

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA
ENGENHARIA QUÍMICA**

ISADORA ANTONOV BENVEGNÚ

**FILME BIOPOLIMÉRICO UTILIZANDO EXTRATO DE PRÓPOLIS MARROM
COMO AGENTE ATIVO**

**Bagé
2022**

ISADORA ANTONOV BENVEGNÚ

**FILME BIOPOLIMÉRICO UTILIZANDO EXTRATO DE PRÓPOLIS MARROM
COMO AGENTE ATIVO**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de Engenharia
Química da Universidade Federal do
Pampa, como requisito parcial para
obtenção do Título de Bacharel em
Engenharia Química

Orientadora: Prof^a Dr^a. Gabriela Silveira da
Rosa

Coorientadora: Prof^a Dr^a. Caroline Costa
Moraes

**Bagé
2022**

Ficha catalográfica elaborada automaticamente com os dados fornecidos
pelo(a) autor(a) através do Módulo de Biblioteca do
Sistema GURI (Gestão Unificada de Recursos Institucionais) .

B478f Benvegnú, Isadora Antonov

Filme biopolimérico utilizando extrato de própolis marrom
como agente ativo / Isadora Antonov Benvegnú.

76 p.

Trabalho de Conclusão de Curso(Graduação)-- Universidade
Federal do Pampa, ENGENHARIA QUÍMICA, 2022.

"Orientação: Gabriela Silveira da Rosa".

1. Carragenana. 2. Extração por maceração. 3. Extração por
ultrassom. 4. Aditivos. 5. Compostos bioativos . I. Título.



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
Universidade Federal do Pampa

ISADORA ANTONOV BENVEGNÚ

FILME BIOPOLIMÉRICO UTILIZANDO EXTRATO DE PRÓPOLIS MARROM COMO AGENTE ATIVO

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Engenharia Química da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do Título de Bacharel em Engenharia Química.

Trabalho de Conclusão de Curso defendido e aprovado em 24 de março de 2022.

Banca examinadora:

Profa. Dra. Gabriela Silveira da Rosa
Orientadora
UNIPAMPA

Profa. Dra. Caroline Costa Moraes
Co-orientadora

UNIPAMPA

Profa. Msc. Luisa Bataglin Avila

UFSM

Profa. Dra. Thamiris Martiny

UNIPAMPA



Assinado eletronicamente por **THAMIRIS RENATA MARTINY, PESSOAL VOLUNTÁRIO**, em 25/03/2022, às 20:18, conforme horário oficial de Brasília, de acordo com as normativas legais aplicáveis.



Assinado eletronicamente por **GABRIELA SILVEIRA DA ROSA, PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR**, em 25/03/2022, às 20:43, conforme horário oficial de Brasília, de acordo com as normativas legais aplicáveis.



Assinado eletronicamente por **CAROLINE COSTA MORAES, PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR**, em 28/03/2022, às 09:27, conforme horário oficial de Brasília, de acordo com as normativas legais aplicáveis.



Assinado eletronicamente por **Luisa Bataglin Avila, Usuário Externo**, em 28/03/2022, às 11:37, conforme horário oficial de Brasília, de acordo com as normativas legais aplicáveis.



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.unipampa.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **0763575** e o código CRC **334CB038**.

Referência: Processo nº 23100.004128/2022-33 SEI nº 0763575

Dedico esse trabalho à minha avó Nena por me ensinar a sorrir diante das dificuldades

AGRADECIMENTOS

O primeiro agradecimento vem para aqueles que me ensinaram que estudar é uma coisa boa, importante e necessária. Agradeço a eles, pai e mãe, por todo o esforço que tiveram, pela confiança que depositaram e por todo o amor e suporte ao longo da minha graduação. À minha irmã, por ter me motivado desde muito nova e por ter sido meu exemplo de coragem e inspiração. À UNIPAMPA, universidade pública, gratuita e de qualidade que possibilitou a realização desse sonho. Aos professores, por toda a maestria e empenho repassado, o qual sempre foi incluído de forma acolhedora e empática. À minha orientadora, Prof^a. Dr^a. Gabriela Silveira da Rosa e coorientadora Prof^a. Dr^a. Caroline Costa Moraes por toda a paciência e disposição para que a realização desse trabalho fosse possível. Aos meus colegas de estágio, por todo o profissionalismo, ensinamentos e risadas compartilhadas, onde aprendi e cresci muito como pessoa e como profissional. Às minhas amigas de longa data que sempre carreguei comigo, que estiveram ao meu lado e não hesitaram sair em nenhum momento: Luiza, Manuela, Gabriela, Renata Cogo e Renata Viero, obrigada. Às amigas adquiridas ao longo da graduação e que tornaram a jornada um pouco menos difícil e que certamente serão ótimas profissionais: Giullia, Elis Regina, Thaciana e Klayryen, À Lara, por todo o companheirismo, ensinamentos e suporte ao longo dos anos. E à todos aqueles que por algum momento cruzaram o meu caminho e fizeram isso tudo valer a pena, meu muito obrigada.

“Quando a educação não é libertadora, o sonho do oprimido é tornar-se o opressor”

- Paulo Freire

RESUMO

O presente trabalho buscou desenvolver um filme biopolimérico incorporado de extrato de própolis marrom, o qual serviu como barreira antimicrobiana, além de possuir potencial para ser utilizado como embalagem para alimentos. A matéria-prima (própolis) *in natura* foi avaliada quanto aos teores de umidade e cinzas, e indicou um percentual de 4,30 e 0,54%, respectivamente. Os extratos de própolis foram obtidos utilizando duas técnicas. Primeiramente a técnica de maceração e posteriormente a técnica de extração por ultrassom, sendo essa realizada por meio de dois equipamentos diferentes: banho ultrassônico e sonificador de ponteira ultrassônico. Em ambos os casos fez-se o uso de dois solventes diferentes: água e etanol 80%. Os extratos foram avaliados quanto ao seu pH, atividade antioxidante e compostos fenólicos totais, sendo que para o extrato aquoso o pH obtido foi de 5,89, os percentuais de atividade antioxidante variaram entre $7,34 \pm 0,12$ e $37,04 \pm 1,19\%$ e os compostos fenólicos totais variaram entre $2,40 \pm 0,03$ e $16,29 \pm 0,81$ mg GAE.g⁻¹ b.s. Para o extrato etanólico, o pH foi de 5,19 e a atividade antioxidante total e os compostos fenólicos totais variaram entre $93,41 \pm 0,09$ e $94,28 \pm 0,43\%$ e $63,08 \pm 2,41$ e $147,45 \pm 4,23$ mg GAE.g⁻¹ b.s., respectivamente. Os extratos foram incorporados aos filmes formulados a partir da técnica *casting*, tendo sido utilizado 0,5 g de carragenana como biopolímero, 0,3 g de glicerol como plastificante, 75 mL de solvente e 15 mL de extrato aquoso (obtido pela técnica D) e etanólico (obtido pela técnica F). Para avaliação dos filmes foram realizadas as análises de espessura, obtendo valores de $0,051 \pm 0,02$ e $0,046 \pm 0,01$ mm para filmes contendo extrato etanólico e extrato aquoso, respectivamente. As propriedades mecânicas também foram analisadas, havendo redução de 56,5% para o extrato etanólico e 15,8% para o extrato aquoso no que se refere a resistência à tração em relação ao filme controle, enquanto que para alongação e permeabilidade ao vapor de água a presença do extrato não interferiu nas propriedades dos filmes. Além disso, todos os filmes demonstraram um caráter de total solubilidade em água. Ainda, os filmes contendo extrato etanólico foram capazes de formar halos de inibição frente às cepas de bactérias Gram-positivas (*Staphylococcus aureus*) e Gram-negativas (*Escherichia coli*) que foram de $8,14 \pm 0,31$ e $6,81 \pm 0,21$ mm, respectivamente, evidenciando o caráter antimicrobiano da própolis utilizada e o respectivo potencial ativo do filme.

Palavras-Chave: Carragenana. Extração por maceração. Extração por ultrassom. Aditivos. Compostos bioativos.

ABSTRACT

The present work sought to develop a biopolymeric film incorporated with brown propolis extract, which served as an antimicrobial barrier, in addition to having the potential to be used as food packaging. The raw material (propolis) in natura was evaluated in terms of moisture and ash contents, and indicated a percentage of 4,30 and 0,54%, respectively. Propolis extracts were obtained using two techniques. First the maceration technique and later the ultrasound extraction technique, which is performed using two different equipment: ultrasonic bath and ultrasonic tip sonicator. In both cases, two different solvents were used: water and 80% ethanol. The extracts were evaluated for their pH, antioxidant activity and total phenolic compounds, and for the aqueous extract the pH obtained was 5,89, the percentages of antioxidant activity varied between $7,34 \pm 0,12$ and $37,04 \pm 1,19\%$ and the total phenolic compounds varied between $2,40 \pm 0,03$ and $16,29 \pm 0,81$ mg GAE.g⁻¹ b.s. For the ethanol extract, the pH was 5,19 and the total antioxidant activity and the total phenolic compounds varied between $93,41 \pm 0,09$ and $94,28 \pm 0,43\%$ and $63,08 \pm 2,41$ and $147,45 \pm 4,23$ mg GAE.g⁻¹ b.s., respectively. The extracts were incorporated into the formulated films using the casting technique, using 0,5 g of carrageenan as a biopolymer, 0,3 g of glycerol as a plasticizer, 75 mL of solvent and 15 mL of aqueous extract (obtained by technique D) and ethanolic (obtained by the F technique). To evaluate the films, thickness analyzes were performed, obtaining values of $0,051 \pm 0,02$ and $0,046 \pm 0,01$ mm for films containing ethanolic extract and aqueous extract, respectively. The mechanical properties were also analyzed, with a reduction of 56,5% for the ethanol extract and 15,8% for the aqueous extract in terms of tensile strength in relation to the control film, while for elongation and vapor permeability of water, the presence of the extract did not affect the properties of the films. In addition, all films demonstrated a character of total solubility in water. Furthermore, the films containing ethanolic extract were able to form inhibition halos against strains of Gram-positive (*Staphylococcus aureus*) and Gram-negative (*Escherichia coli*) bacteria, which were $8,14 \pm 0,31$ and $6,81 \pm 0,21$ mm, respectively, evidencing the antimicrobial character of the propolis used and the respective active potential of the film.

Keywords: Carrageenan. Maceration extraction. Ultrasound extraction. Additions. Bioactive compounds.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estruturas moleculares de kappa-carragenana, iota-carragenana e lambda carragenana.....	23
Figura 2 – Própolis marrom <i>in natura</i>	26
Figura 3 – Mecanismo de extração assistida por micro-ondas.....	28
Figura 4 – Mecanismo de extração assistida por ultrassom.....	29
Figura 5 – Etapas envolvidas no desenvolvimento do trabalho.....	36
Figura 6 – Própolis bruta <i>in natura</i> (1) e própolis moída (2).....	37
Figura 7 – Operações realizadas.....	38
Figura 8 – Equipamentos extratores realizados.....	39
Figura 9 – Análise das propriedades mecânicas através do texturômetro.....	44
Figura 10 – Análise de permeabilidade ao vapor de água.....	45
Figura 11 – Extratos obtidos por meio da extração convencional com água (A) e etanol (B).....	48
Figura 12 – Extrato etanólico (F) via banho ultrassônico.....	48
Figura 13 – Filme ativo com adição de extrato etanólico de própolis (E) e filme controle etanólico sem extrato (CE); Filme ativo com adição de extrato aquoso de própolis (A) e filme controle aquoso sem extrato (CA).....	54
Figura 14 – Halos de inibição dos filmes E e CE frente às cepas <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Escherichia coli</i>	61

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Pesquisas já desenvolvidas envolvendo filmes incorporados com extrato de própolis.....	33
---	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Ensaio realizado frente as técnicas de extração.....	40
Tabela 2 – Resultados da caracterização da própolis bruta.....	47
Tabela 3 – Resultados obtidos pelas análises dos extratos utilizando água como solvente.....	49
Tabela 4 – Resultados obtidos pelas análises dos extratos utilizando etanol 80% como solvente.....	51
Tabela 5 – Caracterização dos filmes.....	55
Tabela 6 – Potencial ativo dos filmes controles e filmes ativos.....	59
Tabela 7 – Análise microbiológica dos filmes frente às bactérias <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Escherichia coli</i>	59

