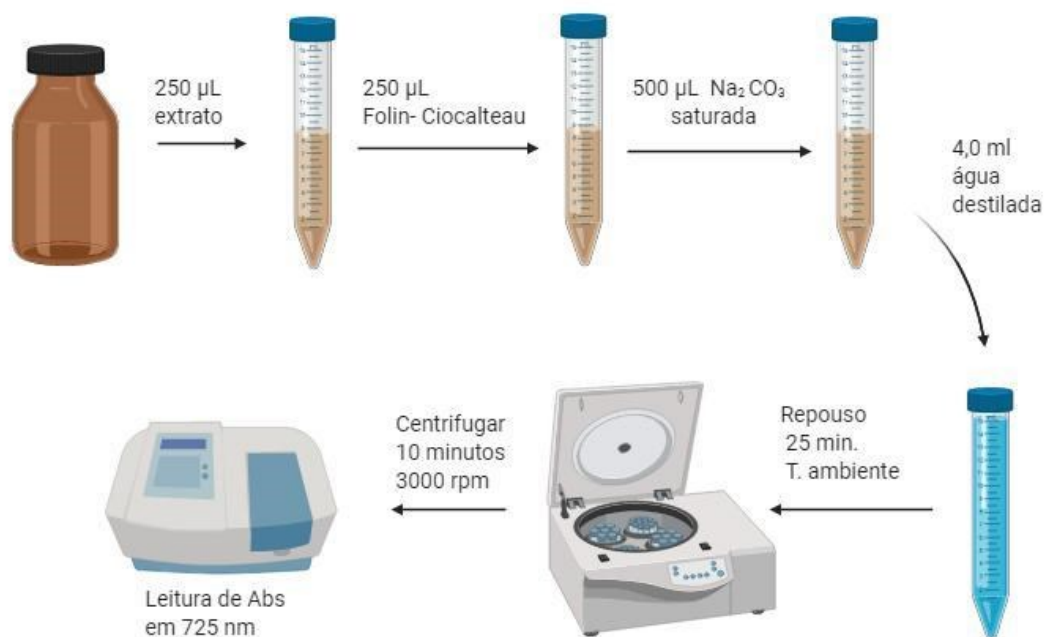
A curva de calibração foi realizada usando-se uma solução padrão de ácido gálico (Sigma) 200 mg L^{-1} em água destilada, no intervalo de $0 - 200 \text{ mg L}^{-1}$. Foi estabelecida a equação da reta utilizando-se o método de regressão linear.

As amostras de extratos foram preparadas em metanol (Synth) sob proteção da luz, ajustando uma concentração final de $1,0 \text{ mg mL}^{-1}$. Dessa solução, foram coletados $250 \mu\text{L}$, adicionando $250 \mu\text{L}$ do reagente de Folin-Ciocalteu (1:1), $500 \mu\text{L}$ da solução saturada de carbonato de sódio e $4,0 \text{ mL}$ de água destilada. As amostras foram agitadas e mantidas em temperatura ambiente, sob proteção da luz, por 25 minutos e logo após centrifugadas (Parsec- CT-0603) por 10 minutos a 3000 rpm .

A absorbância da fração líquida foi determinada em espectrofotômetro UV-Vis no comprimento de onda de 725 nm , em cubetas de quartzo de 1 cm de caminho óptico. Foi preparado um branco utilizando $250 \mu\text{L}$ de metanol no lugar da amostra, seguindo com as mesmas condições como descrito para a amostra.

Todas as amostras foram preparadas em triplicata. O fluxograma da metodologia de compostos fenólicos está exposto na Figura 10.

Figura 10-Fluxograma para determinação de Compostos fenólicos.



Created in BioRender.com 

Fonte: autoria própria (2020).

4.1.5 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi determinada através da técnica de diluição em microplacas de 96 poços (KASVI – K12-096) conforme metodologia descrita no documento M7-A6 (2003) - Metodologia dos Testes de Sensibilidade a Agentes Antimicrobianos por Diluição para Bactéria de Crescimento Aeróbico: Norma aprovada-NCCLS (2003).

Para o estudo foram utilizadas quatro culturas de microrganismos: *Bacillus cereus* (ATCC 11778), *Escherichia coli* (ATCC 5922), *Salmonella enterica* (ATCC 13076) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923).

Todas as bactérias estavam armazenadas em congelador à temperatura de -20 °C e antes da realização do experimento, foram replicadas em meio Müeller-Hinton (Oxoid, Basingstoke) líquido e incubadas em estufa (Ethik - 411D) a 35 °C por 24 h.

Para a padronização do inóculo, uma pequena porção da solução bacteriana foi suspensa em 5,0 mL de salina. A turvação da suspensão foi, então, comparada visualmente com o padrão de 0,5 da escala de MacFarland, que equivale a aproximadamente $1,0 \times 10^8$ UFC mL⁻¹. Desta solução, foi feita uma diluição em microtubos de centrifugação, onde 50 µL da suspensão bacteriana foram adicionadas em 950 µL de caldo Müeller-Hinton.

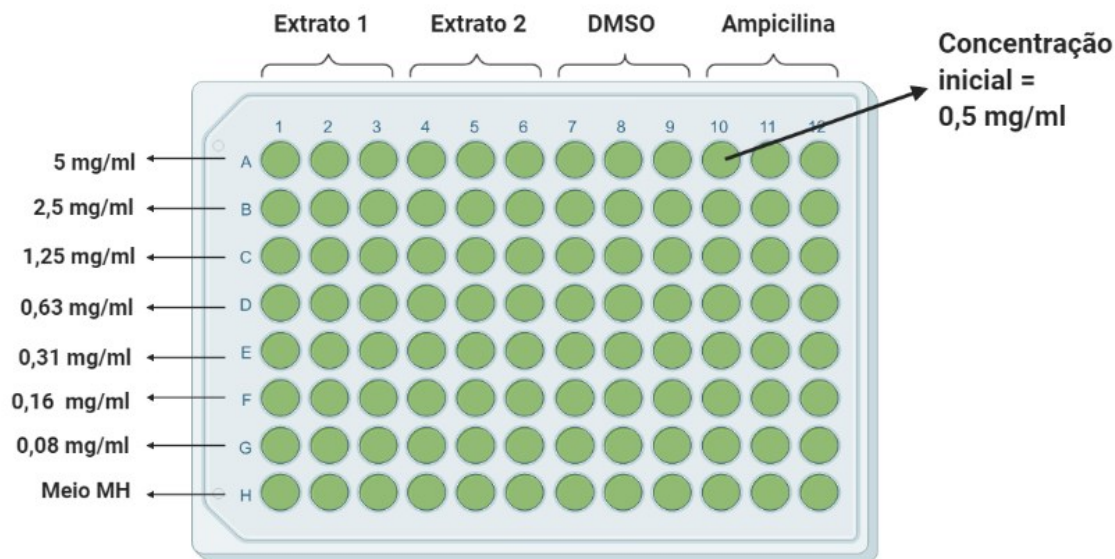
Para o preparo das amostras teste, foram pesados $\pm 10,0$ mg do extrato em um microtubo e adicionado 50 µL de dimetilsulfóxido (DMSO) com agitação em vórtex até a completa dissolução. Posteriormente, foram adicionados 950 µL de caldo Müeller-Hinton e homogeneizado.

Para o teste de microdiluição em placas de 96 poços, inicialmente foi adicionado 100 µL de caldo Müeller-Hinton em todos os poços. Em seguida foram acrescentados 100 µL das soluções com extrato e realizada a diluição seriada (1:2), transferindo 100 µL do poço A ao poço G através de uma micropipeta multicanal.

Posteriormente, foi adicionado a cada poço da placa 10 µL da suspensão bacteriana padronizada e diluída. Como controle positivo foi utilizado a ampicilina anidra (Sigma) na concentração de 1 mg mL⁻¹ em caldo Müeller-Hinton. Também foram realizados o controle do meio de cultura, o controle de crescimento bacteriano e o controle negativo com dimetilsulfóxido (DMSO), com concentração igual a 5 %.

As microplacas foram incubadas a 35 °C por 24 h e os testes foram realizados em triplicata. A Figura 11 mostra o esquema das microdiluições.

Figura 11- Microdiluições em placa de 96 poços.



Fonte: autoria própria (2020).

A leitura das placas foi realizada através do revelador cloreto de trifeniltetrazólio (CTT) a 0,5 %, onde 20 μ L foram adicionados em todos os poços da microplaca e incubados a 35 $^{\circ}$ C por 3 h. No decorrer desse tempo, os extratos que apresentaram atividade antimicrobiana permaneceram incolores, diferente dos poços que coraram de vermelho/rosado indicando crescimento bacteriano. Assim, a concentração inibitória mínima foi definida como a menor concentração que inibiu o crescimento do inóculo.

4.2 Análise estatística para otimização dos extratos de própolis verde

Para encontrar o ponto otimizado da mistura de solventes para a preparação dos extratos, os resultados foram avaliados por meio de análise estatística utilizando o software Design expert, versão 13.0.

Foram analisados os seguintes parâmetros: a composição do solvente extrator utilizada no planejamento experimental simplex-centróide, a análise de variância dos resultados, a modelagem e construção do gráfico de superfície de resposta e a aplicação das funções de desejabilidade para determinar a composição da mistura extratora que resulta no maior valor de compostos fenólicos totais. O nível de significância considerado foi de 0,05.

4.3 Quantificação de compostos do extrato de própolis otimizado por cromatografia líquida de alta eficiência

Após a determinação da composição da melhor mistura de solvente extrator para a amostra de própolis verde, o extrato otimizado foi avaliado para a quantificação de compostos bioativos por Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), baseado no método descrito por Çayan et al. (2020) com algumas modificações.

O cromatógrafo utilizado foi Dionex UltiMate 3000 (Thermo Fisher Scientific), equipado com detector UV-VIS (VWD-3400RS), bomba quaternária (LPG-3400SD), forno (TCC-3400RS) e sistema de injeção manual. O software utilizado para análise de dados foi Chromeleon 7. A separação cromatográfica foi realizada em coluna C18 (octadecilsilano) Waters Acquity BEH (250 mm × 4,6 mm x 5 µm). A fase móvel foi composta de água ultrapura acidificada com ácido acético 0,5% (pH 3,03) e metanol acidificado com ácido acético 0,5 % (pH 3,52), com eluição por gradiente. A composição inicial foi de água e metanol (85:15, v/v), com aumento de metanol até 30 minutos (40:60, v/v), essa proporção foi aumentada até 35 minutos (5:95, v/v), mantendo essa proporção até 40 minutos.

Para a construção da curva de calibração foi utilizada uma solução padrão mix contendo o ácido cafeico, clorogênico e ácido p-cumárico a 1 mg mL⁻¹ em etanol 99,98%. A partir da diluição desta solução, foram preparadas outras soluções no intervalo de 0-0,5 mg mL⁻¹. Assim, foi estabelecida a equação da reta utilizando-se o método de regressão linear.

As amostras foram preparadas na concentração de 1 mg mL⁻¹ em etanol 99,98 % e filtradas em membrana nylon hidrofílica, de abertura de poro de 0,22 µm (Merck®). O fluxo utilizado foi de 1,0 mL min⁻¹, temperatura da coluna de 40 °C, volume de injeção de 20 µL, comprimento de onda de 280 nm e tempo de equilíbrio de 5 minutos entre as injeções.

4.4 Filme de quitosana incorporado com extrato de própolis

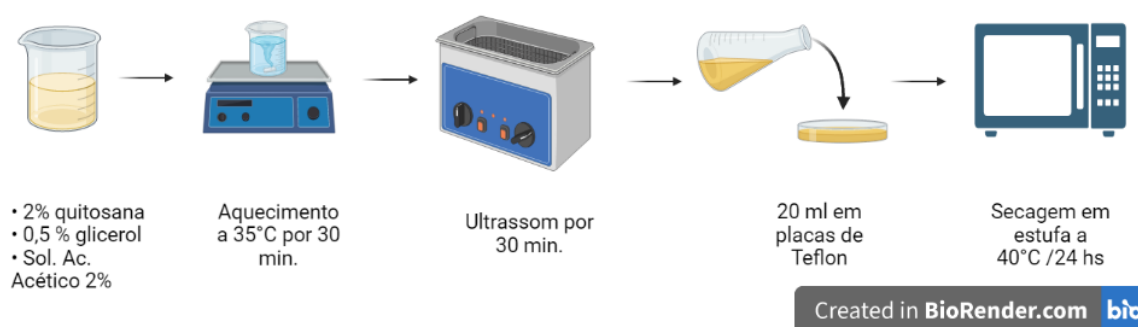
4.4.1 Elaboração do biofilme

Posteriormente, o extrato otimizado foi incorporado no biofilme de quitosana, na concentração de 1 %. Foram produzidos também biofilmes de controles positivos (C+), um com ampicilina (1 mg mL⁻¹) e outro com o antioxidante sintético BHA (0,01 %) e o controle negativo (C-), sem nenhuma substância incorporada.

Os filmes biopoliméricos de quitosana foram obtidos pela técnica *casting*, a qual consiste na desidratação de uma solução coloidal, denominada solução filmogênica (SF). Os filmes foram preparados a partir de uma solução contendo 2 % de quitosana (Êxodo), 0,5 % de glicerol (Synth), como agente plastificante, suspensos em uma solução de ácido acético

2%. Essa solução foi então submetida ao aquecimento de 35 °C sob agitação constante (Tecnal-TE-0854) por 30 minutos e posteriormente levada a banho ultrassônico (Cristófoli-Biossegurança) por 30 minutos. Após esse tempo, 20 mL da solução foi vertida em placas de teflon e submetidas à secagem em estufa com circulação de ar a uma temperatura de 40 °C por 24 h (ARAÚJO, 2014). Então, os filmes foram cuidadosamente removidos da placa e armazenados separadamente em placas de Petri lacradas e mantidas em dessecador à temperatura ambiente, até análises posteriores. O fluxograma da elaboração dos biofilmes está exposto na Figura 12.

Figura 12– Fluxograma da elaboração dos biofilmes



Fonte: autoria própria (2022).

4.4.2 Avaliação macroscópica

Os filmes formados foram avaliados quanto às suas características morfológicas macroscópicas: ausência de bolha de ar, homogeneidade, rachaduras, resistência, elasticidade e textura.

4.4.3 Espessura

A espessura dos filmes foi medida com um paquímetro analógico de precisão 0,05 mm, sendo medido cinco pontos aleatórios do biofilme em diferentes partes, e calculada a média aritmética dos valores (LUCENA et al., 2017).

4.4.4 Microscopia óptica

A análise de microscopia óptica foi realizada observando a morfologia dos filmes em microscópio óptico (Zeiss modelo Axioscope 5). Filmes de 1 cm² foram colocados cuidadosamente sobre a lâmina, coberta com lamínula e observada em ampliação de 40 vezes. As imagens foram registradas com câmera AxioCam modelo 702 mono.

4.4.5 Microscopia eletrônica de varredura

A morfologia da superfície dos biofilmes foi analisada por meio da Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), após os filmes serem acondicionados em dessecadores contendo sílica gel, por 5 dias. As amostras foram fixadas em um suporte metálico com fita de carbono e, em seguida, metalizadas com uma fina camada de ouro (Marca Quorum, Modelo SC7620) para análise microscópica em um microscópio modelo VEGA 3 da Tescan, utilizando uma voltagem de 10 kV. As imagens foram obtidas por elétron secundário, que fornecem imagem de topografia da superfície da amostra e são os responsáveis pela obtenção das imagens de alta resolução, com ampliações de 90x, e distâncias de trabalho de aproximadamente 15 mm.