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- AA – Atividade Antioxidante
- AOAC – Association of Official Analytical Chemists
- B.S. – Base Seca
- B.U. – Base Úmida
- CA – Filme Controle Aquoso sem Extrato
- CE – Filme Controle Etanólico sem Extrato
- CFT – Compostos Fenólicos Totais
- DPPH – 2,2-difenil-1-picrilhidrazila
- E. COLI – *Escherichia coli*
- EFSC – Extração Assistida por Fluidos Supercríticos
- FRAP – Ferric Reducing Antioxidant Power
- FTIR – Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de *Fourier*
- GAE – Ácido gálico
- IPCC – Intergovernmental Panel on Climate Change (Painel Intergovernamental sobre Mudanças do Clima)
- MAE – Extração Assistida por Micro-ondas
- MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
- ONU – Organização das Nações Unidas
- PVA – Permeabilidade ao Vapor d'água
- PROP – Propriedade
- S. AUREUS – *Staphylococcus aureus*
- S-L – Sólido-Líquido
- TCC – Trabalho de Conclusão de Curso
- UAE – Extração Assistida Ultrassom
- UFC – Unidades Formadoras de Colônia
- UNIPAMPA – Universidade Federal do Pampa
- WWF – World Wide Fund For Nature (Fundo Mundial para a Natureza)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	17
2 OBJETIVOS.....	19
2.1 Objetivo Geral.....	19
2.2 Objetivos Específicos.....	19
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	20
3.1 A necessidade de produtos advindos de fontes renováveis.....	20
3.2 Embalagem ativa biodegradável.....	21
3.2.1 Carragenana: um polímero natural.....	22
3.2.2 Aditivos antimicrobianos.....	23
3.3 Própolis.....	24
3.3.1 Extração e caracterização dos compostos bioativos da própolis...	26
3.3.2 Filmes ativos contendo própolis.....	31
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	36
4.1 Preparo da matéria-prima.....	36
4.2 Caracterização da matéria-prima.....	37
4.2.1 Teor de umidade.....	37
4.2.2 Teor de cinzas.....	38
4.3 Extração dos compostos bioativos.....	38
4.4 Caracterização do extrato obtido.....	41
4.4.1 pH.....	41
4.4.2 Compostos fenólicos totais.....	41
4.4.3 Atividade antioxidante	41
4.5 Elaboração do filme biopolimérico ativo.....	42
4.6 Caracterização do filme ativo.....	43
4.6.1 Espessura.....	43
4.6.2 Propriedades mecânicas.....	43
4.6.3 Permeabilidade ao vapor de água.....	44
4.6.4 Solubilidade em água.....	45
4.6.5 Potencial ativo.....	45
4.6.6 Análise microbiológica.....	46
4.6.7 Análise estatística.....	46

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	47
5.1 Caracterização da matéria-prima.....	47
5.2 Extração dos compostos bioativos e caracterização dos extratos....	47
5.3 Elaboração e caracterização dos filmes biopoliméricos ativos.....	53
6 CONCLUSÃO.....	62
7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	64
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	65

1 INTRODUÇÃO

Dentro do ramo alimentício as embalagens plásticas desempenham a função de conter o alimento e contribuir na conservação dos mesmos, além de servirem como meio informativo a respeito do produto embalado (LANDIN *et al.*, 2016). Entretanto, o uso e descarte desordenado, acompanhado de uma política de reciclagem enfraquecida devido à pouca valorização e conscientização por parte da população, acaba por influenciar negativamente nas questões ambientais. Dessa forma, observa-se que a busca por materiais advindos de fontes renováveis ganhou força nos últimos anos. A problemática que norteia a utilização de embalagens plásticas abre espaço à busca e ao desenvolvimento de tecnologias que não agridam os ecossistemas, favorecendo assim o uso de alternativas ambientalmente amigáveis. Nesse sentido, destacam-se o uso de embalagens biodegradáveis, que se caracterizam por serem produzidas a partir de materiais biológicos.

As embalagens biodegradáveis possuem o diferencial de serem formadas por polímeros naturais ao invés de sintéticos, conhecidos como biopolímeros. Segundo Bastos (2007), os biopolímeros podem ser sintetizados por organismos vivos e possuem diferentes composições de monômeros, estrutura macromolecular e propriedades físicas. Um exemplo é a carragenana, que conforme Pereira (2010), é um polissacarídeo encontrado nas paredes esqueléticas de algas vermelhas, que se destacam devido suas propriedades espessantes, gelificantes, emulsificantes e estabilizantes. Como vantagem, as embalagens biodegradáveis possuem rápida degradação e baixo custo, além de possuírem a capacidade de serem acrescentadas de aditivos naturais que aumentem sua funcionalidade, exercendo não só a função de conter o alimento, como também agir de forma a agregar funções de interesse, seja prolongando a vida de prateleira e preservando as propriedades sensoriais e/ou atuando diretamente como barreira antimicrobiana, antifúngica e antioxidante (ADILAH *et al.*, 2018; BRAGA; SILVA, 2017; DE AQUINO *et al.*, 2019).

Dessa forma, o caráter ativo age de forma gradativa, onde o agente ativo é adicionado diretamente na matriz polimérica e permite a liberação lentamente do aditivo ao alimento (BRAGA; SILVA, 2017). Os aditivos empregados por sua vez, são em sua maioria, advindos de óleos essenciais e extratos vegetais. A própolis, que pode ser definida como uma mistura complexa resinosa, gomosa e balsâmica, por exemplo, pode ser empregada como aditivo devido suas inúmeras propriedades

biológicas e terapêuticas (EZAZI *et al.*, 2021; MACHADO *et al.*, 2016; SIMONE-FINSTROM; SPIVAK, 2010).

Estudos aplicados à própolis como aditivo em filmes biodegradáveis estão em constante aperfeiçoamento (CORREA-PACHECO *et al.*, 2019; DE ARAÚJO *et al.*, 2015). A busca por metodologias que garantam uma maior eficiência na extração dos compostos bioativos da própolis é alvo de maior atenção, considerando parâmetros como pH, tipo de solvente extrator, método de extração e temperatura, por exemplo (MACHADO *et al.*, 2016; PIETTA; GARDANA; PIETTA, 2002). Nesse contexto, o desenvolvimento de uma embalagem ativa incorporada com extrato de própolis como agente antimicrobiano, formulada a partir de uma matriz polimérica natural (carragenana), torna-se uma forte alternativa, livre de aditivos químicos e com apelo totalmente sustentável, distanciando-se das embalagens sintéticas convencionais. Ainda, o apelo ao uso de uma técnica ambientalmente amigável para obtenção do extrato da própolis (como a água) torna-se alvo de uma maior atenção, visto que grande parte dos estudos envolvendo solventes extratores referem-se ao uso de etanol como solvente, este que quando utilizado em grande quantidade é considerado tóxico, além de que, segundo Pugliese e Lourencetti (2017), a produção de etanol pode gerar impactos ainda desconhecidos pela maior parte da população, tanto na produção agrícola quanto na produção industrial, podendo ocasionar poluição atmosférica e poluição dos recursos hídricos.

Baseado nos mesmos ideais, o grupo de pesquisa intitulado Engenharia de Processos em Sistemas Particulados, formado por discentes e docentes da Universidade Federal do Pampa, estuda desde 2014 a aplicação de aditivos naturais em embalagens ativas e inteligentes, sendo alguns destes trabalhos: otimização da extração verde para recuperação de compostos bioativos da olivicultura brasileira e avaliação de seu potencial como conservante natural (MARTINY, *et al.*, 2021); desenvolvimento de filmes biodegradáveis com propriedades antioxidantes melhoradas com base na adição de carragenana contendo extrato de folha de oliveira para aplicações em embalagens de alimentos (ROSA, *et al.*, 2019); filmes à base de carragenana incorporados ao extrato de casca de jabuticaba: um material inovador para embalagens de alimentos ativos (AVILA, *et al.*, 2020). Assim, evidencia-se a importância na busca de tecnologias que favoreçam o desenvolvimento sustentável, e que, de forma inovadora, contribuam para o avanço na incorporação de produtos naturais como substitutos aos aditivos sintéticos.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

O presente trabalho tem como objetivo o desenvolvimento de um filme biopolimérico com potencial para ser utilizado como embalagem para alimentos, contendo como aditivo ativo os compostos bioativos da própolis marrom.

2.2 Objetivos Específicos

- Quantificar os teores de umidade e cinzas da própolis *in natura*;
- Realizar a extração dos compostos presentes na própolis marrom utilizando a técnica de ultrassom e maceração sob diferentes condições, avaliando qual o método proporciona maior eficiência quanto à obtenção de compostos bioativos;
- Analisar os extratos obtidos quanto ao pH, atividade antioxidante e compostos fenólicos totais;
- Elaborar um filme ativo biopolimérico contendo o extrato da própolis;
- Avaliar as propriedades do filme produzido: física, química, mecânica, de barreira e ativa;
- Realizar a caracterização do potencial antimicrobiano do filme obtido na condição ideal frente a bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 A necessidade de produtos advindos de fontes renováveis

Segundo dados reportados no relatório The World Bank (2018), o Brasil é o quarto maior produtor de lixo plástico do mundo, onde Estados Unidos, China e Índia lideram o *ranking*. Anualmente, o país produz cerca de 11,3 milhões de toneladas de lixo plástico. Estudos realizados pelo grupo WWF (Fundo Mundial para a Natureza) indicaram por meio de um relatório publicado em 2019, que desse total, 91% da produção é coletada, porém apenas 1,28% são de fato recicladas. Esse fator está diretamente ligado ao crescimento demográfico e consequente aumento do nível de qualidade de vida dos últimos anos, o qual ocasiona um aumento na quantidade de resíduos gerados. O consumo desenfreado movido por uma sistemática capitalista dificulta o processo da reutilização, facilitando a prática do descarte inconsciente. Conforme Pertussatti (2020), o resíduo plástico (polímero sintético) é responsável por cerca de 90% de todo o resíduo plástico que está presente nos oceanos. De acordo com a autora, as propriedades químicas do plástico, intercalados com o descarte indevido e gerenciamento inadequado, são capazes de adsorverem substâncias perigosas como metais pesados e disruptores endócrinos, fatores graves aos seres humanos, além de serem altamente prejudiciais aos seres vivos, causando mortes por sufocamento, por exemplo.

Por se tratar de uma problemática não só nacional como mundial, surge a necessidade do desenvolvimento de produtos que sejam de rápida degradação e que possam atuar como substitutos totais ou parciais das fontes fósseis atuais, com o objetivo de amenizar os impactos ambientais no futuro. A busca por alternativas sustentáveis vem ocupando espaços cada vez mais importantes e urgentes. Assim, a biodiversidade brasileira é apontada como um fator importante no âmbito econômico, devido ao seu potencial como fornecedora de matéria-prima para obtenção de produtos ambientalmente sustentáveis. Nesse âmbito, surgem como alternativas eficazes e alvo de pesquisas recentes os materiais biodegradáveis, estes que se destacam pelo tempo rápido de degradação, além de propiciarem novos mercados devido a vasta gama de opções que podem ser incorporadas aos mesmos (FERRO; BONACELLI; ASSAD, 2006; PODSHIVALOV *et al.*, 2017).

3.2 Embalagem ativa biodegradável

Segundo Ivankovic *et al.* (2017), a embalagem é definida como qualquer produto destinado para proteger, manusear, viabilizar o transporte e apresentar mercadorias que estejam nela contidas. Apesar de possuir esses atributos, uma das principais responsabilidades da embalagem no ramo alimentício é proteger o produto dos impactos químicos, mecânicos e microbiológicos, mantendo seus valores nutricionais inalteráveis.

Desde a década de 60, o uso de embalagens feitas a partir de polímeros advindos do petróleo vêm acelerando de forma crescente devido sua ampla versatilidade e baixo custo (SOUSA *et al.*, 2012). Em contrapartida, a busca por materiais que sejam de rápida biodegradabilidade e que não afetem o ecossistema não se tornou apenas um desejo no século XXI, como também uma necessidade. Em um novo relatório global do IPCC (Painel Intergovernamental sobre Mudanças do Clima) publicado pela ONU em 09 de agosto de 2021 (MASSON-DELMOTTE, *et al.*, 2021) há indicação com base em trabalhos científicos de que a temperatura média do planeta tende a subir 1,5 °C nas próximas duas décadas, trazendo devastações generalizadas e tendências irreversíveis. O relatório frisa, entre outras, a necessidade de soluções baseadas na não utilização de combustíveis fósseis, bem como a prática de economias inclusivas e verdes. Nesse sentido, o uso de embalagens biodegradáveis sustentáveis torna-se apto como alternativa ao uso de embalagens plásticas.

Os filmes biodegradáveis dependem de fatores importantes que irão influenciar diretamente em suas características. Os filmes devem ser resistentes à ruptura quando submetidos a tração e ao impacto, por exemplo, para que possam proteger o alimento e facilitar sua manipulação, mantendo certa flexibilidade. A espessura, por sua vez, é importante para avaliar a uniformidade do material e obter informações sobre a resistência mecânica e propriedades de barreira aos gases e vapores d'água (HENRIQUE; CEREDA; SARMENTO, 2008).

De maneira inovadora e tecnológica, pesquisas (ADILAH *et al.*, 2018; DE ALMEIDA, 2017; BATTISTI, 2016; CHOI *et al.*, 2018; MA; LI; WANG, 2018; SHARMA *et al.*, 2020) apontam a incorporação de aditivos naturais à essas embalagens, conferindo princípios ativos que agem de maneira a agregar ainda mais, não só cumprindo o papel como embalagem, mas também interagindo direta e positivamente

com o produto embalado. Conforme Realini e Marcos (2014), essa tecnologia está baseada na adição de componentes na embalagem que liberam ou absorvem substâncias para os alimentos embalados ou para o ambiente, de modo a prolongar a vida de prateleira e manter (ou aumentar) a qualidade e a segurança dos alimentos.

Assim sendo, a embalagem biodegradável é definida como um produto reciclável, que se decompõem de forma rápida, não tóxica e não prejudicial ao meio ambiente. Sua formulação é baseada, na maioria dos casos, na utilização de biopolímeros adicionados de plastificantes. Segundo Conde (2011), os biopolímeros, são oriundos de fontes naturais e dentre eles destacam-se o amido, que pode ser encontrado na batata, arroz, mandioca, entre outros, a borracha (advinda da seringueira), os polissacarídeos (tais como a celulose e carragenana), a quitina, a proteína, dentre outros.

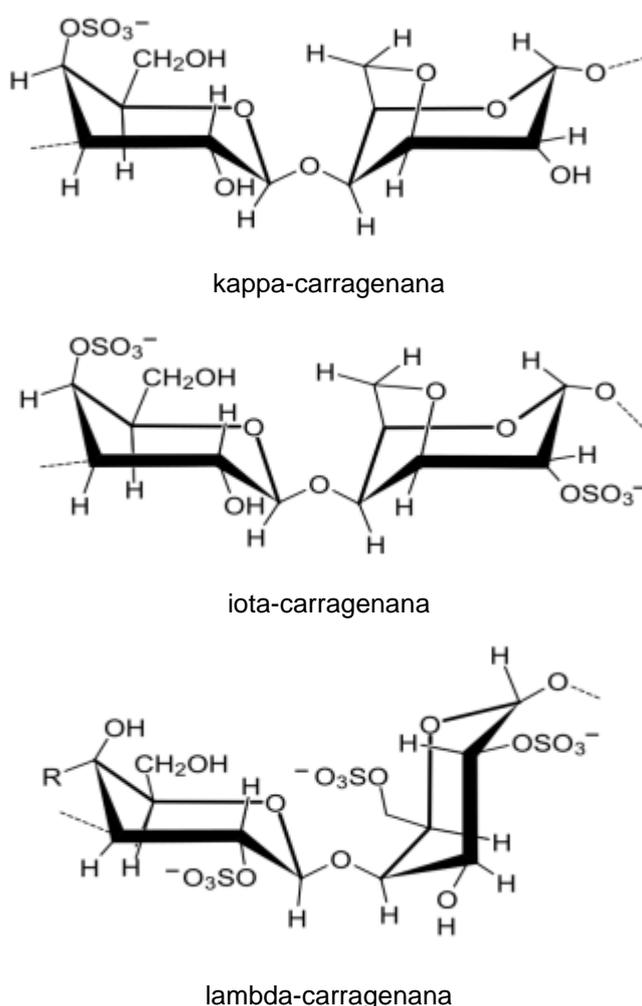
3.2.1 Carragenana: um polímero natural

Segundo Souza *et al.* (2021) e Bastos (2007), os biopolímeros são muitas vezes considerados como polissacarídeos de fonte sustentável, onde são amplamente utilizados na indústria alimentícia por serem em sua maioria biocompatíveis (atóxicos) e biodegradáveis, sendo que 90% se decompõem em um período de seis meses. Conforme os autores citados, diferentes biopolímeros foram relatados quanto ao seu potencial de aplicação na formação de embalagens biodegradáveis, como a quitosana, o amido, a gelatina e a carragenana.

Os polissacarídeos hidrossolúveis, também chamados de hidrocoloides, são polímeros advindos de origem vegetal, animal, microbiana ou sintética, dos quais normalmente possuem grande quantidade de grupos hidroxila. Ocupando o terceiro lugar como hidrocoloide mais importante na área alimentar devido suas propriedades gelificantes, as carragenanas ficam atrás somente da gelatina e do amido. As carragenanas são obtidas a partir de extratos de algas marinhas vermelhas, formadas por monômeros de D-galactopiranosose e 3,6- anidrogactose, onde são unidas por ligações glicosídicas α -1,3 e β -1,4. Dividem-se em diversos tipos (sendo λ , κ e ι os mais abundantes), os quais diferem entre si pelo conteúdo de 3,6-anidrogactose e pelo número de grupamentos sulfato presentes na estrutura ao longo da cadeia (Figura 1). Dessa forma, são caracterizadas como polímeros lineares e solúveis em água, e por esse motivo, são substâncias tipicamente viscosas, característica que

confere boa aplicabilidade na formação de filmes que atuem na conservação de alimentos, por exemplo (CAMPELO, 2017; GAVA, 2008; Da Costa *et al.*, 2017; MARTINY *et al.*, 2017). Nesse sentido, filmes à base de diferentes proporções de carragenanas com diferentes aplicabilidades foram produzidos por De Paula (2013), Martiny *et al.* (2020) e Ribeiro *et al.* (2007), sugerindo sua utilização como substituto aos filmes sintéticos.

Figura 1 - Estruturas moleculares de kappa-carragenana, iota-carragenana e lambda-carragenana



Fonte: Campelo (2017)

3.2.2 Aditivos antimicrobianos

A ideia de desenvolver embalagens inertes que não tenham nenhuma interação com o produto acondicionado, a não ser embalar e proteger o produto, além de trazer

informações, tem passado por novas transformações. A busca nas últimas décadas por alimentos sem conservantes químicos, faz com que o desafio da segurança dos alimentos seja impulsionado pela busca de formas inovadoras que inibam o crescimento de patógenos mantendo o alimento mais natural possível.

Conforme Appendini e Hotchkiss (2002), a inserção de aditivos não sintéticos (naturais) às embalagens que possam agregar características interessantes aos produtos, caracterizam-se por serem na maioria das vezes advindos de óleos essenciais e extratos de plantas. Nesse sentido, os aditivos antimicrobianos provenientes de fontes naturais atuam como inibidores e/ou retardadores do crescimento de microrganismos que possam estar presentes no alimento embalado ou até mesmo no material de embalagem. Almeida (2017) desenvolveu uma embalagem ativa utilizando óleo essencial de orégano (*Origanum vulgare*) e hortelã (*Mentha arvensis*) como aditivo antimicrobiano para pães de forma, e evidenciou o caráter antimicrobiano e antioxidante dos óleos essenciais, apresentando atividade atestada pela extensão da vida útil dos pães analisados, indicando ser uma aplicação economicamente viável. Martiny, Moraes e Rosa (2018) desenvolveram um filme biodegradável incorporado com extrato foliar de *Olea Europaea* L. para aplicação como embalagem ativa e evidenciaram o poder de inibição frente aos microrganismos avaliados. Müller (2016) desenvolveu uma embalagem ativa biodegradável de amido de pinhão e de mandioca com antioxidantes e antimicrobianos naturais, como extrato de alecrim, chá verde e erva-mate, para conservação de manteiga orgânica e pôde observar que os filmes produzidos inibiram o desenvolvimento dos microrganismos *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. Assim, os mais variados estudos exemplificam a utilização dos aditivos naturais como alternativas frente aos conservantes sintéticos, evidenciando a passividade de serem incorporados em embalagens, exercendo o papel de conter, manter e conservar os alimentos a longo prazo.

3.3 Própolis

A própolis é composta por aproximadamente 50% de resinas, 30% de ceras, 10% de óleos essenciais e aromáticos, 5% de pólen e os outros 5% de substâncias orgânicas (BURDOCK, 1998; KOSALEC *et al.*, 2004). Essa composição resinosa e pegajosa, deve-se ao fato de que a própolis é sintetizada pelas abelhas a fim de

proteger as paredes da colmeia das baixas temperaturas, além de proteger contra a contaminação microbiana, viral e fúngica, e servir como substância de preservação de invasores que possam vir a morrer dentro da colmeia, evitando sua deterioração (GHISALBERTI, 1979; SIMONE-FINSTROM; SPIVAK, 2010; ZABAIYOU *et al.*, 2017). Ela é definida como um produto sintetizado pelas abelhas, logo, sua origem não é considerada animal. Durante o processo de sintetização, as abelhas coletam substâncias como resinas e pólen de plantas, caules, folhas, botões, brotos e frutos, onde posteriormente exercem uma interação com as enzimas presentes na saliva das mesmas, como a 13-glicosidase, dando origem ao produto (PARK *et al.*, 1998).

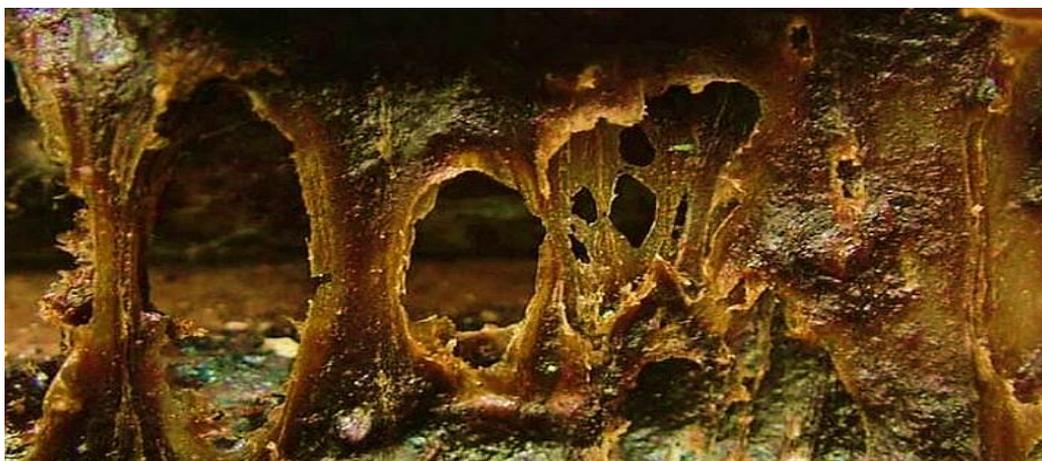
Segundo Ghisalberti (1979), o uso da própolis é datado desde 300 anos Antes de Cristo. Desde a antiguidade, seu uso para fins medicinais já era algo usual. Em sua composição encontram-se uma vasta variedade de compostos químicos que carregam efeitos terapêuticos como antimicrobianos, antioxidantes, antivirais, anti-inflamatórios e citotóxicos. Dentre estes compostos estão os ácidos benzoicos, ácidos fenólicos, flavonoides, aminoácidos, ácidos graxos, entre outros. Devido à diversidade de compostos, seus efeitos biológicos dependem diretamente de diversos fatores como a região, clima, vegetação, estação do ano, época de coleta e espécie da abelha coletora (CASTRO, 2001; FERNANDA; SILVA, 2018; SFORCIN; BANKOVA, 2011; SILVA *et al.*, 2012).

Favorecido por uma vasta biodiversidade, o Brasil dispõe de treze diferentes tipos de própolis, ocasionando em uma composição química complexa, que estão dispostos de acordo com suas propriedades físico-químicas, bem como a região em que se encontram. Eles variam nas cores verde, vermelho e marrom, além de possuírem odor característico, os quais vem sendo alvo de pesquisas recorrentes (BURDOCK, 1998; DAUGSCH *et al.*, 2008; PARK; ALENCAR; AGUILAR, 2007). Suas aplicações estão presentes principalmente em produtos fármacos, que abrangem tanto a medicina humana quanto a medicina veterinária, além de terem ganhado espaço no mercado de produtos naturais (BANSKOTA; TEZUKA; KADOTA, 2001).