4.4.6 Solubilidade em água

Para a análise da solubilidade dos biofilmes em água, estes foram cortados em quadrados de 1 cm², secos em estufa (Solab) a 105 °C por 24 h e pesados. Após a pesagem, as amostras foram colocadas em erlenmeyers contendo 50 mL de água destilada e agitadas a 140 rpm a 25 °C em incubadora refrigerada de agitação orbital (Troth 6430) por 24 h. Após esse período, as amostras foram filtradas e secas novamente em estufa (105 °C por 24 h). Assim, foi calculada a solubilidade em água pela Equação 1 (GALINDO, 2017).

$$SOL = \frac{m_i - m_f}{m_i} \times 100 \quad (1)$$

Onde: SOL= solubilidade em água (%); m_i = massa seca inicial (g); m_f = massa seca final (g).

4.4.7 Permeabilidade ao vapor de água

A permeabilidade ao vapor de água foi determinada gravimetricamente de acordo com o método ASTM E96/E96M (ASTM, 2010), com modificações. Em frascos de 50 mL, foi colocada sílica gel dessecante, previamente ativada em estufa de secagem (Solab SL-100) por 3 h a 60 °C, para retirar qualquer resquício de umidade. Tais frascos foram lacrados com as amostras de biofilmes, cuidadosamente seladas com parafilme e colocados dentro de um dessecador no qual continha 200 mL de solução salina de cloreto de cálcio 10 % (m/v), para conferir a umidade relativa de 75 % dentro do dessecador.

Posteriormente, o dessecador foi fechado a vácuo e o mesmo foi levado à estufa a temperatura de 25 °C. Durante cinco dias consecutivos, em um intervalo de 24 h, as amostras foram pesadas e colocadas novamente no dessecador. Foram realizadas triplicatas para cada formulação.

A permeabilidade ao vapor de água (PVA) do filme foi calculada com a equação 2:

$$PVA = \frac{\Delta m \times e}{A \times t \times P_0 \times (UR1 - UR2)} \quad (2)$$

Onde: Δm : é a variação de massa do sistema (g); e: espessura do filme (mm); A: área exposta do filme (m²); t: tempo de exposição (h); P₀: Pressão de vapor da água (P_a) na temperatura do teste (3,17 kPa); (UR1-UR2): diferença entre a umidade relativa (%).

4.4.8 Atividade antioxidante dos biofilme

A atividade antioxidante dos filmes foi baseada na medida da extinção da absorção do radical 2,2-difenil-1-picril hidrazila (DPPH) de acordo com o procedimento descrito por Siripatrawan e Harte (2010), com algumas modificações.

Os biofilmes foram cortados em pequenos pedaços (aproximadamente 25 mg) e foram deixados sob agitação, durante 24 horas, em tubos de ensaio lacrados contendo 3 mL de metanol em temperatura ambiente, sob proteção da luz. Após este período, adicionou-se 1 mL de uma solução metanólica 0,1 mM de DPPH e manteve-se as amostras em repouso por 30 minutos no escuro. A absorbância das amostras foi medida em espectrofotômetro UV-Vis, no comprimento de onda de 517 nm, em cubetas de quartzo de 10 mm de caminho óptico. Um controle negativo (sem adição do biofilme) foi incubado em paralelo.

O percentual de captação do radical DPPH foi calculado em termos da percentagem de atividade antioxidante (AA %), conforme a Equação (3):

$$AA\% = \frac{(Abs. DPPH - Abs. amostra)}{Abs. DPPH} \times 100 \quad (3)$$

Onde: Abs. DPPH é a absorbância sem a adição do biofilme, Abs. Amostra corresponde à absorbância do biofilme em análise.

4.4.9 Estudo de migração dos agentes ativos dos biofilmes com própolis

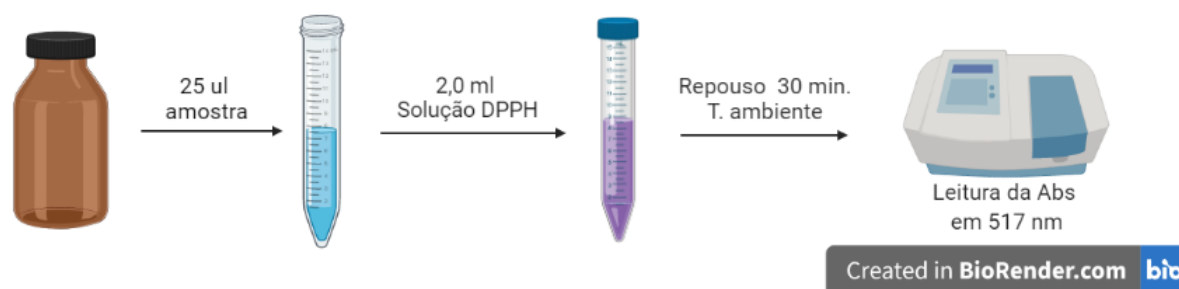
Para a avaliação da migração dos agentes ativos da própolis a partir dos biofilmes, usou-se o método de atividade antioxidante do sequestro do radical livre estável 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH) realizada a partir de metodologias originais (BRANCD-WILLIAMS; CUVELIER; BERSET, 1995; KIRIGAYA; KATO; FUJIMAKI, 1971) modificado por Boroski et al., (2015).

Para a construção da curva de calibração foi utilizada uma solução padrão de Trolox 2000 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em metanol PA, sob proteção da luz. A partir da diluição desta solução, foram preparadas outras soluções de Trolox no intervalo de 0-2000 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Assim, foi estabelecida a equação da reta utilizando-se o método de regressão linear.

As liberações de antioxidantes dos biofilmes foram determinadas utilizando como simulador de alimento água destilada. Assim, amostras do biofilme foram cortadas (100 mg) e suspensas em 6 mL de água destilada. Após os intervalos de tempo de 0, 1, 2, 4, 6, 8, 14, 16, 18 e 24 horas foi retirada uma alíquota de 25 μL do meio, adicionando 2 mL da solução de DPPH ($9,1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) em metanol. Posteriormente, as amostras foram homogeneizadas e mantidas em temperatura ambiente, sob proteção da luz por 30 minutos. Como controle positivo foi preparado um biofilme com BHA, na concentração de 0,01 %.

A absorbância das amostras foi medida em espectrofotômetro UV-Vis, no comprimento de onda de 517 nm, em cubetas de quartzo de 1 cm de caminho óptico. Todas as amostras foram preparadas em triplicata. O fluxograma da metodologia para determinação da atividade antioxidante pelo método DPPH está exposto na Figura 13.

Figura 13- Metodologia para determinação da atividade antioxidante dos biofilmes pelo método DPPH.



Fonte: autoria própria (2022).

4.4.10 Atividade antimicrobiana dos biofilmes

A atividade antimicrobiana dos biofilmes foi testada usando as cepas de *Bacillus cereus* (ATCC 11778), *Escherichia coli* (ATCC 5922), *Salmonella enterica* (ATCC 13076) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) através do método de macrodiluição em caldo da norma M27-A2 da NCCLS (2002) com algumas modificações.

Inicialmente os biofilmes foram cortados em quadrados de 0,5 cm e 1 cm de lado e posteriormente, esterilizados por radiação ultravioleta em capela de fluxo laminar vertical (Veco- CFLV09) por 15 minutos de cada lado.

Em tubos de ensaio pequenos foram reproduzidas as mesmas condições de concentração celular empregadas anteriormente no teste de CIM ($5,0 \times 10^5$ cél mL⁻¹). Sendo assim, em tubos de ensaio foram pipetados 2985 µL de caldo Mueller-Hinton e adicionado 15 µL do inóculo, previamente padronizados de acordo com a escala 0,5 de MacFarland. Os biofilmes foram adicionados e os tubos foram incubados a 35 °C por 24 h.

Para o controle positivo (crescimento biológico sem o biofilme), apenas os microrganismos foram incubados em caldo MH, enquanto para o controle negativo (contaminação microbiológica da solução), os tubos continham apenas caldo MH e solução salina.

Após 24 horas de incubação, o resultado foi obtido por meio da comparação visual da quantidade de crescimento (turvação) nos tubos contendo as amostras em relação ao tubo controle negativo (sem nenhum biofilme).

Em seguida, as culturas foram submetidas à diluição seriadas e semeadas em placas de ágar MH, que foram incubadas por 24 h para a contagem dos microrganismos viáveis.

4.5 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o sistema estatístico Software R, Design expert versão 13.0 e Microsoft excel. Os testes de estatística descritiva (média e desvio padrão) e de estatística inferencial (teste de Tukey e ANOVA) foram aplicados na quantificação de compostos fenólicos no extrato de própolis e nos resultados obtidos das análises físico-químicas.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Características físico-químicas da amostra de própolis

Inicialmente própolis verde foi submetida a análises de controle de qualidade, solicitada pela própria empresa, a fim de verificar se a mesma obteve os parâmetros exigidos em legislação.

Assim, os parâmetros analisados da própolis foram comparados com os limites estabelecidos com a legislação vigente (Portaria nº. 025, DIPPOA, de 31 de julho de 2000, anexo VII, Ministério da Agricultura, Brasil), conforme apresentado na Tabela 4.

Tabela 4- Características físico-químicas da própolis verde exigidos pela legislação e os resultados encontrados

Parâmetro avaliado	Teores exigidos pela legislação	Resultado (%)
Umidade	Máximo de 8 %	5,9 %
Cera	Máximo de 25 %	17 %
Cinzas	Máximo de 5 %	2,3 %
Impureza mecânica	Máximo de 40 %	26 %
Atividade de oxidação	Máximo 22 seg.	4,1 seg.
Compostos fenólicos	Mínimo 5,0%	8,2 %
Compostos flavonoides	Mínimo 0,5 %	2,4 %
Solúveis em etanol	Mínimo 35 %	70,2 %

Fonte: Probee, 2019

Através da análise de dados da Tabela 4 foi possível observar que a amostra de própolis estava dentro de todos os limites estabelecidos quanto ao percentual de umidade, ceras, cinzas, impurezas mecânicas, atividade de oxidação, compostos fenólicos e flavonoides, assim como os compostos solúveis em etanol exigidos em legislação.

Sabe-se que a determinação de umidade é um parâmetro importante a ser avaliado, pois um elevado teor de umidade na própolis favorece o crescimento de fungos e torna o produto impróprio para consumo e comercialização (BRASIL, 2001b).

A cera é naturalmente adicionada no processo de elaboração da própolis pelas abelhas, no entanto maior quantidade de cera pode ser incorporada à própolis, de acordo com a necessidade da colônia. Isso pode acontecer em períodos em que as abelhas necessitam vedar a colmeia, como no inverno ou em períodos chuvosos, mas não encontram uma quantidade satisfatória de resinas nas plantas vizinha. Portanto, valores elevados de cera implicam menor teor de resinas bioativas extraíveis em etanol, responsáveis pelas atividades biológicas da própolis (SAWAYA et al., 2011).

Já o teor de cinzas representa a quantificação da matéria de origem mineral na amostra, e é importante na avaliação da qualidade da própolis, pois teores elevados podem evidenciar possíveis adulterações do produto pela adição de areia ou outros materiais, ou podem ser decorrentes de contaminações durante os procedimentos de coleta e manipulação do produto (MELO et al., 2012).

O termo impureza mecânica refere-se às partículas incorporadas à própolis durante a sua elaboração pelas abelhas ou na sua retirada das colmeias, como fragmentos de folhas e insetos, pedaços de madeira. Como indicador da qualidade da própolis, valores elevados deste parâmetro podem indicar colheita e processamento inadequados do produto ou adulteração (MELO et al., 2012; SAWAYA et al., 2011).

A atividade de oxidação é um parâmetro que sofre variações quanto ao período pós-colheita e às condições de armazenamento da própolis, cujos longos períodos de armazenamento em condições de elevada temperatura provocam aumento desse parâmetro, com efeitos sobre sua atividade biológica (MELO et al., 2012). Em decorrência disso, a legislação limita o índice de oxidação em até 22 segundos. Observa-se estreita relação entre o índice de oxidação e os teores de compostos fenólicos e flavonoides, especialmente em alguns tipos de própolis, como a própolis verde (BASTOS et al., 2011).

Quando os compostos fenólicos e flavonoides são analisados, eles merecem destaque, pois são atribuídas importantes atividades farmacológicas. Seus teores são utilizados como parâmetros para o controle da qualidade da própolis (LUSTOSA et al., 2008).

Finalmente, os constituintes voláteis (solúveis em etanol) presentes na própolis, são bastante úteis para sua caracterização, uma vez que reflete a quantidade de resinas bioativas

extraíveis pelo solvente (SAWAYA et al., 2011). Esse parâmetro pode estar relacionado aos teores de compostos fenólicos e flavonoides e estão envolvidos na atividade antimicrobiana, podendo fornecer valiosas informações acerca da origem botânica da própolis (BASTOS et al., 2011; TORRES et al., 2008).

5.2 Quantificação de compostos fenólicos totais em extratos de própolis

A Tabela 5 apresenta os resultados da quantificação de compostos fenólicos dos extratos elaborados a partir das misturas de solventes indicadas pelo planejamento experimental.

Tabela 5 - Variáveis não codificadas em mL e resultados da análise de compostos fenólicos dos extratos de própolis em mg EAG g⁻¹ de extrato, elaborados à partir do planejamento experimental

Extratos	Água	Etanol	Acetato de etila	Fenólicos totais
1	100,00	-	-	109,9 ± 3,9
2	-	100,00	-	70,2 ± 1,6
3	33,33	33,33	33,33	162,1 ± 2,1
4	-	-	100,00	72,4 ± 4,8
5	50,00	50,00	-	120,1 ± 0,5
6	50,00	50,00	-	146,8 ± 5,7
7	50,00	-	50,00	89,4 ± 0,7
8	16,67	66,67	16,67	90,9 ± 0,4
9	-	-	100,00	67,3 ± 0,5
10	-	100,00	-	78,9 ± 1,7
11	16,67	16,67	66,67	86,9 ± 2,9
12	100,00	-	-	112,1 ± 0,6
13	50,00	-	50,00	62,0 ± 2,0
14	66,67	16,67	16,67	96,4 ± 1,4

Fonte: autoria própria (2020).

Avaliando os resultados, pode-se concluir que a melhor extração dos compostos fenólicos ocorreu no extrato 3 (33,3 mL água + 33,3 mL etanol + 33,3 mL acetato de etila), com 162,21 mg equivalente de ácido gálico por grama de amostra (EAG g⁻¹). Em seguida, os maiores teores foram visualizados nos extratos 5 e 6, onde foram utilizados a mesma proporção de solventes (50 mL etanol + 50 mL água) na elaboração, resultando em 120,1 mg EAG g⁻¹ e 146,8 mg EAG g⁻¹, respectivamente.

Esse resultado está de acordo com diversas pesquisas que relatam que a própolis tem conteúdo fenólico total variando de 10,94 a 197,14 mg EAG g⁻¹ (ZEHRA et al., 2015). A atividade antioxidante de extratos vegetais se deve à presença de compostos fenólicos, moléculas capazes de capturar radicais livres através da doação de hidrogênio e/ou transferência de elétrons, retardando a oxidação e estabilizando o sistema (DEGÁSPARI e WASZCZYNSKYJ, 2004). Sendo assim, pode-se correlacionar a presença destes compostos no extrato de própolis com a atividade antioxidante.

Pesquisas encontradas na literatura apontam que a extração utilizando entre 50 e 80 % de etanol seja o método mais eficiente para a obtenção de compostos antioxidantes (OROIAN, DRANCA, URSACHI, 2020; PARK et al., 1998; SUN et al., 2015).

Segundo Oroian, Dranca e Ursachi (2020), diferentes solventes podem extrair diferentes compostos. Sendo assim, a concentração de etanol afeta diretamente a polaridade do solvente, com consequente extração de moléculas polares presente no extrato.

Porém, é importante ressaltar que a extração de compostos fenólicos é influenciada por diversos fatores, como a natureza da própolis, solvente, método e o tempo de extração empregado (ESCRICHE, BORRAS, 2018; OROIAN, DRANCA, URSACHI, 2020).