Para garantir um produto de qualidade, se faz necessário o controle das características físico-químicas do mesmo, uma vez que o mercado demonstra maior exigência com relação às procedências de cada produto, a fim de garantir que suas propriedades naturais se mantenham preservadas e com uma boa apresentação, por exemplo. Dessa forma, a legislação brasileira (BRASIL, 2001) adotou valores padrões que devem ser seguidos. Um exemplo é a determinação do teor de umidade da

própolis, onde um elevado teor pode favorecer o crescimento de fungos, tornando o produto impróprio para o consumo, como também a determinação do teor de ceras, visto que elevados teores incumbem em um menor teor de resinas e demais substâncias responsáveis pela atividade biológica presente na própolis, visando dessa forma um produto com a menor concentração de cera possível (BARRETO *et al.*, 2020). Assim, é de grande interesse da indústria a busca por melhores condições de preservação e de extração de seus compostos bioativos, bem como a busca por tecnologias que garantam a potencial aplicação em novos mercados (DEVEQUINUNES *et al.*, 2018). A Figura 2 ilustra a própolis marrom em sua forma bruta.

Figura 2 - Própolis marrom *in natura*



Fonte: Associação Brasileira de Estudo das Abelhas (2021)

3.3.1 Extração e caracterização dos compostos bioativos da própolis

A extração é definida como uma operação físico-química onde ocorre o fenômeno de transferência de massa, a qual possui grande ênfase nos processos industriais (SCHWARTZBERG; CHAO, 1982). Conforme Dutta (2009), a operação de extração sólido-líquido é uma operação em que ocorre a separação dos componentes solúveis de um material sólido por meio de um solvente. Busca-se, na maioria das vezes, o material solúvel como produto, enquanto que o resíduo sólido é utilizado como subproduto e/ou resíduo do processo. O autor divide o processo de extração S-L em quatro etapas, onde primeiramente ocorre o contato entre o sólido e o solvente e posteriormente acontece a separação do extrato da matriz sólida. Na terceira etapa sucede a separação do solvente do extrato, seguido da purificação do produto, e por

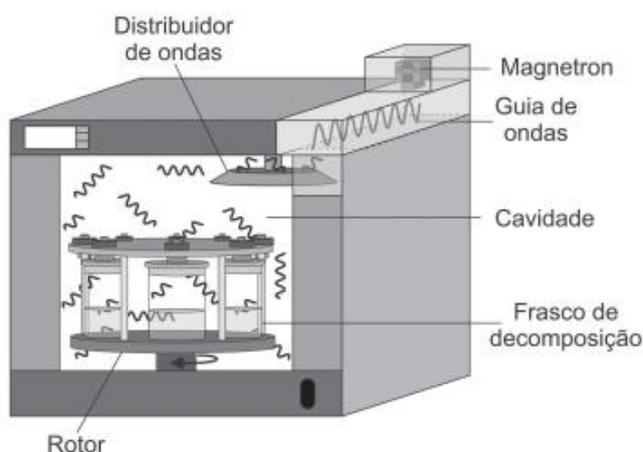
fim, ocorre a recuperação (se desejada) do solvente do sólido. Esse processo é amplamente utilizado em indústrias químicas e indústrias de alimentos, onde é comumente utilizado na extração de óleos vegetais, por exemplo. Para tanto, Dutta (2009) menciona que a extração sólido-líquido envolve diferentes mecanismos físico-químicos, os quais variam dependendo da característica do sólido analisado, como o tamanho da partícula, granulometria e porosidade. Segundo o autor, para uma maior eficiência o material sólido geralmente é quebrado em partículas menores, para que assim ocorra um aumento na taxa de extração. Sendo assim, é de suma importância avaliar as circunstâncias empregadas, onde o tempo, solvente utilizado, temperatura e disposição da matriz sólida são fatores primordiais durante a operação, para que assim se garanta uma maior eficiência na obtenção dos compostos bioativos da matéria prima utilizada.

Neste âmbito, um estudo sobre a influência da temperatura de armazenamento da própolis realizado por Lins (2018) indicou que para a própolis vermelha, houve perda da qualidade dos flavonoides obtidos sob condições de armazenamento em temperatura constante de 10°C por um período de 12 meses, enquanto que para as amostras obtidas a partir da própolis marrom sob as mesmas condições de temperatura e tempo, a qualidade se manteve inalterada, indicando assim uma efetiva condição de armazenamento da própolis marrom para o processo. Assim sendo, estudos acerca das melhores técnicas de extração estão em constante desenvolvimento e são alvos de pesquisas rotineiras. Segundo Pobiega *et al.* (2019), os métodos de extração por maceração à temperatura ambiente eram usualmente utilizados antigamente, entretanto, essa técnica demanda um longo tempo de extração, além de necessitar agitação contínua, porém, por tratar-se de uma técnica economicamente viável, seu uso ainda se faz necessário. Assim, com o avanço da tecnologia e dos estudos sobre as condições ideais, a extração da própolis vem sendo realizada por meio de técnicas mais eficazes que garantem extrações mais rápidas, rendimento mais alto e menor consumo de solventes, como a extração assistida por micro-ondas (MAE), extração por fluidos supercríticos (EFSC) e extração assistida por ultrassom (UAE).

A extração assistida por micro-ondas tem seu funcionamento baseado no aumento da cinética, o qual é provocado pelo aquecimento do solvente utilizado quando em contato com a matriz sólida, conforme mostrado na Figura 3. Esse método se difere dos métodos convencionais pois resulta das mudanças nas estruturas das

partículas causadas pelas ondas eletromagnéticas (VEGGI; MARTINEZ; MEIRELES, 2012). Segundo Delazar *et al.* (2012), por operar em temperaturas e pressões mais altas, essa técnica possui uma gama de vantagens. Dentre elas está a menor utilização da quantidade de solvente durante o processo, menor tempo de extração quando comparado às técnicas tradicionais (como a extração por Soxhlet), maior taxa de extração e menor custo, resultando em uma maior eficiência. A análise reportada por Trusheva, Trunkova e Bankova (2007), trazem um estudo preliminar de diferentes métodos de extração de componentes biologicamente ativos da própolis, e pode-se identificar que a qualidade do extrato obtido é semelhante àquela obtida pelo método de maceração em termos de teor total de flavonoides, porém, a extração por micro-ondas demonstra um maior rendimento no processo.

Figura 3 - Mecanismo de extração assistida por micro-ondas



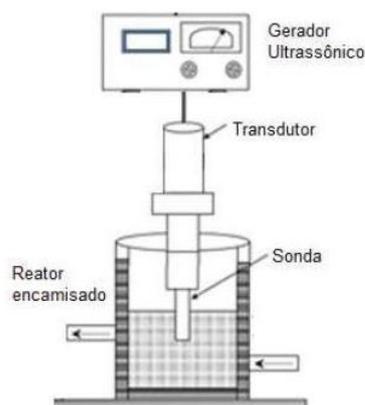
Fonte: Krug (2016)

No que diz respeito a extração por fluidos supercríticos, o material a ser extraído é submetido a um cilindro de base porosa em temperatura e pressão ideal, onde o fluido supercrítico adequado é circulado através do material, onde ocorre a dissociação dos elementos. Após completar o ciclo de extração, a solução é transferida para um separador, onde a pressão é preservada abaixo do ponto crítico. O fluido utilizado é lentamente transformado para o estado gasoso e então, coleta-se o soluto precipitado. O gás gerado pode ser recuperado por meio de um trocador de calor e ser reutilizado (ADOLAR, ALDO; WASICKY, 1997). Estudos utilizando a extração supercrítica para obtenção de componentes da própolis, empregando etanol como solvente, foram desenvolvidos por Devequi-Nunes *et al.* (2018), Di Capua *et al.*

(2018) e Paviani *et al.* (2012), e indicaram uma maior obtenção do conteúdo fenólico obtido quando comparado às técnicas convencionais. Reis *et al.* (2020) estudaram a extração supercrítica dos compostos da própolis vermelha, avaliando suas condições operacionais e caracterização química e obtiveram extratos de alto valor agregado, com elevado poder antioxidante.

Por sua vez, a extração assistida por ultrassom que se caracteriza por ser um método não convencional vem sobressaindo nas pesquisas atuais. Essa técnica fundamenta-se na utilização de ondas mecânicas, as quais são ocasionadas por transdutores que geram mudanças na estrutura do material, levando a uma pressão que rompe o material e libera o composto desejado, aumentando assim a superfície de contato com o solvente, conforme ilustrado na Figura 4. Esse fenômeno aumenta a taxa de transferência de massa, reduzindo o tempo de processamento e consequentemente aumento no rendimento da extração (TAKEUCHI; PEREIRA, 2009). Esse mecanismo além de ser mais eficiente, é passível de ser aprimorado com técnicas que garantam um procedimento ecologicamente correto, visto que segundo Yeo, Leo e Chan (2015), a utilização da água (em combinação com a técnica de ultrassom) como substituinte de solventes considerados tóxicos, é tida como uma opção na obtenção dos compostos bioativos. A preocupação da comunidade científica sobre a geração de resíduos, bem como a reutilização dos mesmos, vem em contrapartida ao desenvolvimento de estratégias sustentáveis que amenizem os efeitos negativos ao meio ambiente, na tentativa da diminuição à geração e ao descarte desses materiais que são muitas vezes prejudiciais não só à natureza, como também aos seres humanos.

Figura 4: Mecanismo de extração assistida por ultrassom



Fonte: FATEB (2017)

Segundo Liang (2015), a extração assistida por ultrassom é o método mais eficaz quando aplicado à extração da própolis, visto que a temperatura envolvida no processo é mais baixa, favorecendo a não degradação dos componentes desejáveis. Em afirmação, Yuan *et al.* (2019) em seu trabalho sobre compostos fenólicos e atividade antioxidante da própolis extraída pela técnica de ultrassom, evidenciaram que os compostos fenólicos obtidos, bem como o conteúdo total de flavonoides e atividade antioxidante *in vitro*, foram maiores do que os resultados atingidos por extração supercrítica. Além disso, Chong e Chua (2020) compararam o rendimento da extração, avaliando compostos como o conteúdo fenólico total e flavonas, utilizando três métodos de extração diferentes: maceração, micro-ondas e ultrassom. Os autores identificaram que a extração ultrassônica teve um rendimento maior quando comparada à extração por maceração e extração assistida por micro-ondas. Ainda, Reis *et al.* (2019) avaliaram o perfil antioxidante e atividade citotóxica de extratos de própolis vermelha de diferentes regiões do nordeste do Brasil obtido por extração convencional e por extração assistida por ultrassom, e concluíram que a extração por ultrassom demonstrou melhores resultados, de forma mais rápida e eficiente.

Nesse sentido, inúmeros estudos acerca das propriedades farmacêuticas de seus compostos (obtidos sob diferentes métodos de extração) vêm sendo desenvolvidos em função das propriedades bioativas, onde suas características antimicrobianas e antioxidantes estão diretamente ligadas à presença de flavonoides (BERNARDO *et al.*, 1990). Pobiega *et al.* (2019) realizaram uma comparação da atividade antimicrobiana de extrato de própolis obtidos por meio de diversos métodos de extração, indicando compostos ricos em flavonoides e fenóis, onde todos os extratos analisados evidenciaram ação antimicrobiana frente às cepas *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Colletotrichum gloeosporioides* e *Mucor mucedo*, além de mostrar maior efetividade na obtenção dos compostos através da extração assistida por ultrassom em comparação às outras técnicas empregadas.

Além disso, propriedades antioxidantes, antimicrobianas, antiparasitárias e citotóxicas de extratos de própolis marrom, verde e vermelho de diferentes regiões do Brasil foram reportados por Silva *et al.* (2017), onde a maioria dos extratos demonstrou atividade antimicrobiana contra a bactéria *Staphylococcus aureus*, além de indicar grande potencial antioxidante e citotóxico exercido pela própolis vermelha. Zabaiou *et al.* (2017) mencionaram que o uso da própolis como adjuvante na terapia do câncer

demonstrou potencializar os quimioterápicos, além de aliviar os efeitos colaterais. Machado *et al.* (2016) evidenciaram além da atividade antioxidante e antimicrobiana, o eventual poder antitumoral dos própolis verde, vermelho e marrom de diferentes regiões brasileiras, onde os extratos obtidos por meio da extração etanólica foram mais eficientes na obtenção de compostos antioxidantes e atividade biológica, quando comparado aos extratos obtidos por meio da técnica de fluido supercrítico.

Souza (2013) obteve o extrato da própolis vermelha utilizando o método da maceração para aplicação em membranas bioativas e pode analisar resultados favoráveis quando aplicado para cicatrização de feridas. Estudos desenvolvidos por Simões, de Araújo e de Araújo (2008) indicam ainda a ação antimicrobiana de extratos de própolis frente aos micro-organismos presentes na saliva humana. Pinto *et al.* (2001) analisaram os efeitos de extrato de própolis verde sobre bactérias patogênicas isoladas do leite de vacas com mastite e detectaram o efeito antibacteriano por meio de extratos etanoicos desenvolvidos, comprovando assim a efetiva ação da própolis sob diferentes condições.