De acordo com a pesquisa desenvolvida por Escriche e Borrás (2018), verificou-se que o tipo de própolis teve mais influência no rendimento do teor de compostos fenólicos do que o método de extração empregado.

Zehra et al. (2015), analisaram as propriedades antioxidantes de amostras de própolis de 15 locais diferentes no Azerbaijão e concluíram que a capacidade antioxidante das amostras em estudo pode depender não só da flora da região mas também de muitos outros fatores, como a idade e as condições físicas das colmeias, características florais da região de coleta e também o método usado para colher as amostras.

5.3 Determinação da atividade antimicrobiana em extratos de própolis

O extrato de própolis é uma das fontes mais promissoras de compostos bioativos com atividade antimicrobiana (PARK, IKEGAKI, ALENCAR, 2000).

Estudos apontam que as plantas possuem a capacidade de sintetizar compostos fenólicos naturalmente através de um mecanismo de defesa a infecções microbianas (KUMAR e PANDEY, 2013). Desta forma, é possível correlacionar estas substâncias com a atividade antimicrobiana.

Segundo Park et al., (2015) essa atividade antimicrobiana é promovida pelo mecanismos de interação do composto fenólico com a região hidrofílica dos fosfolipídios na membrana celular e a eventual penetração destes ao núcleo hidrofóbico do microrganismo.

Considerando que a própolis possui potencial antimicrobiano, a análise de CIM teve como objetivo avaliar sua eficácia diante de determinados microrganismos, visando sua aplicação em produtos alimentícios, avaliando a vida de prateleira e a garantia da segurança e qualidade microbiológica.

Os resultados obtidos para a atividade antimicrobiana pelo método de microdiluição está disposta na Tabela 6.

Tabela 6- Valores da concentração inibitória mínima (CIM) em mg mL⁻¹ dos extratos de própolis elaborados à partir do planejamento experimental

Extratos	Concentração Inibitória Mínima (mg mL ⁻¹)			
	Bactérias Testadas			
	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	<i>B. cereus</i> ATCC 11778	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>S. enterica</i> ATCC 13076
1	> 5,10	> 5,10	> 5,10	> 5,10
2	1,28	0,32	5,13	> 5,13
3	0,32	0,32	> 5,18	> 5,18
4	0,63	0,63	> 5,04	> 5,04
5	0,65	0,65	> 5,20	> 5,20
6	0,31	0,31	> 5,01	5,01
7	0,64	0,64	> 5,08	> 5,08
8	0,64	0,32	5,13	> 5,13
9	0,64	0,64	> 5,08	> 5,08
10	1,25	0,63	> 5,01	> 5,01
11	0,65	0,32	> 5,19	5,19
12	> 5,07	> 5,07	> 5,07	> 5,07
13	2,57	0,64	5,13	> 5,13
14	0,64	0,32	> 5,12	> 5,12
Ampicilina (Controle)	0,07 µg mL ⁻¹	0,5 µg mL ⁻¹	4,2 µg mL ⁻¹	2,1 µg mL ⁻¹

Fonte: autoria própria (2020)

De acordo com os resultados da Tabela 6, a maioria dos extratos em estudo apresentaram atividade inibitória em menores concentrações frente os microrganismos *S. aureus* e *B. cereus*. Apenas o extrato 1 e o extrato 12, ambos utilizando 100 mL de água na sua composição, não apresentaram atividade inibitória. Para os demais extratos, as concentrações variaram em 0,31 a 2,57 mg mL⁻¹

A ausência de atividade antimicrobiana dos extratos que continham apenas água deve-se ao fato de haver poucas substâncias constituintes na própolis solúveis em água. Entretanto, alguns estudos já demonstraram efeitos bactericidas e fungicidas de extratos aquosos de própolis, com propriedades curativas de feridas (SFORCIN, 2016; TAKESHI et al., 2003).

Para os microrganismos *S. aureus* e *B. cereus* o resultado mais expressivo foi para o extrato 3 (33,3 mL água + 33,3 mL etanol + 33,3 mL acetato de etila), com concentração igual a $0,32 \text{ mg mL}^{-1}$ e também o extrato 6 (50 mL água + 50 mL etanol), com concentração igual a $0,31 \text{ mg mL}^{-1}$. Estes extratos também apresentaram os maiores teores de compostos fenólicos (Tabela 6).

Para os microrganismos *E. coli* e *S. enterica*, a maioria dos extratos em estudo não apresentaram potencial de inibição na maior concentração testada. Para a bactéria *E. coli*, a concentração inibitória mínima (CIM) foi de $5,13 \text{ mg mL}^{-1}$ para o extrato 2 (100 mL de etanol), extrato 8 (16,6 mL água + 66,6 mL etanol + 16,6 mL de acetato de etila) e o extrato 13 (50 mL de etanol + 50 mL de acetato de etila). Para a bactéria *S. enterica*, os únicos extratos que apresentaram atividade inibitória foi o extrato 6 (50 mL água + 50 mL etanol) e o extrato 11 (16,6 mL água + 16,6 mL etanol + 66,6 mL de acetato de etila), com concentração de $5,01 \text{ mg mL}^{-1}$ e $5,19 \text{ mg mL}^{-1}$ respectivamente.

Esta diferença de atividade antimicrobiana entre as bactérias Gram-positivas (*S. aureus* e *B. cereus*) e Gram-negativas (*E. coli* e *S. enterica*) está relacionada não só a atividade biológica do extrato vegetal, mas também a diferença na estrutura da parede celular dessas bactérias. Bactérias Gram-positivas apresentam uma parede celular de peptidoglicano mais espessa e rígida, enquanto as bactérias Gram-negativas apresentam uma bicamada lipídica mais fina, porém constituída por lipopolissacarídeo, que devido à sua hidrofobicidade, dificulta a passagem de compostos hidrofílicos. Assim, as bactérias Gram-negativas são mais complexas devido à presença dessa membrana externa, resultando em diferentes suscetibilidades a uma variedade de antibióticos (BYLKA et al., 2004; CAMA; HENNEY; WINTERHALTER, 2019).

Esses resultados estão de acordo com a pesquisa realizada por Surek et al., (2020), onde nenhum dos extratos etanólicos de própolis avaliados foram eficazes contra as bactérias gram-negativas (*E. coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Pseudomonas aeruginosa*), diferente das análises realizadas com bactérias gram-positivas, que todas as amostras de própolis tiveram efeito antibacteriano.

Porém, estudos realizados por Mohamed et al. (2020a), mostraram a atividade antimicrobiana de extratos etanólicos de própolis de diversas origens geográficas (Arábia Saudita, Ôma, China, Brasil, Bulgária e Egito), frente às bactérias *E. coli*, *B. cereus*, *Salmonella*, *Listeria* e *Aspergillus*. Observaram que os extratos apresentaram efeitos inibitórios tanto para as cepas gram-positivas como também para as gram-negativas, além de

apresentarem também atividade antifúngica, comprovando que os extratos de própolis são potentes agentes antimicrobianos naturais, com potencial aplicabilidade em indústrias farmacêuticas e alimentícias.

Essa diferença entre os resultados deste trabalho com alguns encontrados na literatura está associada às variações na composição química da própolis das diferentes floras da região onde as amostras foram coletadas e também ao processo de extração utilizado (MOHAMED et al., 2020a; OROIAN, URSACHI, DRANCA, 2020; SUREK et al., 2020).

5.4 Otimização dos extratos de própolis verde

Por meio da análise de superfície de resposta utilizando o software Design expert, versão 13.0 e aplicando a equação de desejabilidade global (Equação 4), foi possível encontrar estatisticamente a melhor proporção dos solventes extratores (água, etanol e acetato de etila), a partir da maximização de compostos fenólicos.

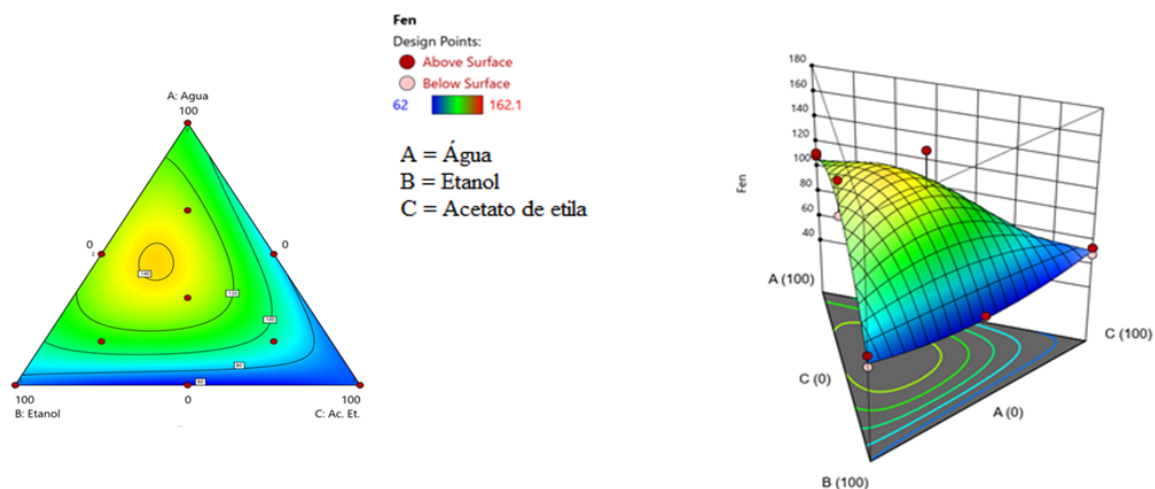
$$\text{Fenólicos} = +107,23 \times A + 73,03 \times B + 70,33 \times C + 152,11 \times A \times B + (-23,85 \times A \times C) + (-47,02 \times B \times C) + 1098,38 \times A \times B \times C \quad (4)$$

Onde: A = água; B = etanol; C = acetato de etila.

Como é possível visualizar na Figura 14, a região amarela e verde é a que apresenta o maior valor de compostos fenólicos totais, indicando a região de localização do ponto ótimo dos solventes do extrato pela atividade antioxidante.

Observa-se que a água e o etanol são solventes que proporcionam as melhores concentrações de compostos fenólicos totais, sendo os solventes mais utilizados na extração de própolis, uma vez que apresentam características químicas semelhantes aos compostos ativos da própolis, como já elucidado anteriormente.

Figura 14- Superfície de Resposta para a análise de compostos fenólicos totais.



Fonte: Fonte: autoria própria (2022)

O resultado obtido nos mostra que a melhor combinação constitui de uma mistura de solventes com 47,0 % de água com 35,0 % de etanol e 18,0 % de acetato de etila.

Através desse resultado pode-se encontrar estatisticamente valores teóricos estimados para o teor de compostos fenólicos no ponto ótimo e também uma previsão de como seria para a análise da concentração inibitória mínima contra diferentes microrganismos, com o intuito de comparar com valores experimentais obtidos, como mostra a Tabela 7.

Tabela 7- Extrato de própolis verde otimizado por análise de superfície de resposta e valores teóricos estimados de concentração inibitória mínima (CIM) e compostos fenólicos e valores experimentais obtidos.

CIM esperada (mg mL ⁻¹)	CIM experimental (mg mL ⁻¹)	Compostos Fenólicos Esperado (mg AG g ⁻¹ extrato)	Compostos Fenólicos Experimental (mg AG g ⁻¹ extrato)
0,37 ^A para <i>S. aureus</i>	0,38 ^A para <i>S. aureus</i>		
0,22 ^A para <i>B. cereus</i>	0,25 ^A para <i>B. cereus</i>	141,183 ^A	165,764 ^A
9,35 ^A para <i>E. coli</i>	9,50 ^A para <i>E. coli</i>		
12,99 ^A para <i>S. enterica</i>	26,0 ^B para <i>S. enterica</i>		

Para cada coluna, letras iguais em sobrescrito indicam que as médias não diferem estatisticamente com 95% de confiança pelo teste de Tukey, considerando n=3.

Fonte: autoria própria (2022).

Os valores teóricos de CIM e de compostos fenólicos foram próximos aos obtidos experimentalmente, apresentando assim resultados condizentes com o modelo estatístico aplicado.

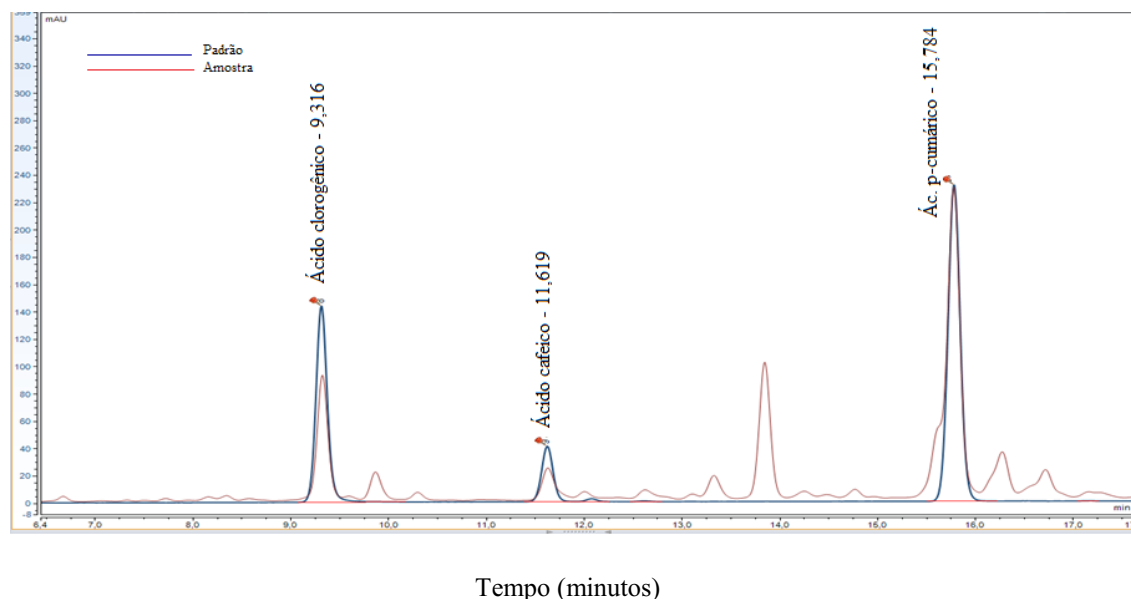
As proporções determinadas pela ASR estão condizentes com as concentrações testadas anteriormente, já que a água e o etanol são os solventes que estão na maior proporção nos extratos que apresentaram melhores resultados.

5.5 Quantificação de compostos do extrato de própolis otimizado por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

Foram quantificados no extrato seco de própolis otimizado o ácido clorogênico ($0,11 \text{ mg g}^{-1}$), ácido p-cumárico ($0,07 \text{ mg g}^{-1}$) e o ácido cafeico ($0,01 \text{ mg g}^{-1}$).

A Figura 15 apresenta o cromatograma obtido na quantificação dos compostos do extrato comparado com os padrões utilizados.

Figura 15– Cromatogramas obtidos na quantificação dos compostos do extrato de própolis avaliado por CLAE (padrão e amostra)



Tempo (minutos)

Fonte: Autoria própria (2022)

Oroian, Ursachi e Dranca (2020) avaliaram o extrato etanólico de própolis por CLAE e constataram a presença de $2,21 \text{ mg g}^{-1}$ de ácido clorogênico, $0,41 \text{ mg g}^{-1}$ de ácido cafeico e não detectaram ácido p-cumárico.

Gargouri et al. (2019) analisaram o extrato etanólico de própolis obtido de quatro regiões diferentes da Tunísia, usando 2 métodos diferentes. Por CLAE constataram a presença de ácido p-cumárico e ácido cafeico em todas as amostras analisadas. Enquanto o

ácido clorogênico foi detectado apenas na amostra de Béja. Segundo eles, a própolis de Béja continha a maior quantidade de fenólicos e flavonoides.

O ácido p-cumárico, cafeico e artepelin C, são substâncias químicas derivadas do ácido cinâmico, que consiste em um ácido graxo aromático de ocorrência natural, originado de plantas superiores. Esse composto pertence ao grupo das auxinas, hormônios vegetais responsáveis por regular o crescimento e a diferenciação celular, mostrando também eficaz como agente antimicrobiano e antifúngico (CHEUNG et al., 2011; EKMEKCIOCLGU et al., 1998).

Como já citado, a composição química específica da própolis é altamente dependente da vegetação ao redor e das condições climáticas, bem como do método de extração e o solvente utilizado, afetando assim a composição de um extrato (NETO et al., 2017).

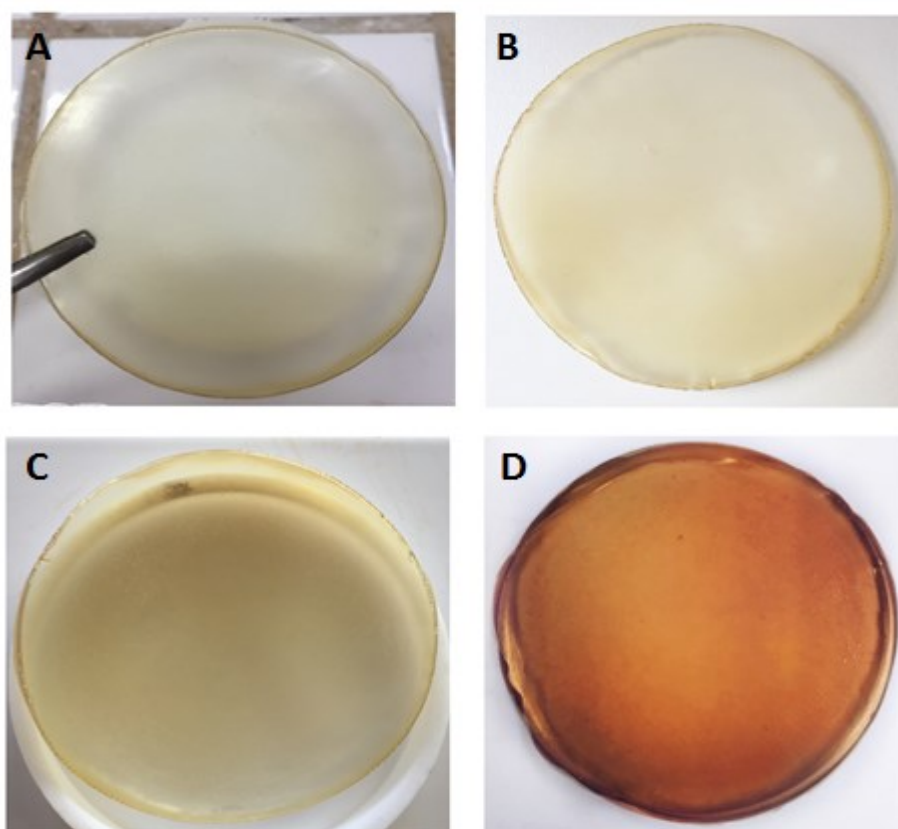
Os resultados do presente estudo indicam que o potencial antioxidante e antimicrobiano do extrato avaliado pode ter relação com a presença dos ácidos clorogênico, p-cumárico e cafeico, que foram quantificados por CLAE. Segundo estudos, tais compostos são metabólitos secundários, produzidos pelas plantas e estão envolvidos na resistência a insetos e na defesa contra patógenos fúngicos, com capacidade de eliminar radicais livres prejudiciais, atuando como antioxidantes e antimicrobianos naturais (LIU et al., 2020; MEI et al., 2020; SPAGNOL et al., 2019).

5.6 Desenvolvimento e caracterização do biofilme

O extrato otimizado foi incorporado à formulação de um biofilme de quitosana para avaliar suas características físico-químicas e sua liberação e eficiência em relação à atividade antimicrobiana e antioxidante.

Foram obtidos filmes homogêneos, facilmente destacáveis das placas de teflon. O biofilme com o extrato incorporado apresentou uma coloração amarronzada (Figura 16D) e, tanto o controle negativo (sem extrato) quanto o controle positivo (com ampicilina ou BHA) apresentaram tons amarelados claro e opaco (Figuras 16A, 16B, 16C).

Figura 16- Imagens dos filmes produzidos: A- controle negativo, B - controle positivo, com ampicilina, C- com antioxidante sintético (BHA), D - com extrato.



Fonte: autoria própria (2022)

Quando observadas as características macroscópicas dos filmes, foi verificado que nenhuma das formulações apresentou bolhas em sua estrutura, sendo bastante flexível e resistente à ruptura.

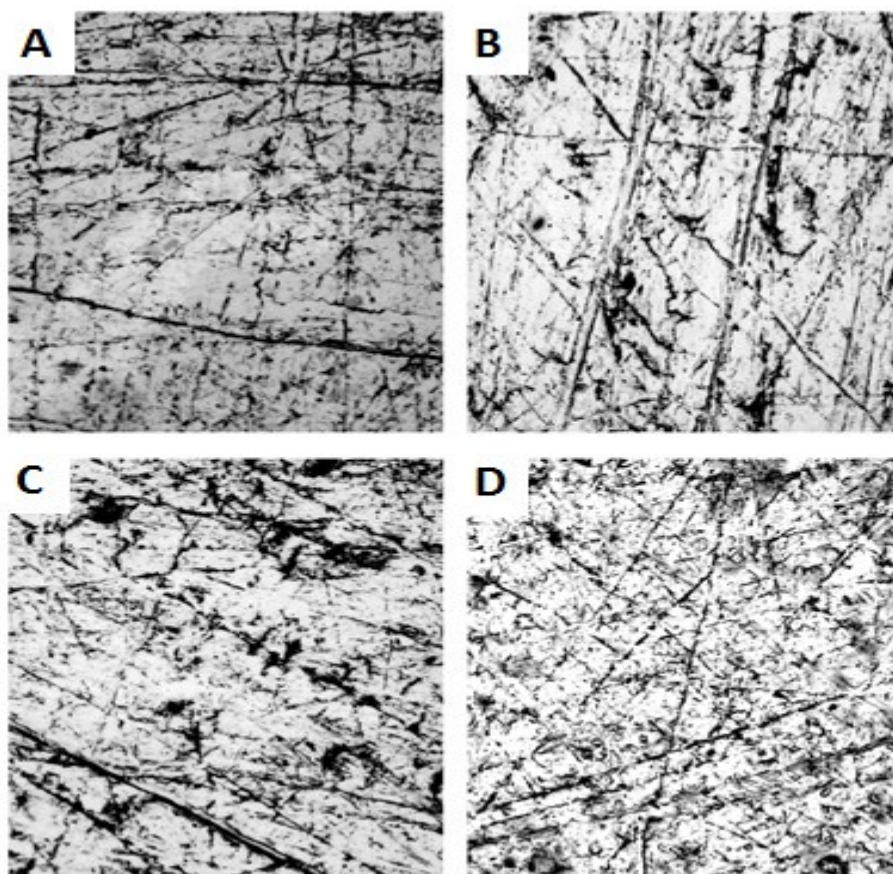
Também foi possível observar que mesmo com a adição do extrato de própolis, as membranas continuaram com aspecto liso, sem presença de poros, caracterizadas como densas, havendo apenas mudança de coloração.

Resultados semelhantes foram observados por Nguyen et al. (2022), que investigaram os efeitos da combinação de dois extratos naturais, *Piper betle* L. e *Sonneratia ovata* em filme de quitosana. Observou-se que a incorporação dos extratos afeta notavelmente a cor dos filmes resultantes, o que pode ser atribuído à existência de compostos fenólicos e substâncias coloridas nos extratos degradados durante o processo de preparação do filme.

5.6.1 Microscopia óptica

Após as análises macroscópicas, foram obtidas as imagens de microscopia óptica dos biofilmes (Figura 17). Percebeu-se uma superfície plana, homogênea, com ausência de poros. Também foi observado que mesmo os filmes não apresentando bolhas, os mesmos possuíam riscos em sua estrutura e, isso pode ser devido às marcas da superfície da placa de teflon onde foram produzidos.

Figura 17- Resultado da microscopia óptica dos biofilmes: A- controle negativo, B - controle positivo (com ampicilina), C com antioxidante sintético - (BHA), D -com extrato, utilizando a objetiva de 10X.

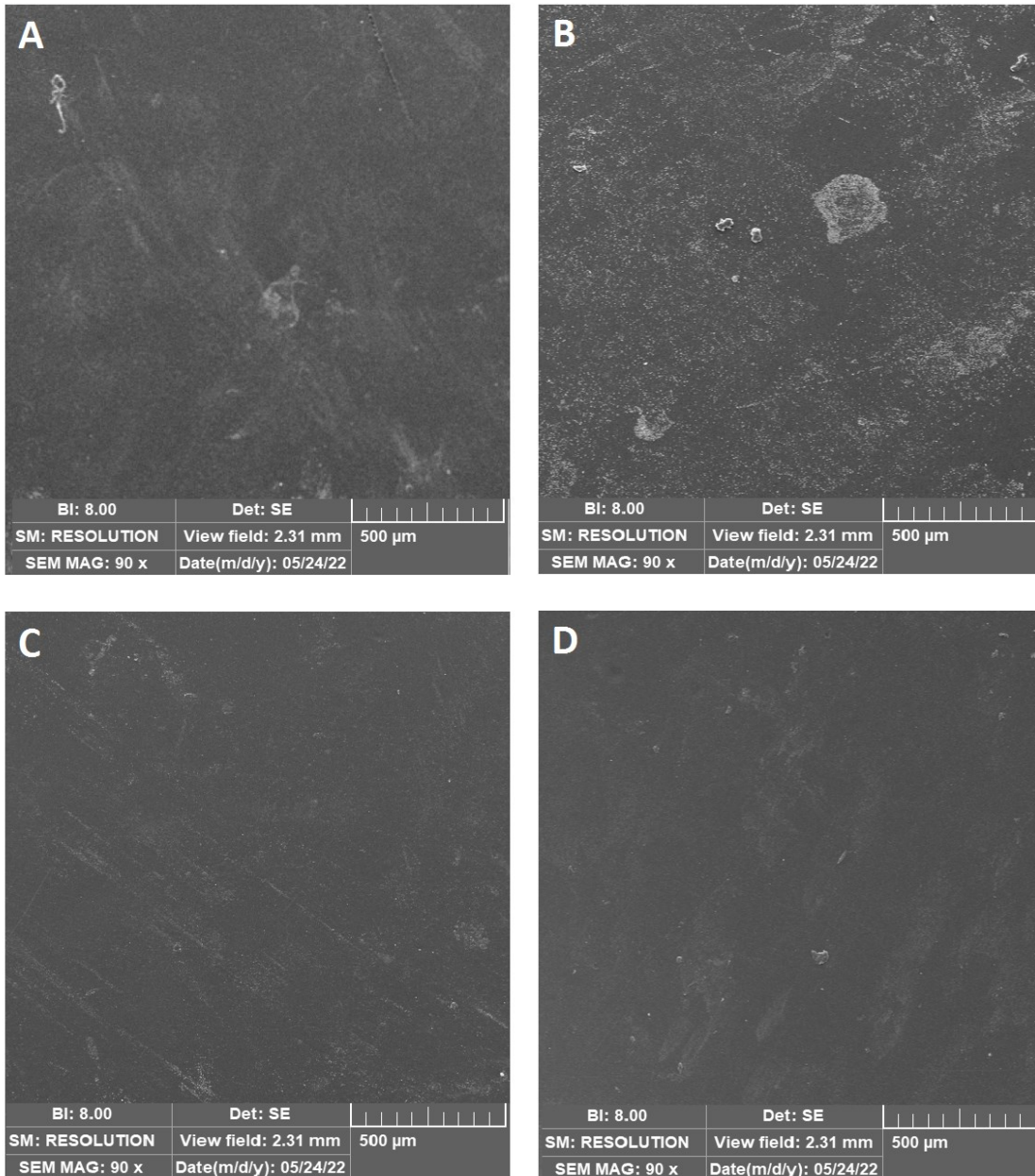


Fonte: autoria própria (2022)

5.6.2 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Na Figura 18 pode ser observada as micrografias eletrônicas de varredura da superfície dos biofilmes, com ampliações de 90x e distância de trabalho de aproximadamente 15 mm.

Figura 18 - Imagens do MEV da superfície dos biofilmes: A (controle negativo), B (controle positivo, com ampicilina), C (com antioxidante sintético - BHA), D (com extrato), com ampliação de 90X.



Fonte: autoria própria (2022)

Todas as formulações de filmes apresentaram uma microestrutura homogênea, sem bolhas, gotículas, poros ou trincas. Isso significa que ocorreu uma solubilização adequada da quitosana, confirmada pela estrutura biopolimérica coesa e lisa, conferindo ao biofilme propriedades capazes de garantir propriedades uniformes e com o mínimo de espaços vazios na rede polimérica, como também visto por Junior et al. (2022).

Na micrografia D, observa-se que a adição do extrato de própolis não afetou sua microestrutura, indicando uma boa compatibilidade entre a matriz do filme e o extrato. Uma observação semelhante foi relatada para filmes de amido de arroz/carboximetilquitosana preparados com extrato de própolis (SURIYATEM et al., 2018).

Bonilla et al. (2013), estudaram o efeito da incorporação de quatro antioxidantes (óleo essencial de manjeriço, óleo essencial de tomilho, ácido cítrico e alfa-tocoferol) nas propriedades físico-químicas da blenda de amido de trigo e quitosana plastificados com glicerol e concluíram que a incorporação de antioxidantes não afeta a microestrutura dos filmes.

Já nas Figuras 18B e 18C percebeu-se uma certa irregularidade, ocasionada por uma possível falta de uniformização ou não homogeneidade das soluções filmogênicas quando adicionadas aos ativos ampicilina e BHA.

5.6.3 Características físico-químicas

Com a finalidade de verificar a influência do extrato de própolis à formulação do biofilme de quitosana em relação a algumas características físico-químicas, foi realizado o ensaio de espessura, solubilidade e permeabilidade ao vapor de água. Neste estudo os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Tukey, de forma a avaliar as mudanças significativas ($p < 0,05$) nas propriedades dos filmes aditivados ou não com o extrato. Os resultados estão apresentados na Tabela 8.

Tabela 8- Resultados expressos em média e desvio padrão da espessura, solubilidade e permeabilidade de vapor de água (PVA) dos biofilmes com extrato de própolis (PRÓPOLIS), controle positivo com ampicilina (AMP), controle positivo com antioxidante sintético BHA (BHA) e controle negativo sem adição de extrato, antimicrobiano ou antioxidante (C-).

Biofilme	Espessura (mm)	Solubilidade (%)	PVA ($\text{gmmh}^{-1}\text{m}^2\text{kPa}^{-1}$)
PRÓPOLIS	$0,14 \pm 0,00^A$	$18,32 \pm 0,03^A$	$0,0290 \pm 0,00^A$
AMP	$0,11 \pm 0,00^B$	$19,49 \pm 0,07^B$	$0,0421 \pm 0,00^B$
BHA	$0,11 \pm 0,00^B$	$19,67 \pm 0,05^B$	$0,0374 \pm 0,00^C$
C-	$0,10 \pm 0,00^C$	$20,25 \pm 0,04^C$	$0,0520 \pm 0,00^D$

Para cada coluna, letras iguais em sobrescrito indicam que as médias não diferem estatisticamente com 95% de confiança pelo teste de Tukey.

Fonte: autoria própria (2022).