Salienta-se que estudos acerca das melhores condições de obtenção dos compostos bioativos da própolis os quais avaliam parâmetros como pH, tipo de solvente empregado, temperatura de armazenamento, época de coleta e região de coleta da matéria-prima, temperatura de extração, tempo de extração e método de extração estão em constante desenvolvimento. De forma afirmativa, Yeo, Leo e Chan (2015), estudaram a extração ultrassônica da própolis em diferentes valores de pH e concentrações diferentes de solvente e puderam constatar que sob as condições analisadas, os melhores resultados foram aqueles submetidos ao solvente de pH 10, como também Yang *et al.* (2007), que avaliaram a atividade antibacteriana do extrato etanólico de própolis contra *Streptococcus mutans*, influenciado pela temperatura, pH e idade celular, indicando maior efetividade em meios de cultivo mais quentes (37°C).

Por isso, esses parâmetros são variáveis importantes que modificam o rendimento final do extrato, ocasionando na variação do potencial biológico existente. Logo, o desenvolvimento de produtos que contenham o extrato de interesse é, em sua maioria, caracterizado conforme seu potencial ativo.

3.3.2 Filmes ativos contendo própolis

O Quadro 1 expõe alguns estudos que envolvem a incorporação do extrato de própolis em matrizes biopoliméricas, os quais foram discutidos e comparados em relação ao trabalho apresentado.

Quadro 1 – Pesquisas já desenvolvidas envolvendo filmes incorporados com extrato de própolis

(continua)

Autor	Estudo	Resultados
Ardjoum <i>et al.</i> (2021)	Filmes antimicrobianos à base de ácido láctico incorporado com óleo essencial de <i>Thymus vulgaris</i> e extrato etanólico de própolis mediterrânea	Alta prop. antimicrobiana com diâmetro da zona de inibição de 12,1 e 11,58 mm contra <i>S. aureus</i> e <i>Penicillium sp.</i> , respectivamente. Melhoria da estabilidade térmica dos filmes com adição dos extratos.
Bodini <i>et al.</i> (2013)	Propriedades de filmes baseados em gelatina com adição de extrato de própolis	Redução da tensão de ruptura e PVA, quando comparada com os filmes controle. Atividade contra <i>S. aureus</i> observada. Os filmes mantiveram a atividade antimicrobiana e concentração de polifenóis por 177 dias de armazenamento.
Chang-Bravo; López-Córdoba e Martino (2014)	Matrizes biopoliméricas de carragenana e amido de milho com extratos antioxidantes de própolis vermelha cubana e erva-mate	Os filmes de própolis apresentaram maior alongamento na ruptura (%) e menores valores de resistência à tração e módulos elásticos em comparação com as amostras controle. Esse comportamento pode ser atribuído à forte interação entre o extrato de própolis e a matriz polimérica observada pela análise de FTIR.
Correa-Pacheco <i>et al.</i> (2019)	Caracterização físico-química e atividade antimicrobiana de filmes comestíveis nano particulados de quitosana incorporados com extrato etanólico de própolis	As formulações contendo própolis tiveram um forte efeito inibitório sobre <i>L. monocytogenes</i> e <i>E. coli</i> . Comportamento hidrofílico foi observado na formulação contendo apenas quitosana, enquanto o comportamento hidrofóbico foi observado na formulação com nanopartículas de quitosana e extrato etanólico de própolis em concentrações de 10 e 30%.

Quadro 1 – Pesquisas já desenvolvidas envolvendo filmes incorporados com extrato de própolis

(conclusão)

De Araújo <i>et al.</i> (2015)	Propriedades físicas, antimicrobianas e antioxidantes de filme à base de amido contendo extrato etanólico de própolis	Resistência à tração não foi afetada pela presença do extrato quando comparada ao controle. Mudanças nas prop. de sorção de umidade foram detectadas por um caráter ligeiramente hidrofóbico quando adicionadas de 1% de extrato. Os filmes exibiram atividade antimicrobiana contra <i>S. aureus</i> e <i>E. coli</i> mesmo em baixas concentrações de extrato (0,5%).
Pérez-Vergara <i>et al.</i> (2020)	Desenvolvimento e caracterização de filmes comestíveis à base de fécula de mandioca nativa, cera de abelha e própolis	Maiores concentrações de cera de abelha produziram filmes com os menores valores de PVA e teor de umidade. Um aumento no teor de extrato reduziu a luminosidade, produzindo filmes opacos e amarelos. Atividade antifúngica contra <i>Aspergillus niger</i> foi detectada. Os filmes podem ser utilizados como revestimentos para produtos frescos, como frutas e vegetais não ácidos.

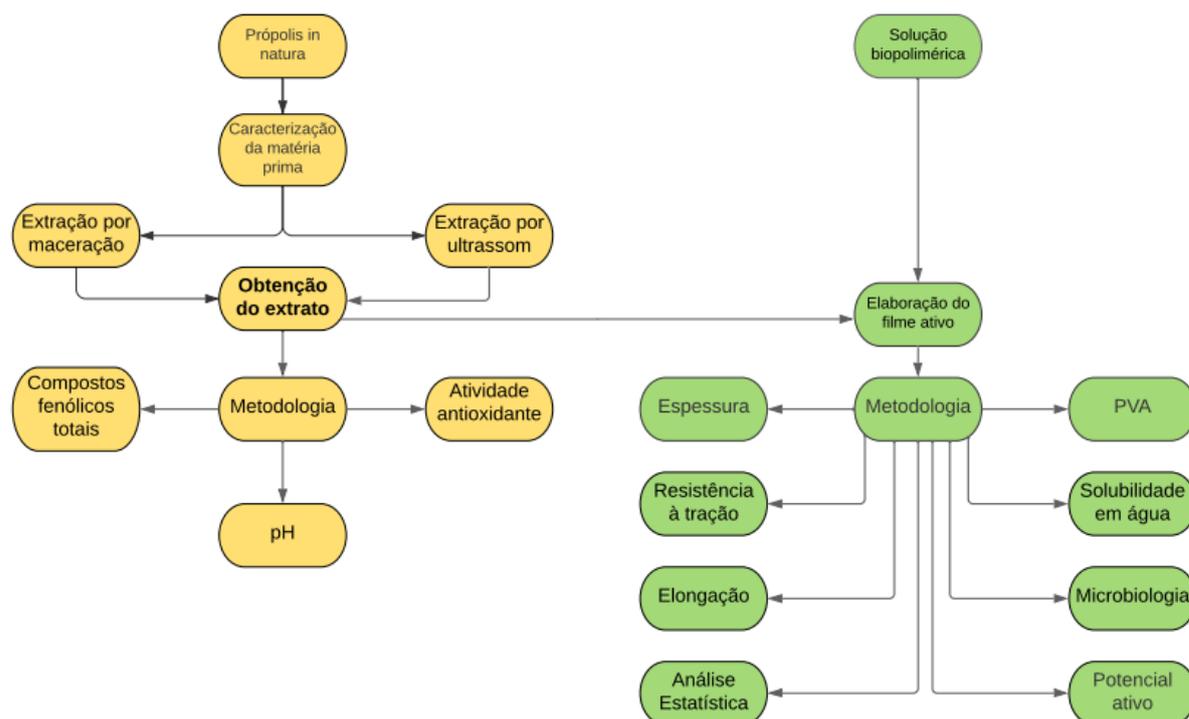
Fonte: Autora (2022)

Conforme exposto no quadro acima, os estudos acerca dos filmes biopoliméricos incorporados com extrato de própolis afirmam o que foi evidenciado na literatura, indicando a potencial ação antimicrobiana frente às cepas analisadas, bem como a notória atividade antifúngica desenvolvida. Entretanto, é possível observar que não foram desenvolvidos filmes utilizando somente a carragenana como material biopolimérico, bem como foram utilizados apenas extratos etanólicos da própolis, constatando a possível opção do desenvolvimento de extratos advindos de solventes mais econômicos e menos agressivos, como a água, por exemplo.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

O presente trabalho foi desenvolvido com base no fluxograma esquematizado abaixo.

Figura 5 - Etapas envolvidas no desenvolvimento do trabalho



Fonte: Autora (2022)

4.1 Preparo da matéria-prima

A própolis marrom produzida por abelhas da espécie *Apis mellifera* foi obtida de apiários localizados no interior do município de Bagé, Rio Grande do Sul. A matéria-prima, que foi disponibilizada pelo apicultor em sua forma seca, foi coletada e realizada a eliminação manualmente das impurezas. Posteriormente, a mesma foi acondicionada em recipientes plásticos vedados, os quais foram colocados em dessecador ao abrigo da luz até o momento de sua utilização. Ainda, de forma a reduzir a granulometria da matéria-prima, a própolis foi moída utilizando um moinho analítico (IKA - A11BS32), tornando-a assim em um pó fino, o que garantiu uma maior área de contato entre as partículas, ocasionando em um maior arraste de componentes no momento do contato com o solvente extrator e consequentemente

em um melhor resultado no momento da obtenção dos compostos bioativos (ROJAS, 2015). A Figura 6 ilustra a matéria-prima utilizada na sua forma *in natura* e moída.

Figura 6 - Própolis bruta *in natura* (1) e própolis moída (2)



Fonte: Autora (2022)

4.2 Caracterização da matéria-prima

A caracterização da matéria-prima foi realizada a fim de avaliar a da qualidade da própolis marrom bruta.

4.2.1 Teor de umidade

A fim de analisar o teor de umidade da matéria bruta pelo método gravimétrico, 1 g da amostra moída foi inserida em estufa (NOVA ÉTICA) a 105 °C pelo período de 24 h (Farmacopeia Brasileira, 2019). O percentual de umidade em base úmida foi definido pela perda de água, através da Equação 1, realizado em triplicata.

$$\% \text{ Umidade} = \frac{m_i - m_f}{m_i} \times 100 \quad (1)$$

em que m_i é a massa inicial da amostra (g) e m_f é a massa da amostra após a secagem (g).

4.2.2 Teor de cinzas

A determinação do teor de cinzas foi realizada pelo método gravimétrico utilizando 1 g de amostra, em triplicata. As amostras foram submetidas ao processo de incineração utilizando mufla (TC4S - AUTONICS) à temperatura de 550 °C pelo tempo necessário onde a diferença entre duas pesagens consecutivas não excedeu 5 mg (AOAC, 1995 com alterações). O resultado foi obtido (Equação 2) ao incinerar a própolis, eliminando assim toda a matéria orgânica, resultando apenas na matéria de origem mineral existente na amostra.

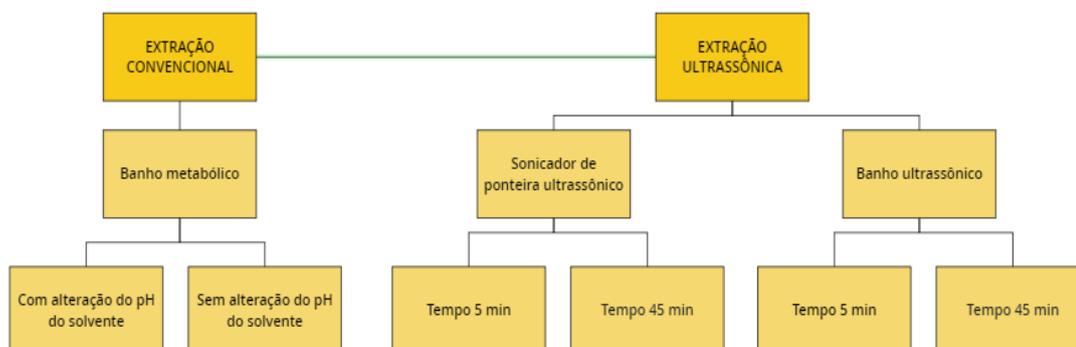
$$\% \text{ Cinzas} = \frac{m_2 - m_1}{W} \times 100 \quad (2)$$

em que m_1 é a massa do cadinho utilizado (g), m_2 é a massa do cadinho + amostra calcinada a 550 °C (g) e W é a massa da amostra (g).

4.3 Extração dos compostos bioativos

A extração dos compostos bioativos da própolis marrom foi realizada utilizando dois métodos, a fim de avaliar seus resultados: maceração e extração assistida por ultrassom. Visando uma extração “verde” não tóxica, foi utilizada água como solvente, a fim de comparar com o uso do solvente etanólico convencional, composto por etanol 80%. O fluxograma exemplificado na Figura 7 abaixo ilustra os processos de extração que foram realizados.

Figura 7 - Operações realizadas



Fonte: Autora (2022)

A Figura 8 ilustra os equipamentos utilizados para estudo da operação de extração dos compostos bioativos. A extração convencional (maceração) foi realizada em banho metabólico tipo *Dubnoff* (SL 157 – SOLAB). Por sua vez, para o método de ultrassom, foram utilizados dois equipamentos diferentes, que partem do mesmo princípio de utilização das ondas ultrassônicas: sonicador de ponteira ultrassônico (ULTRONIC QR 500 - ECOSONICS) e banho ultrassônico (ALTRONIC CLEAN 3IA), com o objetivo de comparar os resultados obtidos. Para a extração por intermédio do sonicador, o ajuste de potência foi de 99% em uma frequência ultrassônica de 20 kHz. Para eliminação de ceras e impurezas presentes no extrato após a extração, foi feita a filtração à vácuo do extrato com o auxílio de uma bomba (NEW PUMP) utilizando um funil de *Büchner* e *Kitassato*. O extrato final foi armazenado em recipiente fechado até posteriores análises.

Figura 8 - Equipamentos extratores utilizados



Fonte: Autora; Google Imagens (2022)

Visando estudar as diferentes formas de extração e seus impactos frente às análises das quais os extratos foram submetidos, diversos ensaios foram realizados conforme as técnicas já citadas e suas formas de extração foram listadas na Tabela 1 a seguir. Salienta-se que em todos os casos foram utilizados dois solventes diferentes, água e etanol 80%, variando os parâmetros tempo, pH e temperatura a fim de avaliar suas possíveis influências no processo.

Tabela 1 - Ensaios realizados frente as técnicas de extração

Método	Sigla	Equipamento	Tempo (min)	Temperatura (°C)	Massa de amostra (g)	Volume de solvente (mL)
Convencional sem alteração de pH	A	Banho metabólico	45	70	2	25
Convencional com alteração de pH (meio ácido)*	B	Banho metabólico	45	70	1	25
Convencional com alteração de pH (meio básico)**	C	Banho metabólico	45	70	1	25
Sonicador de ponteira ultrassônico	D	Sonicador de ponteira ultrassônico	5	ambiente	2	50
Sonicador de ponteira ultrassônico	E	Sonicador de ponteira ultrassônico	45	ambiente	2	50
Banho ultrassônico	F	Banho ultrassônico	5	ambiente	2	50
Banho ultrassônico	G	Banho ultrassônico	45	ambiente	2	50

*Meio ácido: HCl 0,1 N, pH 4; ** Meio básico: NaOH 0,1 mol.L⁻¹, pH 10; as mudanças de pH foram realizadas apenas para o solvente aquoso utilizando a técnica convencional

Fonte: Autora (2022)

4.4 Caracterização do extrato obtido

4.4.1 pH

As leituras de medição do potencial hidrogeniônico do extrato foram realizadas em pHmetro digital (T100- TEKNA) (Farmacopeia Brasileira, 2019). Primeiramente foi realizada a calibração do pHmetro e após, foram executadas as leituras dos extratos obtidos por meio do banho ultrassônico em meio aquoso e etanólico, respectivamente. Salienta-se que foi possível realizar apenas as leituras dos extratos aquoso e etanólico obtidos por meio da utilização do banho ultrassônico por motivos de falhas no equipamento de medição.

4.4.2 Compostos fenólicos totais

Para determinação dos compostos fenólicos totais (CFT), foi adotada a metodologia descrita por Singleton e Rossi (1965). O método é realizado por espectrofotometria, utilizando o reagente Folin-Ciocalteu, onde ocorre uma reação colorimétrica de oxidação/redução. Para tanto, foi utilizado 0,5 mL das amostras do extrato obtido e 10 mL de água destilada, que foram acrescidos de 1 mL do reagente em um tubo de ensaio. Após 3 min foram adicionados 8 mL de solução de Na₂CO₃ (7,5% m/v), mantendo as amostras sem presença de luz por um período de 2 h em temperatura ambiente. A absorbância foi determinada no comprimento de onda de 760 nm por meio do espectrofotômetro (UV 755B – EQUILAM). Para a quantificação, foi feita uma curva de calibração, utilizando ácido gálico em concentrações de 0 a 500 mg/L e o resultado foi expresso em mg de GAE.g⁻¹. Da mesma forma descrita para análise da atividade antioxidante abaixo, as análises foram realizadas em triplicata para todos os extratos obtidos em suas diferentes formas de obtenção.

4.4.3 Atividade antioxidante

A atividade antioxidante foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Brand-Willians *et al.* (1995), a qual consiste na desativação do radical livre DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila). Dessa forma, foi inserido 0,2 mL das soluções dos extratos obtidos em tubos falcons e adicionado de 7,8 mL da solução de DPPH. A solução obtida foi mantida por 30 min ao abrigo da luz e a medida de absorbância foi lida em espectrofotômetro (UV 755B - EQUILAM) no comprimento de onda do UV-visível a 517 nm. Ainda, foi preparado uma amostra controle através da substituição do extrato pelo solvente utilizado. As análises foram realizadas em triplicata para todos os extratos obtidos em suas diferentes formas de obtenção.

4.5 Elaboração do filme biopolimérico ativo

O filme foi desenvolvido através da técnica de *casting*, que consiste na desidratação de uma solução filmogênica aplicada sobre placas de *Petri* (neste caso de material acrílico de 15 cm de diâmetro). A solução filmogênica foi obtida usando agitação de 100 rpm e temperatura de 70 °C por 15 min. A mistura ocorreu por intermédio de um agitador magnético (NOVA ÉTICA), até completa homogeneidade. As soluções foram vertidas nas placas e inseridas em estufa à 40 °C por 24 h para eliminação do solvente, resultando no filme biopolimérico ativo. Os extratos de própolis com melhores propriedades (conforme resultados da seção 4.4) foram utilizados como princípio ativo na formulação dos filmes. Foram elaboradas duas formulações de filmes diferentes, uma contendo extrato aquoso e uma contendo extrato etanólico. Os filmes foram submetidos à diferentes concentrações de seus componentes, onde foram formulados e avaliados quanto às suas melhores condições, sendo confirmados os valores de formulação de 0,5 g de carragenana (kappa-carragenana), 75 mL de solvente (água destilada) e 0,3 g de glicerol. As concentrações de extrato líquido variaram entre 5, 10, 15 e 25 mL, sendo escolhido o valor de 15 mL de extrato para execução final dos filmes, onde o mesmo foi incorporado ao filme logo após sua extração. Também foram formulados filmes controles, isentos de extrato nesse caso. Após a realização da secagem, os filmes foram acondicionados em dessecador contendo solução de ácido sulfúrico, para manter a umidade relativa em 50% no interior do mesmo.

4.6 Caracterização do filme biopolimérico ativo

4.6.1 Espessura

A espessura foi determinada por intermédio de um micrômetro digital (TA.XT - EXTRALAB) onde o resultado foi expresso em milímetros. Foram medidos dez pontos aleatoriamente, considerando a espessura do filme como a média dos valores obtidos.

4.6.2 Propriedades mecânicas

A fim de avaliar as propriedades mecânicas do filme, foi determinado com o auxílio de um texturômetro (STABLE 203 - MICRO SYSTEM), conforme a Figura 9, a resistência à tração e a porcentagem de alongação no momento de ruptura, conforme descrito na Norma ASTM D-882-02 (2002). A tensão na ruptura foi calculada pela relação entre força e área da seção transversal inicial do filme (Equação 3), enquanto que a porcentagem de alongação foi determinada por meio da Equação 4.

$$T = \frac{Fm}{Amín} \quad (3)$$

em que T é a tensão máxima relacionada à tração (Pa), Fm é a força máxima que antecede o momento de ruptura (N) e $Amín$ é a área da seção transversal inicial do filme (m²).

$$\%Elongação = \frac{dr}{di} \times 100 \quad (4)$$

em que dr é a distância na ruptura percorrida pela garra (m) e di é o afastamento inicial entre garras (m).

Figura 9 - Análise das propriedades mecânicas através do texturômetro



Fonte: Autora (2022)

4.6.3 Permeabilidade ao vapor de água

A análise de permeabilidade ao vapor de água, disposta na Figura 10, foi conduzida conforme o método padrão ASTM E0096-00 (2016), em duplicata. Conforme executado por Ribeiro *et al.* (2015), as amostras foram cortadas em forma de discos de diâmetro 50 mm e fixadas em células de permeação de plástico contendo aproximadamente 2,3 g de cloreto de cálcio anidro (CaCl_2) granulado, onde posteriormente foram acondicionadas em um dessecador com umidade relativa de 50% e temperatura ambiente. A partir do ganho de massa do CaCl_2 durante 10 dias, foi possível determinar o vapor de água transferido através do filme por intermédio da Equação 5.

$$PVA = \frac{m_{ab}}{t} \frac{L}{\Delta P} \quad (5)$$

em que PVA é a permeabilidade ao vapor de água ($\text{g} \cdot \text{m}^{-1} \cdot \text{Pa}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$), m_{ab} é a massa de umidade absorvida (g), t é o tempo total do teste (segundos), L é a espessura do filme

(mm), A é a área da superfície exposta do filme (m^2) e ΔP é a diferença de pressão parcial através do filme (Pa).

Figura 10 - Análise de permeabilidade ao vapor de água



Fonte: Autora (2022)

4.6.4 Solubilidade em água

A solubilidade dos filmes em água foi avaliada segundo a metodologia de Gontard *et al.* (1994). Os filmes foram cortados em círculos de aproximadamente 2 cm de diâmetro e foram colocados em estufa (105 °C) pelo período de 24 h, a fim de determinar a matéria seca inicial. Posteriormente, foram colocados em béquer contendo 50 mL de água destilada, onde foram mantidos à temperatura ambiente por 24 h, sob agitação (100 rpm). Em seguida, as amostras não solubilizadas foram inseridas novamente na estufa (105 °C) por 24 h, com a finalidade de obter a matéria seca final. A Equação 6 expressa o cálculo para obtenção do resultado.

$$SA (\%) = \frac{m_i - m_f}{m_i} \times 100 \quad (6)$$

em que SA indica a solubilidade em água (%), m_i é a massa da matéria seca inicial (g) e m_f é a massa da matéria seca final (g).

4.6.5 Potencial ativo

Para determinação da atividade antioxidante bem como a determinação do teor de compostos fenólicos totais, uma amostra do filme precisou ser solubilizada. Para tanto, de acordo com Rosa *et al.* (2020), amostras dos filmes foram imersas em 25 mL de água destilada e submetidas a agitação contínua até completa solubilização. Após, solubilizadas, as amostras passaram pelas mesmas metodologias realizadas para os extratos, já descritas anteriormente nas seções 4.4.2 e 4.4.3.

4.6.6 Análise microbiológica

A análise microbiológica do filme obtido foi avaliada frente ao microrganismo *Escherichia coli*, representando o grupo de bactérias Gram-negativas, e frente ao microrganismo *Staphylococcus aureus*, representando o grupo de bactérias Gram-positivas. As cepas foram provenientes do Laboratório de Microbiologia da Universidade Federal do Pampa, campus Bagé. Foi avaliado o potencial antimicrobiano dos filmes utilizando a Norma M7-A6 (*Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard - Sixth Edition*, 2003). Para execução da análise, uma alíquota de 0,1 mL de cultura microbiana (*Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*) foi padronizada com $1-2 \times 10^8$ unidades formadoras de colônia (UFC)/mL de acordo com a escala *Mac Farland* e então diluídos para a concentração de 1×10^4 UFC/mL, onde foram posteriormente inoculadas sobre placas compostas de ágar *Mueller Hinton* para que o desenvolvimento microbiano ocorresse. Após solidificação do ágar, foram adicionados em triplicata os filmes desenvolvidos (cortados em 6 mm de diâmetro), para atuarem como barreira antimicrobiana. As placas foram incubadas a 35 °C por 24 h e a inibição foi considerada positiva quando halos compostos por uma zona clara foram observados. Os halos de inibição foram medidos com auxílio de um paquímetro digital. Salienta-se que todo o procedimento da análise se desenvolveu sob condições assépticas.

4.6.7 Análise estatística

Os resultados foram tratados em triplicata por meio do Teste de *Tukey* a 5% ($p < 0,05$) de probabilidade, empregando o *software* Statistica 13.0.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização da matéria-prima

Os resultados para os teores de umidade e de cinzas obtidos no presente trabalho estão dispostos na Tabela 2.