A espessura dos filmes formados é um parâmetro importante e que influencia suas propriedades (CUQ et al., 1996). Segundo Siripatrawan e Harte (2010), o valor da espessura pode causar efeitos em diferentes propriedades, como: a permeabilidade ao vapor de água, propriedades mecânicas e de transparência dos filmes, com isso, a aplicabilidade do filme pode variar de acordo com a espessura.

Observando-se a Tabela 8, é possível verificar que as espessuras dos filmes individuais variaram de 0,10 a 0,14 mm. Houve um aumento significativo ($p < 0,05$) do biofilme de com ampicilina (0,11 mm), BHA (0,11 mm) e extrato (0,14 mm), quando comparados ao controle negativo C- (0,10 mm). De acordo com Homez-Jara et al. (2018), essa variação de espessura do filme é influenciada pela presença de pequenas partículas sólidas da solução filmogênica.

Resultados semelhantes foram observados por Siripatrawan e Vitchayakitti (2016), analisando biofilmes de quitosana com diferentes proporções de extrato de própolis (5, 10 e 20 %) havendo um aumento progressivo em sua espessura: 66,7, 70,0 e 71,7 μm , respectivamente.

Além da espessura, foi avaliada a determinação da solubilidade pelo contato direto com água, que é uma propriedade importante dos filmes biodegradáveis, uma vez que para várias aplicações é necessário conhecer a resistência do material a este solvente, bem como a sua possível interferência nas propriedades mecânicas.

Após 24 horas, os filmes aparentemente não perderam sua integridade, devido a sua baixa solubilidade em água. Porém, houve uma diferença significativa da solubilidade entre os filmes em estudo.

O filme controle negativo (C-) apresentou solubilidade em água significativamente superior (20,25 %) em comparação com os filmes contendo própolis (PRÓPOLIS), ampicilina (AMP) e 2,3-terc-butil-4-hidroxianisol (BHA) (18,32, 19,49 e 19,67 %, respectivamente). Segundo Homez-Jara et al. (2018), a solubilidade da quitosana em água está relacionado à presença de grupos hidrofílicos ($-\text{NH}_2$ e $-\text{OH}$) em sua molécula, que facilitam a interação com moléculas de água.

De acordo com Miller, Yamashita e Laurindo (2008), a solubilidade é influenciada também pelo tipo e pela concentração do plastificante utilizado no biofilme. Esses autores constataram que o glicerol contribuiu para o aumento dos valores de solubilidade do filme de quitosana.

Além disso, a difusão de água na matriz polimérica pode causar intumescimento e aumentar a capacidade de biodegradação dos filmes (DE CARLI et al., 2022).

Com a adição do extrato de própolis ao filme, a solubilidade em água diminuiu significativamente ($p < 0,05$), o que pode estar relacionado a fortes interações intermoleculares entre a quitosana e compostos bioativos do extrato (KAYA et al., 2018).

Resultados com tendência semelhantes foram obtidos por De Carli et al. (2022) em análise de filmes à base de quitosana enriquecidos com extrato de própolis, no qual observaram que o biofilme sem o extrato foi o que apresentou uma maior solubilidade em água (45,7 %), diminuindo significativamente ($p < 0,05$), comparado aos biofilmes com 5, 10 e 20 % de extrato (aproximadamente 23, 16 e 11 % respectivamente).

Considerando que estes filmes poderiam ser utilizados em embalagens para alimentos, a permeabilidade ao vapor de água (PVA) é um parâmetro importante para determinar sua capacidade de minimizar a transferência de umidade entre o alimento e o meio ambiente (MUJTABA et al., 2019).

A PVA é afetada por fatores importantes, como a estrutura e as propriedades químicas do polímero, a interação hidrofóbica na membrana e a concentração e o tipo de aditivos. A baixa taxa de transmissão de vapor de água pode diminuir a taxa de troca de vapor de água dentro e fora da embalagem de alimentos, mantendo assim os alimentos livres de vapor de água. Desta forma, para manter o frescor dos alimentos, a PVA deve ser mantida o mais baixo possível (TIAN et al., 2021).

Na Tabela 8 é possível observar que houve uma diferença significativa ($p < 0,05$) de permeabilidade ao vapor de água entre os biofilmes analisados. O biofilme com o extrato incorporado apresentou menor resultado ($0,0290 \text{ gmmh}^{-1}\text{m}^{-2}\text{kPa}^{-1}$) frente ao biofilme BHA ($0,0374 \text{ gmmh}^{-1}\text{m}^{-2}\text{kPa}^{-1}$), AMP ($0,0421 \text{ gmmh}^{-1}\text{m}^{-2}\text{kPa}^{-1}$) e o controle ($0,0520 \text{ gmmh}^{-1}\text{m}^{-2}\text{kPa}^{-1}$). Segundo Dick et al. (2015) a permeabilidade ao vapor de água sofre interferência da espessura do filme, pois está relacionada com a capacidade da água penetrar na matriz do filme. O que exemplifica no presente estudo, onde o biofilme com o extrato apresentou maior espessura (0,14 mm) e conseqüentemente menor PVA ($0,0290 \text{ gmmh}^{-1}\text{m}^{-2}\text{kPa}^{-1}$).

Tais resultados compactuam com o trabalho de Siripatrawan e Vitchayakitti (2016), que também produziram biofilmes de quitosana contendo extrato de própolis, e obtiveram um valor de PVA significamente maior no biofilme controle (aproximadamente $0,7 \text{ gmm}^{-2}\text{dPa}$) comparado ao biofilme com 2,5% com extrato (aproximadamente $0,5 \text{ gmm}^{-2}\text{dPa}$).

Podemos atribuir esse comportamento à presença de compostos fenólicos presentes na própolis, por serem capazes de se encaixar na matriz de quitosana e estabelecer interações como hidrogênio ou ligação covalente com grupos reativos de quitosana (WU et al., 2013). De acordo com Siripatrawan e Harte, (2010), as interações de hidrogênio e ligações covalentes entre a rede de quitosana e os compostos polifenólicos limitam a disponibilidade de grupos de hidrogênio para formar ligações hidrofílicas com a água, levando a uma diminuição na afinidade dos biofilmes de quitosana pela água e conseqüentemente menor PVA dos biofilmes.

Outro ponto a se considerar é que como a própolis é uma produto apícola resinoso quimicamente complexo e composto por ácidos fenólicos, ceras e vários compostos orgânicos, era esperada uma diminuição na permeabilidade ao vapor de água. Pois o extrato de própolis contém alguns compostos hidrofóbicos e esse aumento da hidrofobicidade da matriz do filme reduz a absorção de água, proporcionando uma barreira à água nos filmes (DE CARLI et al., 2022). O que pode ser comprovado também com a baixa solubilidade em água do biofilme com o extrato, no presente estudo.

5.7 Atividade antioxidante dos biofilmes

Um dos métodos mais utilizados para verificar a atividade antioxidante consiste em avaliar a atividade sequestradora do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH), de coloração púrpura, que absorve em um comprimento de onda de 516 nm. Por ação de um antioxidante, o DPPH é reduzido formando 2,2-difenilpicril-hidrazina (DPPH-H), de coloração amarela com conseqüente desaparecimento da banda de absorção e decréscimo da absorbância (OLIVEIRA et al., 2009).

A partir do percentual de captação do radical DPPH, foi calculada a atividade antioxidante (AA) do biofilme com o extrato otimizado e do biofilme de referência, no caso o BHA (2,3-terc-butil-4-hidroxianisol), na concentração de 0,01 %. O BHA é um composto frequentemente utilizado na indústria devido ao seu alto poder antioxidante, portanto, o mesmo foi utilizado como padrão de comparação frente ao extrato de própolis avaliado (SARKAR et al., 2015).

O mecanismo de ação dos antioxidantes sintéticos, como o BHA, se deve a sua estrutura fenólica que permite a doação de um próton a um radical livre da molécula,

provocando a interrupção do processo de oxidação por radicais livres. Dessa maneira, os derivados fenólicos transformam-se em radicais livres, que por sua vez, podem se estabilizar sem promover ou propagar reações de oxidação (KUMAR, 2011).

No presente estudo, o biofilme com o extrato otimizado apresentou maior atividade antioxidante, com 92,06 %, comparado com o biofilme com BHA que teve AA de 87,17 % e o biofilme controle, com 0,79 % de AA.

O mecanismo de eliminação de polifenóis no filme de quitosana contendo própolis está relacionado às suas propriedades redutoras, pois agentes doadores de hidrogênio ou elétrons reagem com os radicais livres DPPH, estabilizando o sistema (DE BEER et al., 2002).

O potencial antioxidante dos filmes de quitosana contendo o extrato de própolis também pode ser atribuído à presença dos ácidos clorogênico, p-cumárico e cafeico, que foram quantificados por CLAE.

Resultados semelhantes foram obtidos por Siripatrawan e Vitchayakitti (2016), em análise de biofilmes de quitosana com diferentes concentrações de extrato de própolis. No qual observaram resultados de aproximadamente 5 % AA do biofilme controle e aproximadamente 28, 33, 54 e 56 % dos biofilmes com 2,5, 5, 10 e 20 % de extrato incorporado, respectivamente.

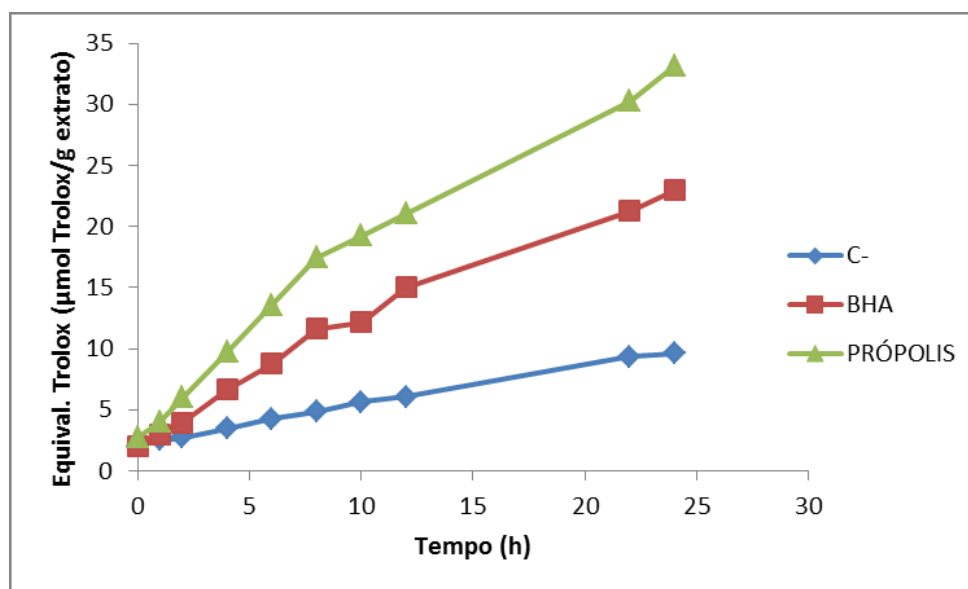
Esse comportamento foi observado também em análise de biofilmes de pectina incorporados com extrato de própolis verde. Júnior et al. (2022) observaram um aumento significativo na atividade antioxidante dos biofilmes, passando de 12,6 % do biofilme controle para 54,8 % do biofilme com a adição de 3 % de extrato.

5.8 Estudo de liberação dos agentes ativos da própolis

A proposta de estudar a cinética de liberação do extrato tem como finalidade avaliar se no decorrer do tempo há uma passagem dos agentes ativos da própolis do biofilme para o meio, visando simular um produto alimentício.

A liberação dos agentes ativos do extrato de própolis foi avaliada por espectrofotômetro UV-Vis, através do método de inibição do radical DPPH. Os experimentos foram conduzidos nos tempos de 0, 1, 2, 4, 6, 8, 14, 16, 18 e 24 horas em triplicata. A Figura 19 exhibe o perfil de liberação de compostos antioxidantes a partir dos biofilmes elaborados.

Figura 19- Perfil de liberação de compostos antioxidantes dos biofilmes, através do método de inibição do radical DPPH, no intervalo de 24 horas dos biofilmes com extrato de própolis (PRÓPOLIS), controle positivo com antioxidante sintético BHA (BHA) e controle negativo sem adição de extrato, antimicrobiano ou antioxidante (C-).



Fonte: autoria própria (2022)

Os resultados experimentais mostraram que com o passar do tempo, houve um aumento progressivo da liberação de compostos antioxidantes incorporados ao filme.

O biofilme sem adição de extrato, que corresponde ao controle negativo, forneceu uma taxa de liberação mais lenta, no valor de $0,4 \mu\text{mol Trolox L}^{-1}$ por hora.

Sabe-se que a quitosana apresenta atividade antioxidante devido à formação de moléculas estáveis como consequência da reação de radicais livres com seus grupos amino (SIRIPATRAWAN; VITCHAYAKITTI, 2016).

O BHA é um composto frequentemente utilizado na indústria devido ao seu alto poder antioxidante (SARKAR et al., 2015), portanto, o mesmo foi utilizado como padrão de comparação frente ao extrato de própolis avaliado. O biofilme com BHA apresentou após 24 h uma atividade antioxidante de $19,21 \mu\text{mol Trolox L}^{-1}$, resultando quase o dobro da atividade do biofilme controle ($10,20 \mu\text{mol Trolox L}^{-1}$), mas ainda abaixo do biofilme com o extrato de própolis incorporado ($28,31 \mu\text{mol Trolox L}^{-1}$).

Foi possível observar que o perfil de liberação de compostos antioxidantes de todos os biofilmes avaliados foi influenciado pelo tipo de composto incorporado, conforme observado na Figura 19.

O biofilme com o extrato de própolis foi o que apresentou maior atividade antioxidante ao longo das horas, com uma taxa de liberação de $1,2 \mu\text{mol Trolox L}^{-1}$ por hora. Isso pode ser explicado devido às estruturas moleculares e à natureza química dos compostos fenólicos no extrato. A possível afinidade entre a água, que atua com um simulador alimentício, e os compostos ativos deve ser levada em consideração (NGUYEN et al., 2022). Foi relatado que compostos fenólicos hidrofílicos, como ácidos fenólicos e álcoois fenólicos, tiveram maior interação com simulantes aquosos do que compostos ativos hidrofóbicos (FARIAS et al., 2021).

Segundo Buonocore et al. (2003) a liberação de um composto ativo de uma rede polimérica ocorre em várias etapas. As primeiras moléculas de solvente (por exemplo, água) se difundem da solução externa para a matriz polimérica levando ao enfraquecimento da rede. Essas mudanças na estrutura do filme permitem a difusão do composto ativo através da matriz polimérica para a solução externa até que o equilíbrio termodinâmico seja atingido. Assim, a liberação de compostos ativos é dependente de diferentes fatores, como migração do líquido para a matriz de quitosana, solubilidade do polímero e difusão do composto ativo através da matriz polimérica para o líquido de simulação do alimento. Este último fenômeno não é apenas devido à transferência de massa, mas é o resultado de diferentes fatores, como as interações específicas entre o composto e a matriz.

Sendo assim, podemos observar uma relação entre a espessura do biofilme e sua atividade antioxidante. Para filme mais fino, como o biofilme controle (0,11 mm), a rápida hidratação na água leva a uma liberação mais rápida do antioxidante ao meio, provavelmente associada à sua solubilização em água e conseqüentemente um comportamento mais linear. Já para filmes mais espessos, como o biofilme com extrato de própolis (0,14 mm), há um intumescimento significativamente maior, permitindo a difusão de compostos bioativos do extrato de própolis através da matriz de quitosana com o passar do tempo, apresentando valores crescentes mais expressivos (SANCHEZ-GONZALEZ et al., 2011).

Sabendo que o BHA é um antioxidante sintético com potencial citotóxico (VANDGHANOONI et al., 2013), a proposta de associar antioxidantes naturais em materiais de embalagem de alimentos é uma estratégia tecnológica que pode ser utilizada na conservação de alimentos, além de ser uma alternativa mais sustentável ao meio ambiente.