Tabela 2: Resultados da caracterização da própolis bruta

Requisitos físico-químicos	Autora (2022)	Limites estabelecidos pela Legislação Brasileira (m/m) (%)
Umidade (% b.u.)	4,30 ± 0,12	8
Cinzas (% b.u.)	0,54 ± 0,02	5

Fonte: Autora (2022)

O controle do teor de umidade da própolis é um fator determinante que deve ser assegurado, visto que elevados teores de umidade podem favorecer no desenvolvimento de fungos e bactérias, tornando o produto impróprio para utilização e/ou comercialização (BRASIL, 2001). Dessa forma, a própolis analisada demonstrou possuir teores de umidade ($4,30 \pm 0,12\%$ b.u.) dentro do limite estabelecido pelo MAPA (8%). Seguindo os mesmos princípios, o controle das cinzas as quais representam a quantificação da matéria de origem mineral da amostra é um importante parâmetro a ser analisado, onde elevados teores incubem em adulterações do produto, o qual pode estar adicionado de areia ou outros materiais contaminantes. Como observado, o resultado alcançado ($0,54 \pm 0,02\%$ b.u.) expressou estar dentro do limite estabelecido (5%), conferindo qualidade satisfatória à amostra coletada.

5.2 Extração dos compostos bioativos e caracterização dos extratos

A Figura 11 ilustra os extratos obtidos via extração convencional com água e com etanol, sem alteração de pH do meio extrator.

Figura 11 - Extratos obtidos por meio da extração convencional (método A) com água (A1 e A2) e etanol (B1 e B2)



Fonte: Autora (2022)

Observa-se que os extratos A1 e A2 que foram extraídos utilizando água como solvente demonstram ter uma coloração mais opaca quando comparado aos extratos B1 e B2, os quais foram obtidos utilizando etanol 80% como solvente extrator. O mesmo foi evidenciado por Pérez-Vergara *et al.* (2020), exposto no Quadro 1, onde os filmes com maior concentração de extrato apresentaram uma coloração amarela opaca. Um dos motivos está relacionado com o fato de que o etanol apresenta caráter anfifílico, permitindo a extração tanto de substâncias com características apolares quanto polares, tendo a capacidade de arrastar os compostos fitoquímicos presentes na própolis em sua totalidade, como os flavonoides e ácidos fenólicos por exemplo, resultando em um extrato mais concentrado, de odor e sabor mais forte (OLIVEIRA *et al.*, 2016). O mesmo não ocorre com a água, visto que muito dos compostos bioativos presentes na própolis são de características apolares devido à presença das resinas em sua composição. Esse comportamento de variância na coloração dos extratos também foi observado nos casos obtidos via extração convencional com alteração de pH, bem como nos extratos atingidos utilizando as extrações ultrassônicas. A Figura 12 ilustra o extrato (F), obtido utilizando banho ultrassônico.

Figura 12 - Extrato etanólico (F) via banho ultrassônico



Fonte: Autora (2022)

O pH do extrato aquoso obtido por meio da extração (F) utilizando banho ultrassônico foi de 5,89, enquanto que para o extrato etanólico foi de 5,19. O valor encontrado para o extrato etanólico foi próximo ao reportado por Longhini *et al.* (2007), que encontraram um valor que variou de 5,46 à 5,82, sendo a extração realizada utilizando álcool 93,7%. Segundo os autores, o controle do pH é um fator fundamental no manuseio da própolis, visto que ele é, também, responsável por selecionar as substâncias a serem extraídas conforme sua polaridade e características químicas. Tem-se que o pH mais ácido é desejado, uma vez que atua de forma a evitar o ataque de microrganismos, por exemplo. Quando comparado o pH do etanol 80%, que costuma ser neutro, ao pH do extrato etanólico da própolis, percebe-se uma diminuição do pH, evidenciando o caráter ácido das substâncias extraídas. Pereira (2008) realizou a extração aquosa de própolis para uso em suco de goiaba e obteve valores de pH que variaram de 4,7 a 4,9. Ainda, Lins (2018) analisou os extratos obtidos da própolis marrom e evidenciou um valor de 3,2 sob meio etílico e 3,1 sob meio aquoso, destacando através de seus dados que o pH pode ser influenciado pela temperatura de armazenamento dos extratos. A Tabela 3 apresenta os resultados das extrações realizadas aos compostos fenólicos totais e atividade antioxidante dos extratos obtidos.

Tabela 3: Resultados obtidos pelas análises dos extratos utilizando água como solvente

Método	CFT (mg GAE.g ⁻¹ b.s.)	AA (%)
A	9,45 ± 1,05 ^b	37,04 ± 1,19 ^a
B	10,64 ± 0,06 ^b	13,38 ± 1,85 ^d
C	11,84 ± 0,14 ^b	25,65 ± 0,93 ^b
D	16,29 ± 0,81 ^a	12,34 ± 3,70 ^{ed}
E	15,73 ± 3,14 ^a	20,32 ± 2,60 ^c
F	2,40 ± 0,03 ^c	7,34 ± 0,12 ^e
G	2,85 ± 0,05 ^c	8,75 ± 0,15 ^{ed}

Nota: Os dados relatados são valores médios e ± desvio médio. Letras diferentes representam diferenças significativas na coluna (p<0,05) pelo teste de Tukey

Fonte: Autora (2022)

Conforme reportado na Tabela 3, os métodos utilizando o sonicador de ponteira ultrassônico (D e E) foram os que demonstraram ser mais eficiente na extração

aquosa quanto à análise dos compostos fenólicos totais, não havendo diferença significativa entre os resultados ($16,29 \pm 0,81^a$ e $15,73 \pm 3,14^a$ mg GAE.g⁻¹ b.s.), confirmando a efetividade do processo de extração utilizado frente à extração convencional. O resultado encontrado foi maior ao obtido por Alves e Kubota *et al.* (2013) que obtiveram $5,39 \pm 1,51$ mg GAE.g⁻¹ em extratos aquosos comerciais, bem como Mello *et al.* (2010) que tiveram como resultado o valor de $7,51 \pm 1,61$ mg GAE.g⁻¹ em amostras de própolis vermelha obtidas por nano filtração, ou ainda, menores aos de Mello, Petrus e Hubinger (2010) que obtiveram $23,67 \pm 2,14$ mg GAE.g⁻¹ em extratos aquosos obtidos por maceração. Observa-se que neste caso um maior tempo e temperatura de extração não influenciou significativamente ($p < 0,05$) na eficiência da extração. Por sua vez, quanto à atividade antioxidante, o método convencional (A) foi o que demonstrou os melhores resultados ($37,04 \pm 1,19^a$ %), valor inferior ao encontrado por Alves e Kubota (2013), que reportaram um valor de $89,31 \pm 0,60$ %. Neste caso, a temperatura mais elevada favoreceu o processo.

Comparando o desempenho da extração para compostos fenólicos totais e atividade antioxidante, pôde-se concluir que de forma geral, o método utilizando o sonificador de ponteira ultrassônico (D) foi o mais eficiente, levando em conta a não necessidade da elevação da temperatura, bem como a utilização de um menor período de tempo de extração. Conforme De Lima *et al.* (2019), as extrações devem ser feitas de forma controlada, visto que elevadas temperaturas combinadas com longas horas de extração favorecem a degradação da amostra, resultando em um menor rendimento na obtenção dos compostos bioativos. A Tabela 4 traz os resultados frente à técnica utilizando etanol 80% como solvente extrator.

Tabela 4 - Resultados obtidos pelas análises dos extratos utilizando etanol 80% como solvente

Método	CFT (mg GAE.g ⁻¹ b.s.)	AA (%)
A	63,08 ± 2,41 ^d	94,22 ± 0,13 ^a
B	-	-
C	-	-
D	77,63 ± 1,36 ^c	94,28 ± 0,43 ^a
E	91,03 ± 4,65 ^b	92,91 ± 0,31 ^b
F	143,38 ± 2,77 ^a	93,74 ± 0,09 ^b
G	147,45 ± 4,23 ^a	93,41 ± 0,09 ^b

Nota: Os dados relatados são valores médios e ± desvio médio. Letras diferentes representam diferenças significativas na coluna (p<0,05) pelo teste de Tukey
 Fonte: Autora (2022)

De acordo com a Tabela 4 acima, os métodos F e G (extração via banho ultrassônico) foram os métodos mais efetivos para obtenção de compostos fenólicos totais, sendo estes 143,38 ± 2,77^a e 147,45 ± 4,23^a mg GAE.g⁻¹, respectivamente. O valor alcançado em 45 minutos foi muito próximo ao alcançado com o mesmo método utilizando um tempo de extração menor (5 min), que foi de 143,38 ± 2,77 mg GAE.g⁻¹. Dessa forma, observa-se pela análise estatística que o tempo de extração não foi um fator determinante, podendo favorecer dessa forma uma extração mais rápida sob as mesmas condições. Quanto à atividade antioxidante, todos os métodos atingiram uma porcentagem entre 92 e 95%, havendo pouca variância entre os resultados, sendo que não houveram diferenças significativas entre os métodos A e D, bem como entre os métodos E, F e G. De forma geral, pode-se constatar que o método F foi o mais efetivo quando comparado aos outros métodos para o processo de extração utilizando etanol 80% como solvente, resultando em 143,38 ± 2,77^a mg GAE.g⁻¹ e 93,74 ± 0,09^b % para compostos fenólicos totais e atividade antioxidante, respectivamente. Averigua-se que para esse caso, a extração utilizando a técnica de ondas ultrassônicas foi superior à extração convencional, demonstrando ser uma técnica de extração rápida, que quando comparada, oferece alta reprodutibilidade em pouco tempo, manipulação simplificada e menor energia. Os valores encontrados durante as análises para compostos fenólicos totais foram maiores que aqueles mencionados por Khacha-ananda *et al.* (2013), que realizaram análises de extratos de própolis marrom obtidos por meio da utilização de etanol 70%, utilizando as

técnicas de maceração e sonificador de ponteira ultrassônico. Khacha-ananda *et al.* (2013) reportaram $17,17 \pm 2,19$ mg GAE.g⁻¹ por meio da técnica de maceração e $18,27 \pm 3,30$ mg GAE.g⁻¹ para a técnica utilizando o sonificador. Em contrapartida, Devequi-Nunes *et al.* (2018) analisaram a atividade biológica de seis extratos de própolis diferentes, dentre eles a própolis marrom, utilizando etanol 80% como solvente através da técnica de maceração, e puderam constatar $249,28 \pm 0,01$ mg GAE.g⁻¹ para compostos fenólicos totais, valor superior ao encontrado no presente estudo. Ainda, Mello, Petrus e Hubinger (2010) obtiveram extrato etanólico (80%) de própolis utilizando também a técnica de maceração e determinaram os compostos fenólicos totais, sendo estes $69,35 \pm 0,38$ mg GAE.g⁻¹, valor que foi próximo ao encontrado no trabalho estudado. No que se refere à atividade antioxidante, Gonçalves, Santos e Srebernich (2011) realizaram a extração da própolis verde de forma convencional utilizando etanol 70% e analisaram um efeito antioxidante de 60,93%, valor inferior quando comparado a todos os resultados encontrados nas mais diversas extrações realizadas apresentadas na Tabela 4. Cabral *et al.* (2009) analisaram a atividade antioxidante da própolis vermelha brasileira e encontraram um teor de 50,5% no extrato obtido utilizando etanol 80% como solvente. Ainda, Alves e Kubota (2013) observaram a ação antioxidante de amostras de própolis comerciais, dentre eles amostras de extrato etanólico, e identificaram teores que variaram entre $80,55 \pm 0,76\%$ a $92,56 \pm 0,08\%$, valores esses similares aos reportados na Tabela 4.