5.9 Atividade antimicrobiana dos biofilmes

A fim de avaliar a capacidade antimicrobiana dos biofilmes produzidos, foi realizado macrodiluições nas mesmas condições da microdiluição, usando biofilmes de 0,25 cm² e 1 cm², com o intuito de investigar a influência do tamanho do filme.

O controle do crescimento microbiano continha apenas o meio de cultura e o microrganismo submetido às mesmas condições do teste e foi utilizado para fins de comparação.

Os resultados do teste qualitativo e quantitativo estão apresentados na Tabela 9.

Tabela 9- Resultados qualitativos da atividade antimicrobiana dos biofilmes e contagem de microrganismos viáveis, expressos em UFC mL⁻¹

Microrganismo	Área do filme (cm²)	Controle do crescimento microbiano	Controle negativo (biofilme sem extrato e sem antibiótico)	Biofilme com extrato	Controle positivo (biofilme com ampicilina)
<i>B. cereus</i>	0,25	1,6 x 10 ⁶	(-) / 2,7 x 10 ⁶	(-) / 2,3 x 10 ⁵	(-) / 1,2 x 10 ⁵
<i>S. aureus</i>	0,25	3,8 x 10 ⁷	(-) / 4,6 x 10 ⁷	(-) / 1,0 x 10 ⁷	(-) / 2,1 x 10 ⁶
<i>E. coli</i>	0,25	2,2 x 10 ⁷	(-) / 2,7 x 10 ⁷	(-) / 2,1 x 10 ⁷	(-) / 1,1 x 10 ⁷
<i>S. enterica</i>	0,25	1,3 x 10 ⁸	(-) / 1,6 x 10 ⁸	(-) / 2,2 x 10 ⁸	(-) / 1,0 x 10 ⁸
<i>B. cereus</i>	1,0	3,2 x 10 ⁷	(-) / 3,8 x 10 ⁷	(+) / 1,6 x 10 ⁶	(+) / 9,4 x 10 ⁵
<i>S. aureus</i>	1,0	4,3 x 10 ⁷	(-) / 3,1 x 10 ⁷	(+) / 3,2 x 10 ⁶	(+) / 7,8 x 10 ⁵
<i>E. coli</i>	1,0	5,2 x 10 ⁸	(-) / 4,8 x 10 ⁸	(-) / 2,1 x 10 ⁸	(-) / 6,5 x 10 ⁷
<i>S. enterica</i>	1,0	6,0 x 10 ⁸	(-) / 6,4 x 10 ⁸	(-) / 2,8 x 10 ⁸	(-) / 5,3 x 10 ⁷

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

Fonte: autoria própria (2022)

De acordo com a Tabela 9, o biofilme controle, que continha apenas quitosana, não impediu o crescimento de microrganismos nos dois tamanhos testados (0,25 e 1,0 cm²), indicando ausência de atividade antimicrobiana. Resultados semelhantes foram observados por Siripatrawan e Vitchayakitti (2016), que avaliaram o filme controle de quitosana na

concentração de 2%, e através do método de difusão em ágar, não observaram zona de inibição frente aos microrganismos *B. cereus*, *S. aureus* e *E. coli*.

Segundo Hosseinnejad e Jafari (2016), a atividade antimicrobiana da quitosana é influenciada por muitos fatores, como tamanho molecular, fonte, componentes adjuvantes, pH, concentração, tipo de microrganismo, que devem ser considerados antes de serem aplicados.

Os biofilmes com área de 0,25 cm² não apresentaram atividade antimicrobiana para nenhuma das bactérias testadas, nem mesmo o biofilme com ampicilina. Pode-se atribuir esse comportamento à baixa concentração de ativos no meio, insuficientes para inibição dessas bactérias.

Já no biofilme incorporado com o extrato, quando testado com 1,0 cm², houve a liberação do extrato no meio de cultura, inibindo o crescimento de *B. cereus* e *S. aureus*, havendo assim menor proliferação desses microrganismos. Isso ocorre porque quanto maior a superfície de contato, maior o poder de liberação do extrato no meio, aumentando assim a capacidade inibitória. O efeito inibitório do extrato de própolis em biofilme de quitosana pode ser atribuído principalmente aos compostos fenólicos encontrados na própolis, tais como: ácido clorogênico, ácido cafeico e ácido p-cumárico. Tal resultado é semelhante ao teste de CIM, onde houve atividade inibitória em menores concentrações, frente a esses microrganismos.

O biofilme de 1 cm² com ampicilina apresentou resultado semelhante, frente aos microrganismos *S. aureus* e *B. cereus*, sendo também eficaz na prevenção da propagação de bactérias Gram-positivas.

Segundo Nazzaro et al. (2013) a ação antimicrobiana de extratos vegetais naturais depende de sua composição química, e suas ações antimicrobianas envolvem mecanismos bioquímicos em vários locais da célula bacteriana. Sendo assim, a atividade antibacteriana de filmes de quitosana contendo polifenóis de própolis pode ser explicada por diferentes ações, incluindo alteração da permeabilidade da membrana, inibição da síntese de DNA e RNA, modificação química da membrana celular, citoplasma, enzimas e proteínas, e deformação da célula microbiana, conseqüentemente levando à morte celular.

Para as bactérias *E. coli* e *S. enterica*, tanto os biofilmes com o extrato e com ampicilina, de 0,25 e 1,0 cm², a concentração de compostos ativos foi baixa, permitindo o crescimento no meio de cultura. As possíveis razões para a diminuição da atividade do

extrato de própolis incorporado nos filmes de quitosana quando comparado com o extrato de própolis puro pode ser devido a potencial perda de compostos fenólicos que interagem fortemente com grupos funcionais da quitosana na matriz do filme, incapacitando-os de difundir pelo meio de cultura, impossibilitando a ação antimicrobiana, ou então, pode ser que o extrato incorporado esteja em uma concentração muito baixa, devido ao tamanho do biofilme adicionado ao meio (TORLAK e SERT, 2013).

Além disso, como já mencionado anteriormente, o extrato de própolis é mais eficaz contra bactérias Gram-positivas (*S. aureus* e *B. cereus*) do que bactérias Gram-negativas (*E. coli* e *S. enterica*), devido a diferenças estruturais da parede celular. As bactérias Gram-negativas, além da membrana celular, possuem uma camada externa adicional, que consiste de fosfolipídeos, proteínas e polissacarídeos, que acaba impedindo a penetração de muitas moléculas (SIRIPATRAWAN e VITCHAYAKITTI, 2016).

6 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos na análise de compostos fenólicos e CIM comprovam a presença de compostos bioativos na amostra de própolis. O maior teor de compostos fenólicos e o potencial antimicrobiano avaliado foram obtidos por meio do processo de extração pela combinação de solventes. O ponto ótimo de extração se deu com a mistura de 47,0 % de água, 35,0 % de etanol e 18,0 % de acetato de etila, atingido por meio da análise de superfície de resposta e função de desejabilidade, com a maximização de extração de compostos fenólicos. No extrato otimizado foi evidenciado a presença de ácido clorogênico, ácido p-cumárico e o ácido cafeico, apresentando atividades antioxidantes significativas.

Um filme ativo de quitosana incorporado com extrato de própolis otimizado pôde ser obtido com propriedades funcionais aprimoradas. Com a incorporação do extrato de própolis verde a estrutura do filme foi mantida, influenciando positivamente na solubilidade, transmissão de vapor, bem como no aumento da capacidade antioxidante, com a liberação de bioativos ao longo do tempo e inibição do crescimento microbiano.

Sendo assim, o filme desenvolvido mostrou ser uma proposta promissora para ser utilizado como material de embalagem, com propriedades antioxidantes e antimicrobianas, com ampla aplicação na indústria alimentícia.

REFERÊNCIAS

- AHSAN, S.M.; THOMAS, M.; REDDY, K.K.; SOORAPARAJU, S.G.; ASTHANA, A.; BHATNAGAR, I. Chitosan as biomaterial in drug delivery and tissue engineering. **International journal of biological macromolecules**, Amsterdam, v. 110, p. 97-109, 2018.
- AKOH, C.; MIN, D.B. Antioxidants. **Food Lipids: Chemistry, nutrition and biotechnology**, New York, Chap.5, p.433-444, 1998.
- AL-HARIRI, M.T. Propolis and its direct and indirect hypoglycemic effect. **Journal of Family & Community Medicine**, Mumbai, v.18, n.3, p. 152-154, 2011.
- ANGELO, P. M.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos- Uma breve revisão. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 66, n.1, p. 232-240, 2007.
- 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.
- ARRUDA, C.; RIBEIRO, V.P.; ALMEIDA, M. O.; MEJÍA, J.A.A.; CASOTI, R.; BASTOS, J. K. Effect of light, oxygen and temperature on the stability of artepillin C and *p*-coumaric acid from Brazilian green propolis. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Oxford, v.178, 2020.
- ASTM. American Society for Testing Materials. Standard test method for water vapor transmission of materials. Annual book of ASTM standards. Designation E96/96M. Philadelphia: American Society for testing Materials, 2010.
- ATMAN. Vita Real. Brasil. 2020. Disponível em :
<<https://www.vitalatman.com.br/produto/vital-real/>> Acesso em: 15 de Maio de 2020.
- AZIZ, M. A.; SALAMA, H.; SABAA, M. W. Biobased alginate/castor oil edible films for active food packaging. **LWT Food Science and Technology**, London, v. 96, p. 455-460, 2018.
- AZMIR, J.; ZAIDUL, I.S.M.; RAHMAN, M.M.; SHARIF, K.M.; MOHAMED, A.; SAHENA, F.; JAHURUL, M.H.A.; GHAFOOR, K.; NORULAINI, N.A.N.; OMAR, A.K.M. Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. **Journal of Food Engineering**, London, v. 117, n. 4, p. 426-436, 2013.
- BALASUNDRAM, N.; SUNDRAM, K.; SAMMAN, S. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. **Food Chemistry**, Barking, v.99, p.191-203, 2006.
- BANKOVA, V., POPOVA, M., TRUSHEVA, B. New emerging fields of application of propolis. **Macedonian Journal of Chemistry and Chemical Engineering**, South El Monte, n. 35, p. 1-11, 2016.

- BANKOVA, V.S.; BOUDOROVA-KRASTEVA, G.; SFORCIN J.M.; FRETE, X. KUJUMGIEV, A.; MAIMONI-RODELLA, R.; POPOV, S.S. Phytochemical evidence for the plant origin of Brazilian propolis from São Paulo state. **Zeitschrift fur Naturforsch C**, Berlin, v. 54, p. 401-405, 1999.
- 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**, São Paulo, v. 29, p.113-123, 2006.
- BASTOS, E. M. A. F.; GALBIATI, C.; LOUREIRO, E. M.; SCOARIS, D. O. Indicadores físico-químicos e atividade antibacteriana de própolis marrom frente à *Escherichia coli*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 63, n. 5, p. 1255-1259, 2011.
- BENHAMOU, N.; LAFONTAINE, P. J.; NICOLE, M. Induction of systemic resistance to *Fusarium crown and root rot* in tomato plants by seed treatment with chitosan. **Phytopathology**, London, v. 84, n. 12, p. 1432-1444, 1994.
- BOGUSLAWSKI, S.; BUNZEIT, M.; KNORR, D. Effects of chitosan treatment on clarity and microbial counts of apple juice. **Zeitschrift für Lebensmittel-Technologie und-Verfahrenstechnik**, Berlin, v. 41, p. 42-44, 1990.
- BONHEVI, J.S.; COLE, F.V.; JORDÁ, R.E. The composition, active components and bacteriostatic activity of propolis in dietetics. **Journal of the American Oil Chemists**, Champaign, v.71, n.5, p.529-532, 1994.
- BONILLA, J.; TALÓN, E.; ATARÉS, L.; VARGAS, M.; CHIRALT, A. Effect of the incorporation of antioxidants on physicochemical and antioxidant properties of wheat starch – chitosan films. **Journal of Food Engineering**, London, v. 118, n. 3, p. 271–278, 2013.
- BOROSKI, M.; VISENTAINER, J. V.; COTTICA, S. M.; DE MORAIS, D. R. Antioxidantes – Princípios e métodos analíticos., **Appris**, Curitiba, p. 49 – 101, 2015.
- BRANDW-ILLIAMS, W.;CUVELIER, M.; BERSSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Lebensmittel-Wissens-chaft-und-Technologie**, London, v.28, p.25-30, 1995.
- BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Instrução Normativa nº 3, de 19 de janeiro de 2001. Aprova os Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade de Apitoxina, Cera de Abelha, Geléia Real, Geléia Real Liofilizada, Pólen Apícola, Própolis e Extrato de Própolis. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**. Brasília, DF. Seção 1, p. 18-23, 2001a.
- BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Instrução Normativa SDA nº 03, de 19 jan. 2001b. Anexo VI - Regulamento técnico para fixação de identidade e qualidade de própolis. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 23 jan. 2001b. Disponível em: <https://www.cnabrazil.org.br/artesanaisetradicionais/assets/files/documento%201%20%20instrucao%20normativa%20sda%20n%20 03%20de%2019012001.pdf>. Acesso em: 2 nov. 2022
- BUONOCORE, G.G.; NOBILME, M.A.; PANIZZA, A.; CORBO, M.R., NICOLAIS, L.

A general approach to describe the antimicrobial agent release from highly swellable films intended for food packaging applications. **Journal of Controlled Release**, Amsterdam, v. 90, n.1, p. 97-107, 2003.

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

BYLKA, W.; MATLAWSKA, I.; PILEWSKI, N. A. Natural flavonoids as antimicrobial agents. **The Journal of the American Nutraceutical Association**, New York, v. 7, n. 2, p. 24 - 31, 2004.

CAMA, J.; HENNEY, A. M.; WINTERHALTER, M. Breaching the barrier: quantifying antibiotic permeability across Gram-negative bacterial membranes. **Journal of Molecular Biology**, New York, v. 431, n. 18, p. 3531–3546, 2019.

ÇAYAN, F., et al. Identification and quantification of phenolic acid compounds of twenty six mushrooms by HPLC-DAD. **Journal of Food Measurement and Characterization**, Chan, n.14, p.1690-1698, 2020.

CHALONGSUK, R.; SRIBUNDIT, N. Usage of chitosan in Thai pharmaceutical and cosmetic industries. **Science, Engineering and Health Studies**, Amphoe Muang, p. 49-54, 2013.

CHEUNG et al. Brazilian green propolis and its constituent, Artepillin C inhibits allogeneic activated human CD4 T cells expansion and activation. **Journal of ethnopharmacology**, Pretoria, v. 138, n. 2, p. 463-471, 2011.

CORREA, F.T.; SOUZA, A.C.; SOUZA, E.A.; ISIDORO, S.R.; PICOLI, R.H.; DIAS, D.R.; ABREU, L. R. Effect of Brazilian green propolis on microorganism contaminants of surface of Gorgonzola-type cheese. **Journal of Food Science and Technology**, Oxford, v.56, p.1978-1987, 2019.

COSTA et al. Artepillin C, drupanin, aromadendrin-4'-O-methyl-ether and kaempferide from Brazilian green propolis promote gastroprotective action by diversified mode of action. **Journal of ethnopharmacology**, Limerick, v. 226, p. 82-89, 2018.

CUNHA, I.B.S.; AWAYA, A.C.H.; CAETANO F. M.; SHIMIZU, M.T.; MARUCCI, M.C.; DREZZA, T. F.; POVIA, G.S.; CARVALHO, P.O. Factors that influence the yield and composition of Brazilian propolis extracts. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v.15, n.6, p-964-967, 2004.

CUQ, B.; GONTARD, N.; CUQ, J.L.; GUILBERT, S. Functional properties of myofibrillar protein-based biopackaging as effected by film thickness. **Journal of Food Science**, Oxford, vol. 61, n. 3, p. 580-584, 1996.

DABEEK, W, M.; MARRA, M, V. Dietary quercetin and kaempferol: Bioavailability and potential cardiovascular-related bioactivity in humans. **Nutrients**, v. 11, n. 10, p. 2288, 2019.

DAS et al. Synthesis of hybrid hydrogel nano-polymer composite using Graphene oxide, Chitosan and PVA and its application in waste water treatment. **Environmental Technology & Innovation**, Amsterdam, v. 18, p. 100664, 2020.

DE BEER, D.; JOUBERT, E.; GELDERBLUM, W. C. A.; MANLEY, M. Phenolic compounds: A review of their possible role as in vivo antioxidants of wine. **South African Journal of Enology and Viticulture**, California, v. 23, n. 2, p. 48-61, 2002.

DE CARLI al. Production of chitosan-based biodegradable active films using bio-waste enriched with polyphenol propolis extract envisaging food packaging applications. **International Journal of Biological Macromolecules**, Amsterdam, v. 213, p. 486-497, 2022.

DEGÁSPARI, C. H.; WASZCZYNSKYJ, N. Propriedades antioxidantes de compostos fenólicos. **Visão Acadêmica**. Curitiba, v. 5, n. 1, p. 33-40, 2004.

DICK, M.; COSTA, T. M. H.; GOMAA, A.; SUBIRADE, M.; RIOS, A. DE O.; FLÔRES, S. H. Edible film production from chia seed mucilage: Effect of glycerol concentration on its physicochemical and mechanical properties. **Carbohydrate Polymers**, London, n. 130, p. 198–205, 2015.

DUGGAN, S. et al. Thiolated polymers as mucoadhesive drug delivery systems. **European ANSJournal of Pharmaceutical Sciences**, Waterford, v. 100, p. 64-78, 2017.

DUTTA, P. K. et al. Perspectives for chitosan based antimicrobial films in food applications. **Food chemistry**, Barking, v. 114, n. 4, p. 1173-1182, 2009.

DUTTA, J.; TRIPATHI, S.; DUTTA, P.K. Progress in antimicrobial activities of chitin, chitosan and its oligosaccharides: a systematic study needs for food applications. **Food Science and Technology International**, Oxford, vol. 18, n. 1, p. 3–34, 2011.

EKMEKCIOGLU, C.; FEYERTAG, J.; MARKTL, W. Cinnamic acid inhibits proliferation and modulates brush border membrane enzyme activities in Cco-2 cells. **Cancer Lett.** V.128, p.137-144, 1998.

ELDEEN, A. A.;BASYONY, M.A.;ELFIKY, N.K.;GHALWASH, M.M. Effect of the Egyptian propolis on the hepatic antioxidant defense and pro-apoptotic p53 and antiapoptotic bcl2 expressions in aflatoxin B1 treated male mice. **Biomed Pharmacother**, Paris, p.247–255, 2017.

EL-DIASTY, E. M. et al. Using of chitosan as antifungal agent in Kariesh cheese. **New York Science Journal**, New York, v. 5, n. 9, p. 5-10, 2012.

ESCRICHE, I.; BORRAS, J. M. Standardizing the analysis of phenolic profile in propolis. **Food Research International**, Ottawa, p.834–841, 2018.

EVANS, L. Crise econômica faz crescer o uso de própolis verde. Brasil. 2016. Disponível em:
<https://www.em.com.br/app/noticia/agropecuario/2016/03/14/interna_agropecuario,743149/crise-economica-faz-crescer-o-uso-da-propolis-verde.shtml> Acesso em: 10 de Maio de 2020.

FAI, A.E.C.; STAMFORD, T.C. M.; STAMFORD, T.L.M. Potencial biotecnológico de quitosana em sistemas de conservação de alimentos. **Revista Iberoamericana de Polímeros**, Guadalajara, vol.9, n. 5, p. 435-451, 2008.

FARIAS, N.S.; SILVA, B.; OLIVEIRA, A.C.; MULLER, C.M.O. Alginate based antioxidant films with yerba mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.): Characterization and kinetics of phenolic compounds release. **Food Packaging and Shelf Life**, Amsterdam, v.28,p.100548, 2021.

FARNESI, A.P. **Efeitos da própolis de abelhas africanizadas e meliponíneas em microrganismos**. Dissertação de mestrado, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, USP, Ribeirão Preto/SP, 2007.

FERNANDES, F.F., DIAS, A.L.T., RAMOS, C.L., et al. The “in vitro” antifungal activity evaluation of própolis G12 ethanol extract on *Cryptococcus neoformans*. **Rev. Int. Med. Trop**, São Paulo, v. 49, n. 2, p. 93-95, 2007.

FERREIRA et al. A review of analytical methods for p-coumaric acid in plant-based products, beverages, and biological matrices. **Critical reviews in analytical chemistry**, Boca Raton, v. 49, n. 1, p. 21-31, 2019.

FRANÇA, M. Própolis verde mineira conquista mercado internacional. Brasil. 2019. Disponível em: < http://www.emater.mg.gov.br/portal.do/site-noticias/propolis-verde-mineira-conquista-mercado-internacional/?flagweb=novosite_pagina_interna&id=24451> Acesso em: 12 de Maio de 2020.

FUNDO et al. The effect of polymer/plasticiser ratio in film forming solutions on the properties of chitosan films. **Food Biophysics**, New York, v. 10, n. 3, p. 324-333, 2015.

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.

GARGOURI, W. et al. Evaluation of bioactive compounds and biological activities of Tunisian propolis. **LWT**, London, v.111, p.328-336, 2019.

GREENWAY, W.; SCAYSBROOK, T.; WHATLEY, F.R. The composition and plant origins of propolis: a report of work at Oxford. **Bee World**, v.71, p.107-118, 1990.

GRUNBERGER, D.; BANERJEE, R.; EISINGER, K.; OLTZ, E.M.; EFROS, L.; CALDWELL, M.; ESTEVEZ, V.; NAKANISHI, K. Preferential cytotoxicity on tumor cells by caffeic acid phenethyl ester isolated from propolis. **Experientia**, Basel, n. 44, p. 230-232, 1988.

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

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. Free radicals in biology and medicine. v.4. **Oxford University Press**, Oxônia, p.689, 2007.

HOLLMAN, P. C. H.; KATAN, M. B. Dietary flavonoids: intake, health effects and bioavailability. **Food and Chemical Toxicology**, New York, v. 37, p. 937-942, 1999.

HOMEZ-JARA, A.; DAZA, L. D.; AGUIRRE, D. M.; MUÑOZ, J. A.; SOLANILLA, J. F.; VÁQUIRO, H. A. Characterization of chitosan edible films obtained with various polymer

concentrations and drying temperatures. **International Journal of Biological Macromolecules**. Amsterdam, v. 113, p. 1233-1240, 2018.

HOSSEINNEJAD, M.; JAFARI, S. Evaluation of different factors affecting antimicrobial properties of chitosan. **International journal of biological macromolecules**, Amsterdam, v. 85, p. 467-475, 2016.

ISLAM et al. Chitosan based bioactive materials in tissue engineering applications-A review. **Bioactive materials**. Beijing, v. 5, n. 1, p. 164-183, 2020.

JAFARZADEH, S.; JAFARI, S. Impact of metal nanoparticles on the mechanical, barrier, optical and thermal properties of biodegradable food packaging materials. **Critical reviews in food science and nutrition**. Philadelphia, v. 61, n. 16, p. 2640-2658, 2021.

JASKI, J.M.; TELAXKA, F.J.; MOURA, G.S.; FRANZENER, G. Green propolis ethanolic extract in bean plant protection against bacterial diseases. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.49, n.6, 2019.

JAYAKUMAR, R. et al. Biomaterials based on chitin and chitosan in wound dressing applications. **Biotechnology advances**, Oxford, v. 29, n. 3, p. 322-337, 2011.

JIMTAISONG, A.; SAEWAN, N. Utilization of carboxymethyl chitosan in cosmetics. **International journal of cosmetic science**, Oxford, v. 36, n. 1, p. 12-21, 2014.

JU et al. Application of essential oil as a sustained release preparation in food packaging. **Trends in Food Science & Technology**, Cambridge, v. 92, p. 22-32, 2019.

JÚNIOR, L. M. et al. Effect of green propolis extract on functional properties of active pectin-based films. **Food Hydrocolloids**, Boca Raton, v. 131, p. 107746, 2022.

KAYA, M.; CESONIENE, L.; DAUBARAS, R.; LESKAUSKAITE, D.; ZABULIONE, D. Chitosan coating of red kiwifruit (*Actinidia melanandra*) for extending of the shelf life. **International Journal of Biological Macromolecules**, Colorado, v.85, 355, 2018.

KALAYCIOGLU, Z.; TORLAK, E.; AKIN, G.; OZEN, I.; ERIM, F. B. Antimicrobial and physical properties of chitosan films incorporated with turmeric extract. **International Journal of Biological Macromolecules**, Amsterdam, v.101, p. 882-888, 2017.

KAUR, S.; DHILLON, G. S. The versatile biopolymer chitosan: potential sources, evaluation of extraction methods and applications. **Critical reviews in Microbiology**, London, v. 40, n. 2, p. 155-175, 2014.

KIRIGAYA, N.; KATO, H.; FUJIMAKI, M. Studies on Antioxidant Activity of Nonenzymic Browning Reaction Products. Part 3. Fractionation of Browning Reaction Solution between Ammonia and D-Glucose and Antioxidant Activity of the Resulting Fractions. **Nippon Nogeikagaku Kaishi**, Tokyo, v.45, p.292-298, 1971,

KUMAR, S. Free radicals and antioxidants: human and food system. **Journal of Applied Sciences Research**. Faisalabad, v. 2, n. 1, 2011.

KUMAR, S.; PANDEY, A. K. Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview. **The Scientific World Journal**, New York, vol. 2013, 16 pages, 2013.

KURITA, K. Chitin and chitosan: functional biopolymers of marine crustaceans. **Marine Biotechnology**, Berlin, vol. 8, p. 203-226, 2006.

LAAROSSI, H. et al. Effect of antioxidant-rich propolis and bee pollen extracts against D-glucose induced type 2 diabetes in rats. **Food Research International**, Ottawa, v. 138, p. 109802, 2020.

LI, H.; KAPUR, A.; YANG, J.X.; SRIVASTAVA, S.; McLEOD, D.G.; PAREDESGUZMAN, J.F.; DAUGSCH, A.; PARK, Y.K.; RHIM, J.S. Antiproliferation of human prostate cancer cells by ethanolic extracts of Brazilian propolis and its botanical origin. **International Journal of Oncology**, Wilmington, p.601-606, 2007.

LI et al. Tyrosinase inhibition by p-coumaric acid ethyl ester identified from camellia pollen. **Food Science & Nutrition**, Philadelphia, v. 9, n. 1, p. 389-400, 2021.

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 19 de Março de 2020.

LIU, R. H. Potential Synergy of Phytochemicals in Cancer Prevention: Mecanism of Action. **The Journal of nutrition**, New York, v.7, 3479S-3485S, 2004.

LIU et al. Curcumin-releasing chitosan/aloe membrane for skin regeneration. **Chemical Engineering Journal**, Amsterdam, v. 359, p. 1111-1119, 2019.

LIU et al. p-Coumaric acid induces antioxidant capacity and defense responses of sweet cherry fruit to fungal pathogens. **Postharvest Biology and Technology**, New York, v. 169, p. 111297, 2020.

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

LUCENA, C. A. A. et al. Desenvolvimento de biofilmes à base de xilana e xilana/gelatina para produção de embalagens biodegradáveis. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, São Carlos, v. 27, 2017.

LUSTOSA, S. R.; GALINDO, A. B.; NUNES, L. C. C.; RANDAU, K. P.; ROLIM NETO, P. J. Própolis: atualizações sobre a química e a farmacologia. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, São Paulo, v. 18, n. 3, p. 447-454, 2008.

MAIA et al. Extraction of hydroxycinnamic acids (ferulic and p-coumaric) from rice straw alkaline black liquor using Pluronic F-127 for potential applications in the cosmetics industry. **Industrial Crops and Products**, Montana, v. 201, p. 116914, 2023.

MARCUCCI, M. C. Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity. **Apidologie**, Paris, v. 26, p. 83-99, 1995.

MARCUCCI, M. C. Propriedades biológicas e terapêuticas dos constituintes químicos da Própolis. **Química Nova**, São Paulo, v. 19, p. 529-536, 1996.

MARTINEZ, O.A.; SOARES, A.E.E. Melhoramento genético na apicultura comercial para produção de própolis. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, Salvador, v.13, n.4, p.982-990, 2012.

MATSUDA, A.H.; ALMEIDA-MURADIAN, L.B. Validated Method for the Quantification of Artepillin-C in Brazilian Propolis. **Phytochemical Analysis**, Chichester, v. 19, p.179-183, 2008.

MATSUNO, T.; JUNG, S.K.; MATSUMOTO, Y.; SAITO, M.; MORIKAWA, J. Preferential cytotoxicity to tumor cells of 3,5-Diprenyl-4-Hydroxycinnamic acid (Artepillin-C) isolated from propolis. **Anticancer Res., Attiki**, v. 17, p. 3565-3568,1997.

MEI, Y. et al. Exogenous chlorogenic acid alleviates oxidative stress in apple leaves by enhancing antioxidant capacity. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 274, p. 109676, 2020.

MELO, A. A. M.; MATSUDA, A. H.; ALMEIDA-MURADIAN, L. B. Identidade e qualidade da própolis proveniente de quatro regiões do Brasil. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 71, n. 3, p. 540-548, 2012.

MILLER, C. M. O; YAMASHITA, F.; LAURINDO, J. B. Evaluation of the effects of glycerol and sorbitol concentration and water activity on the barrier properties of cassava starch films through a solubility approach. **Carbohydrate Polymers**, Barking, v. 72, p. 82-87, 2008.

MOACIR et al. Antigenotoxicity of artepillin C in vivo evaluated by the micronucleus and comet assays. **Journal of Applied Toxicology**, Philadelphia, v. 31, n. 8, p. 714-719, 2011.

MOHAMED et al. Chemical analysis, antioxidant, cytotoxic and antimicrobial properties of propolis from different geographic regions. **Annals of Agricultural Sciences**, Cairo, 2020a.

MOHAMED et al. Antimicrobial and antioxidant properties of chitosan and its derivatives and their applications: A review. **International Journal of Biological Macromolecules**, Amsterdam, v. 164, p. 2726-2744, 2020b.

MOHSIN, S.; MANOHAR, B.; RAJESH, S.; ASIF, Y. The effects of a dentifrice containing propolis on Mutans Streptococci: a clinico-microbiological study. **Ethiopian Journal of Health Sciences**, Jimma, p. 9-16, 2015.

MOREIRA, T.F. Composição química da própolis: vitaminas e aminoácidos. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, São Paulo, v. 1, p. 12-19, 1986.

MORGANTI, P.; MORGANTI, G.; MORGANTI, A. Transforming nanostructured chitin from crustacean waste into beneficial health products: a must for our society. **Nanotechnology, Science and Applications**, Auckland, v. 4, p. 123, 2011.

- MUJTABA, M.; MORSI, R.E.; KERCH, M.Z.; KAYA, M.; LABIDI, J.; KHAWAR, K.M. Current advancements in chitosan-based film production for food technology; A review. **International journal biological macromoleculares**, Amsterdam, v.121, p. 889-904, 2019.
- MUZZARELLI, R. A. A.; MUZZARELLI, C. Polysaccharides 1: Structure, Characterization and Use. **Journal of polymer Science**, Hoboken, v. 186, p. 151-209, 2005.
- NAZZARO, F.; FRATIANNI, F.; MARTINO, L.; COPPOLA, R.; FEO, V. Effect of essential oils on pathogenic bacteria. **Pharmaceuticals**, London, v. 6, p. 1451-1474, 2013.
- NCCLS. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard—Eighth Edition. NCCLS document M2-A8 (ISBN 1-56238-485-6). NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2003
- NEGRI, G., MARUCCI, M.C.; SALATINO, A., SALATINO, M. L.F. Hydrocarbons and monoesters of própolis wax from Brasil. **Apidologie**, Les Ulis, v.29, p.305-304, 1998.
- NETO, M.S.; TINTINO, S.R.; SILVA, A.R.P.; COSTA, M.S.; BOLIGON, A.A. ; MATIAS, E.F.F.; COUTINHO, H.D.M. Seasonal variation of Brazilian red propolis: Antibacterial activity, synergistic effect and phytochemical screening. **Food and Chemical Toxicology**, New York, v.107, p. 572-580, 2017.
- NGUYEN et al. Comparative characterization and release study of edible films of chitosan and natural extracts. **Food Packaging and Shelf Life**, Amsterdam, v. 32, p. 100830, 2022
- 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*. 2007. p.105 , Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - **Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz**, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2007.
- OLDONI et al. Isolation and analysis of bioactive isoflavonoids and chalcone from a new type of Brazilian propolis. Separation and Purification Technology, Amsterdam, v.77, p. 208-213, 2011.
- OLIVEIRA, A.C.; VALENTIM, I.B; GOULART, M.O.F.; SILVA, C.A.; BECHARA, E.J.H.; TREVISAN, M.T.S. Fontes vegetais naturais de antioxidantes. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n.3, p.689-702, 2009.
- OROIAN, F.; DRANCA M.; URSACHI. F. Comparative evaluation of maceration, microwave and ultrasonic-assisted extraction of phenolic compounds from propolis. **Journal of food science and technology**, Oxford, v.57, n.1, 70-78, 2020.
- OROIAN, M.; URSACHI, F.; DRANCA, F. Influence of ultrasonic amplitude, temperature, time and solvent concentration on bioactive compounds extraction from propolis. **Ultrasonics Sonochemistry**, Amsterdam, v. 64, p. 105021, 2020.
- PAPOTI, V. T.; XYSTOURIS, S.; PAPAGIANNI, G.; TSIMIDOU, M. Z. “Total Flavonoid” Content Assessment via Aluminum (Al III) complexation reactions. What we really measure? **Italian Journal of Food Science**, Oxford, v. 23, 2011.
- PARK et al. Estudo da preparação dos extratos de própolis e suas aplicações. **Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos**, São Paulo, v. 18, p.313-318, 1998.

PARK et al. Lipase-mediated lipid removal from propolis extract and its antiradical and antimicrobial activity. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 95, n. 8, p. 1697-1705, 2015.

PARK, Y. K.; ALENCAR, S. M.; AGUIAR, C. L. Classificação das própolis brasileira a partir de suas características físico-químicas e propriedades biológicas. *Mensagem Doce*, v. 58, 2000. Disponível em: <<http://www.apacame.org.br/mensagemdoce/58/artigo.htm>>. Acesso: em 23 de Julho de 2020.

PARK, Y. K.; IKEGAKI, M.; ALENCAR, S. M. Evaluation of brazilian propolis by both physicochemical methods and biological activity. **Honeybee Science**, Tamagawa, Japan, v. 21, p. 85-90, 2000.

PAULINO et al. Anti-inflammatory effects of a bioavailable compound, Artepillin C, in Brazilian propolis. **European Journal of Pharmacology**, Berlin, v. 587, n. 1-3, p. 296-301, 2008.

PEERS, S.; MONTEBAULT, A.; LADAVIÈRE, Catherine. Chitosan hydrogels for sustained drug delivery. **Journal of Controlled Release**, Amsterdam, v. 326, p. 150-163, 2020.

PELISSARI, F. M. **Produção e caracterização de filmes de amido de mandioca, quitosana e glicerol com incorporação de óleo essencial de orégano**. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 124 p. 2009.

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

PEREIRA et al. Aditivos alimentares naturais emergentes: Uma revisão. **REALIDADES E PERSPECTIVAS**, Ed. **pantanal**, p. 46, 2020.

PIETTA, P.G. Flavonoids as Antioxidants. **Journal of Natural Products**, Gorakhpur, v.63, p.1035-1042, 1999.

PIETTA, P.G., GARDANA, C.; PIETTA, A.M. Analytical methods for quality control of propolis. **Fitoterapia**, Napoli, v. 73, p.7–20, 2002.

POBIEGA, K; KRAŚNIEWSKA, K; GNIEWOSZ, M. Application of propolis in antimicrobial and antioxidative protection of food quality—A review. **Trends in food science & technology**, Cambridge, v. 83, p. 53-62, 2019.

PRABHAKAR, A.R.; KARUNA, Y.M.; YAVAGAL, C.; DEEPAK, B.M. Cavity disinfection in minimally invasive dentistry—comparative evaluation of *Aloe vera* and propolis: a randomized clinical trial. **Contemporary Clinical Dentistry**, Mumbai, n.6, p. S24-31, 2015.

QIN, Y.; LI, P. Antimicrobial Chitosan Conjugates: current synthetic strategies and potential applications. **International Journal of Molecular Sciences**, Basel, v. 21, n. 2, p. 499, 2020.

- RAFIQUE et al. Chitosan functionalized poly (vinyl alcohol) for prospects biomedical and industrial applications: A review. **International journal of biological macromolecules**, Amsterdam, v. 87, p. 141-154, 2016.
- RAMALHO, V.C.; JORGE, N. Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos. **Química Nova**, São Paulo, v.29, n.4, p.755-760, 2006.
- RIBEIRO et al. Optimization of edible coating composition to retard strawberry fruit senescence. **Postharvest Biology and Technology**, New York, v. 44, n. 1, p. 63-70, 2007.
- RIBEIRO et al. Brazilian medicinal plants with corroborated anti-inflammatory activities: A review. **Pharmaceutical biology**, New York, v. 56, n. 1, p. 253-268, 2018.
- RIGHI, A.A.; NEGRI, G.; SALATINO, A. Comparative chemistry of propolis from eight brazilian localities. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, Thousand Oaks, v.2013, 2013.
- ROWE, R. C.; SHESKEY, P. J.; QUINN, M. E. Handbook of Pharmaceutical Excipients. Libros Digitales-**Pharmaceutical Press**, 2009.
- SAIFUDDIN M, N.; KUMARAN, P. Removal of heavy metal from industrial wastewater using chitosan coated oil palm shell charcoal. **Electronic journal of Biotechnology**, Weinheim, v. 8, n. 1, p. 43-53, 2005.
- SÁNCHEZ-GONZÁLEZ, L.; CHÁFER, M.; GONZÁLEZ-MARTÍNEZ, C.; CHIRALT, A.; DESOBRY, S. Study of the release of limonene present in chitosan films enriched with bergamot oil in food simulants. **Journal of Food Engineering**, London, vol. 105, p. 138–143, 2011.
- SARKAR, A.; GOLAY, P.A.; ACQUISTAPACE, S.; CRAFT, B. Increasing the oxidative stability of soybean oil through fortification with antioxidants. **International Journal of Food Science & Technology**, Oxford, v. 50, n. 3, p. 666-673, 2015.
- SAWAYA, A. C. H. F.; CUNHA, I. B. da S.; MARCUCCI, M. C. Analytical methods applied to diverse types of Brazilian propolis. **Chemistry Central Journal**, London, v. 5, n. 27, p. 1-10, 2011.
- SCHELLER, 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 (Life Sciences Advances)**, Jinan, v. 3, p. 123-125, 1994.
- SEBRAE. O mercado da própolis. Brasil 2014. Disponível em: <https://www.sebrae.com.br/Sebrae/Portal%20Sebrae/UFs/BA/Anexos/Produ%C3%A7%C3%A3o%20de%20pr%C3%B3polis%20na%20Bahia.pdf> > Acesso em 22 de Maio de 2020.
- SENEVIRATHNE et al. 13 Cosmeceutical Applications of Chitosan and Its Derivatives. **Marine Cosmeceuticals: Trends and Prospects**, Boca Raton, p. 169, 2011.

SFORCIN, J.M., FERNANDES, A., JR., LOPES, C.A.M., FUNARI, S.R.C. e BANKOVA, V. Seasonal effect of Brazilian propolis on *Candida albicans* and *Candida tropicalis*. **Journal of Venomous Animals and Toxins**, Botucatu, v. 7, p. 139-144, 2001.

SFORCIN, J. M.; BANKOVA, V. Propolis: is there a potential for the development of new drugs? **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 133, n. 2, p. 253-260, 2011.

SFORCIN, Jose M. Biological properties and therapeutic applications of propolis. **Phytotherapy research**, London, v. 30, n. 6, p. 894-905, 2016.

SILVA, F. A. M.; BORGES, M. F. M.; FERREIRA, M.A. Métodos para avaliação do grau de oxidação lipídica e da capacidade antioxidante. **Química Nova**, São Paulo, v.22, n.1, p.94-103, 1999.

SILVA, J.P.L.; DUARTE-ALMEIDA, J.M.; PEREZ, D.V.; FRANCO, B.D.G. DE M. Óleo essencial de orégano: interferência da composição química na atividade frente à *Salmonella enteritidis*. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, São Paulo, v.30, p. 136-141, 2010.

SILVA, V.; GENTA, G.; MOLLER, M.N.; MASNER, M.; THONSON, L.; ROMERO, N.; RADÍ, R.; FERNANDEZ, D. C.; LAURINDO, F.R.M.; HEIZEN, H.; FIERRO, W.; DENICOLA, A. Antioxidant activity of Uruguayan propolis. In vitro and cellular assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v.59, p.6430-6437, 2011.

SINHA et al. Chitosan microspheres as a potential carrier for drugs. **International journal of pharmaceutics**, Amsterdam, v. 274, n. 1-2, p. 1-33, 2004.

SIRIPATRAWAN, U.; HARTE, B.R. Physical properties and antioxidant activity of an active film from chitosan incorporated with green tea extract. **Food Hydrocolloids**, New York, v. 24, p. 770-775, 2010.

SIRIPATRAWAN, U.; VITCHAYAKITTI, W. Improving functional properties of chitosan films as active food packaging by incorporating with propolis. **Food Hydrocolloids**, Boca Raton, v. 61, p. 695-702, 2016.

SOUSA, J.P. B.; FURTADO, N.A.J.C.; JORGE, R.; SOARES, A.E.E.; BASTOS, J.K. Perfis físico-químico e cromatográfico de amostras de própolis produzidas nas microrregiões de Franca (SP) e Passos (MG), Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, São Paulo, v.17, p.85-93, 2007.

SPAGNOL, C. et al. In vitro methods to determine the antioxidant activity of caffeic acid. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, Oxford, v. 219, p. 358-366, 2019.

STRUSZCZYK, M. H. Chitin and chitosan. Part II. Applications of chitosan. **Polimery**, Warszawa, v. 47, p. 396-403, 2002.

SUN et al. Effect of ethanol/water solvents on phenolic profiles and antioxidant properties of Beijing propolis extracts. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, Thousand Oaks, v. 2015, 2015.

SUREK et al. Chemical composition, cytotoxicity, and antibacterial activity of propolis from Africanized honeybees and three different Meliponini species. **Journal of Ethnopharmacology**, Limerick, p. 113662, 2020.

SURIYATEM et al. Biodegradable rice starch/carboxymethyl chitosan films with added propolis extract for potential use as active food packaging. **Polymers**, Basel, v. 10, n. 9, p. 954, 2018.

TAKEMOTO, E.; TEIXEIRA FILHO, J.; GODOY, H.T. Validação de metodologia para a determinação simultânea dos antioxidantes sintéticos em óleos vegetais, margarinas e gorduras hidrogenadas por CLAE/UV. **Química Nova**, São Paulo, v.32, n.5, p.1189-1194, 2009.

TAKESHI et al. Preparation and antioxidant properties of water extract of propolis. **Food chemistry**, Barking, v. 80, n. 1, p. 29-33, 2003.

TANG et al. Pharmacological basis and new insights of quercetin action in respect to its anti-cancer effects. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, Columbia, v. 121, p. 109604, 2020.

TIAN et al. Functional polysaccharide-based film prepared from chitosan and β -acids: Structural, physicochemical, and bioactive properties. **International Journal of Biological Macromolecules**, Amsterdam, v. 181, p. 966-977, 2021.

TORRES, R. N. S.; LOPES, J. A. D.; MOITA NETO, J. M.; CITÓ, A. M. G. L. Constituintes voláteis de própolis piauiense. **Química Nova**, São Paulo, v. 31, n. 3, p. 479-485, 2008.

TORLAK, E.; SERT, D. Antibacterial effectiveness of chitosan–propolis coated polypropylene films against foodborne pathogens. **International Journal of Biological Macromolecules**, Amsterdam, v. 60, p. 52-55, 2013.

UTHAIRATANAKIJ, A.; TEIXEIRA, S. J.; OBSUWAN, K. Chitosan for improving orchid production and quality. **Orchid Science and Biotechnology**, v. 1, n. 1, p. 1-5, 2007.

VANDGHANOONI, S.; FOROOUHARMEHR, A.; ESKANDANI, M.; BERZEGARI, A.; KAFIL, V.; KASHANIAN, S.; DOLATABADI, J. E. N. Cytotoxicity and DNA fragmentation properties of butylated hydroxyanisole. **DNA and Cell Biology**, v. 32, n. 3, 2013.

VARGAS, A.C.; LOGUERCIO, A.P.; WITT, N.M.; COSTA, M.M.; SILVA, M.S.; VIANA, L.R. Atividade antimicrobiana "in vitro" de extrato alcoólico de própolis. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.34 p.159-163, 2004.

VIEIRA, V.B. Obtenção do extrato de própolis assistida por microondas, aplicação em linguiça Toscana e avaliação da sua capacidade antioxidante. Dissertação de Mestrado. 78 p. Centro de Ciências Rurais – **Universidade Federal de Santa Maria**. Santa Maria, RS, 2012.

VOLPI, N.; BERGONZINI, G. Analysis of flavonoids from propolis by on-line HPLC-electrospray mass spectrometry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Oxford, v.42, n.3, p.354-361, 2006.

WANG et al. The antioxidant and antimicrobial activities of different phenolic acids grafted onto chitosan. **Carbohydrate polymers**, London, v. 225, p. 115238, 2019.

WIDJIASTUTI, I., SOETOJO, A.; CAHYANI, F. Anti-glucan effects of propolis ethanol extract on *Lactobacillus acidophilus*. **Dental Journal: Majalah Kedokteran Gigi**, Surabaya, v.50, n.1, p.28-31, 2017.

WU, L.; LIU, M. Preparation and properties of chitosan-coated NPK compound fertilizer with controlled-release and water-retention. **Carbohydrate Polymers**, London, v.72, n.2, p. 240-247, 2008.

WU, J.; CHEN,S.; GE,S.; MIAO, J.; LI, J.; ZHANG, Q. Preparation, properties and antioxidant activity of an active film from silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) skin gelatin incorporated with green tea extract. **Food Hydrocolloids**, Boca Raton, v. 32, p. 42-51, 2013.

YU et al. Chitosan films plasticized with choline-based deep eutectic solvents: UV shielding, antioxidant, and antibacterial properties. **Food Hydrocolloids**, Boca Raton, p. 108196, 2022.

ZHANG et al. Chitosan and procyanidin composite films with high antioxidant activity and pH responsivity for cheese packaging. **Food Chemistry**, Barking, v. 338, p. 128013, 2021.

ZEHRA et al. Phenolic profile and antioxidant potential of propolis from Azerbaijan. **Mellifera**, v. 15, n. 1, p. 16-28, 2015.

ZUANAZZI, J.A.S. Flavonoides. In: SIMOES, C.MO.; SHENKEL, E.P.; GOSMANN, G. MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK,P.R.; **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre: UFRG; Florianópolis, cap.23, p.89-516, 1999.