Os compostos fenólicos são estruturas químicas que apresentam hidroxilas e anéis aromáticos que os conferem o poder antioxidante (ANGELO, 2007). O DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) é um radical livre que pode ser alcançado por dissolução do reagente em meio orgânico, mudando da cor violeta para amarelo após a redução por qualquer processo de hidrogênio. As substâncias capazes de realizar esta reação podem ser consideradas como antioxidantes e conseqüentemente captadores de radicais (BRAND-WILLIAMS, 1995; BRANEN, 1975). Segundo Gonçalves, Santos e Srebernich (2011), a origem de a amostra tem um impacto direto nas concentrações dos compostos bioativos, onde a atividade antioxidante pode variar de acordo sua concentração, seu método de avaliação, como tempo de reação e solvente, e afinidade dos antioxidantes. A grande vantagem do ensaio DPPH é que os resultados não são afetados pela polaridade dos compostos. Conforme citam Alves e Kubota (2013), a presença da ação antioxidante acentuada na própolis está diretamente ligada com o fato de possuir flavonoides em sua composição, como a quercetina,

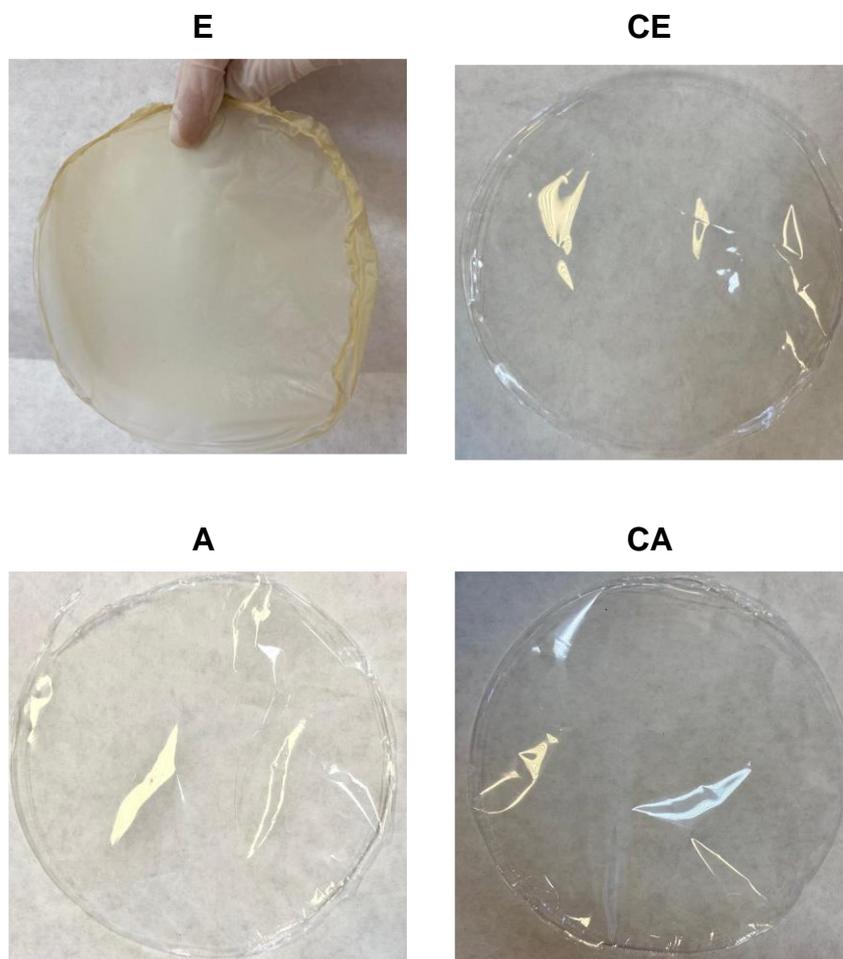
flavonas e antocianinas, onde a quercetina atua como um bom sequestrante de radical livre, não permitindo a ação de espécies reativas de oxigênio, agindo assim de forma não oxidativa. Sendo assim, conforme assegurado pelas análises, torna-se imprescindível a busca e o desenvolvimento por produtos naturais que possam ser utilizados de forma segura afim de garantir uma ação antioxidante para os mais diversos fins, certificando uma possível substituição aos antioxidantes sintéticos que são utilizados em larga escala por parte da indústria, onde os produtos naturais, neste caso a própolis, demonstram possuir uma ação antioxidante eficaz, sem riscos à saúde.

Com base nos resultados, percebe-se que a extração etanólica foi mais efetiva na obtenção dos compostos bioativos quando comparada à extração aquosa, conferindo maiores valores para as análises de compostos fenólicos totais, bem como para atividade antioxidante. O motivo pode estar relacionado ao fato de que conforme observado por Park *et. al* (1998), através da análise de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), para o extrato de própolis aquoso praticamente não foram detectados picos de flavonoides, diferentemente do extrato etanólico onde os maiores picos foram observados, onde o aumento da concentração do solvente extrator resultou no aumento da quantidade de picos formados, estando assim intimamente relacionado, em cada caso, com sua atividade biológica. Ainda, a alteração do pH do solvente (água) para a extração por meio da técnica de maceração não interferiu nos resultados dos compostos fenólicos totais e atividade antioxidante, visto que não houve variações significativas entre os resultados.

5.3 Elaboração e caracterização dos filmes biopoliméricos ativos

A Figura 13 apresenta o aspecto visual do filme biopolimérico controle (sem adição de extrato), bem como do filme biopolimérico ativo (com adição de extrato). Salienta-se que para elaboração do filme biopolimérico ativo com adição do extrato etanólico, a condição ideal do extrato obtido foi aquele alcançado pela técnica F, enquanto que para elaboração do filme biopolimérico ativo com adição do extrato aquoso, foi o extrato alcançado por meio da técnica D.

Figura 13 - Filme ativo com adição de extrato etanólico de própolis (E) e filme controle etanólico sem extrato (CE); Filme ativo com adição de extrato aquoso de própolis (A) e filme controle aquoso sem extrato (CA)



Fonte: Autora (2022)

O filme elaborado contendo extrato etanólico de própolis (E) demonstrou possuir uma coloração amarelada opaca, característica advinda dos compostos fenólicos da própolis, enquanto que o filme contendo extrato aquoso (A) apresentou transparência, tal qual os filmes controles (CE e CA), ausentes de extratos. A transparência do filme B2, apesar de possuir extrato de própolis em sua formulação, se deu pelo motivo de que no momento da extração aquosa se é obtido um extrato clarificado quando comparado à extração etanólica, visto que os compostos fenólicos não são extraídos com tanta facilidade. Apesar disso, todos os quatro filmes expressaram uniformidade e ausência de materiais particulados, além de serem maleáveis e flexíveis. Os filmes E e A apresentaram odor característico advinda da

própolis, ainda que no filme E o odor foi mais acentuado. Sabe-se que no ramo alimentício, características como coloração, odor e espessura das embalagens são parâmetros que se tornam positivos ou negativos dependendo da aplicação na qual o alimento está inserido. A Tabela 5 demonstra os resultados para a caracterização dos filmes desenvolvidos.

Tabela 5 - Caracterização dos filmes

Filme	Espessura (mm)	σ (MPa)	E (%)	PVA ($\text{g}\cdot\text{m}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$)	Solubilidade em água (%)
E	$0,051 \pm 0,02^b$	$10,32 \pm 2,84^b$	$13,05 \pm 1,86^a$	$5,00 \cdot 10^{-11} \pm 5,63 \cdot 10^{-13a}$	100
A	$0,046 \pm 0,01^{ab}$	$16,15 \pm 3,92^{ab}$	$16,70 \pm 3,87^a$	$5,61 \cdot 10^{-11} \pm 2,54 \cdot 10^{-13a}$	100
CE	$0,032 \pm 0,01^a$	$23,02 \pm 1,44^a$	$15,76 \pm 1,40^a$	$3,75 \cdot 10^{-11} \pm 1,22 \cdot 10^{-13a}$	100
CA	$0,034 \pm 0,01^{ab}$	$18,76 \pm 3,05^{ab}$	$15,55 \pm 3,42^a$	$4,01 \cdot 10^{-11} \pm 1,87 \cdot 10^{-12a}$	100

Nota: Os dados relatados são valores médios e \pm desvio médio. Letras diferentes representam diferenças significativas na coluna ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey
 Fonte: Autora (2022)

Pôde-se observar que o filme contendo extrato etanólico (E) foi o que apresentou maior espessura. O mesmo fato ocorreu quando comparados os filmes E e A com os filmes controles CE e CA, ausentes de extrato. Esse comportamento sucede devido à maior massa de componentes presente na formulação do filme. Essa condição pode ser justificada ao fato de que os filmes são submetidos à temperatura constante de 40 °C pelo período de 24 h para evaporação do solvente no momento de sua formulação. Como o extrato etanólico é capaz de extrair de forma mais eficaz os compostos bioativos, os resultados dos extratos são líquidos de coloração mais forte e, conseqüentemente, espera-se possuir menos solvente no produto final quando comparados à extração aquosa, onde os compostos bioativos são extraídos de forma reduzida, favorecendo no acúmulo de solvente (água) no extrato, o qual é evaporado no momento da secagem, resultando em um filme mais fino, ou seja, menos espesso. Araújo (2014) desenvolveu filmes biodegradáveis de amido incorporados com extrato de própolis e obteve valores entre 0,104 e 0,110 mm de espessura, onde os filmes

foram formulados com 3 g de amido para 100 g de solução filmogênica, 20 g de glicerol para 100 g de amido e variado as concentrações dos extratos de própolis utilizados. Os resultados encontrados no presente estudo foram compatíveis com Martiny *et al.* (2018), que desenvolveram filmes biodegradáveis preparados com carragenana e extrato de folhas de oliveira e obtiveram filmes controle com 0,032 mm de espessura, bem como filmes contendo extrato com 0,048 mm de espessura, confirmando a ação do extrato no que se refere ao incremento na espessura dos mesmos.

Além disso foi possível perceber uma diminuição na resistência à tração no momento de ruptura nos filmes na presença dos extratos. Verificou-se que a adição do extrato etanólico promoveu uma redução significativa de 56,5% desse parâmetro, bem como a adição do extrato aquoso, que promoveu uma redução de 15,8%. Conforme exposto no Quadro 1, Bodini *et al.* (2013) também observaram o mesmo desempenho, onde houve uma redução da tensão na ruptura em filmes baseados em gelatina adicionados de extrato de própolis. Conforme Araújo (2014), uma justificativa para esse comportamento é a de que os filmes contendo extrato possuem ceras em sua composição, as quais podem ter atuado como possíveis plastificantes, aumentando dessa forma a mobilidade da estrutura da matriz polimérica, tornando os filmes menos rígidos. De acordo com Andrade (2013), os filmes com propriedades mecânicas ideais devem ser resistentes à ruptura para que possam proteger os produtos nos quais são aplicados, e flexíveis, para que possam se adaptar a possíveis deformações e resistirem à possíveis fraturas. Martiny *et al.* (2020) desenvolveram uma embalagem ativa composta por carragenana e extrato de folha de oliveira para conservação de carne de cordeiro e obtiveram como propriedades os valores de $11,83 \pm 0,23$ MPa para filmes controle, bem como $8,51 \pm 0,09$ MPa para filmes contendo extrato, valores esses que ainda inferiores, foram similares aos encontrados para os filmes formulados apresentados na Tabela 5. Os resultados corroboram com estudos desenvolvidos por De Araújo *et al.* (2015), expostos no Quadro 1, onde avaliaram as propriedades físicas, antimicrobianas e antioxidantes de filmes de amidos incorporados com extrato de própolis e puderam constatar valores de tensões que variaram entre 5,1 e 6,7 MPa nos filmes elaborados.

Em relação a porcentagem de alongação no momento de ruptura, o comportamento nos quatro filmes analisados foi semelhante, conforme evidenciado pela análise estatística. O desempenho sugere que a presença do extrato não influenciou significativamente na alongação dos filmes, resultado que pode ser

considerado positivo para esse caso. Alguns autores (Araújo, 2014; Braga, 2016; Martiny, 2020) já validaram a mesma informação em seus estudos envolvendo filmes biopoliméricos, onde a porcentagem de alongação não foi, ou foi alterada minimamente na presença de compostos naturais. Conforme ilustrado no Quadro 1, Chang-Bravo, López-Cordoba e Martino (2014) evidenciaram que a incorporação de extratos naturais de própolis e erva-mate afetou o comportamento mecânico dos filmes formulados com matrizes biopoliméricas de amido e carragenana, onde a inserção do extrato de própolis ocasionou em um maior alongamento de ruptura quando comparado a erva-mate. Jun, Hanry e Surugau (2020) avaliaram os efeitos de diferentes concentrações do plastificante glicerol nas características de biofilmes feitos a partir de carragenana semi-refinada e encontraram valores entre 4,48 e 8,58% para porcentagem de alongação na ruptura, evidenciando que o aumento da concentração do plastificante utilizado torna o material mais resistente.

Analisando os resultados obtidos para permeabilidade ao vapor de água, a presença dos extratos não interferiu no comportamento dos filmes, havendo pouca variação entre os resultados encontrados conforme os valores obtidos através da análise estatística dos dados. Segundo McHugh *et al.* (1993), essa condição está diretamente relacionada com a espessura dos filmes, uma vez que filmes mais espessos tendem a possuir um valor de PVA mais baixo. Conforme ilustrado na Tabela 5, a espessura dos filmes teve pouca variação, corroborando conseqüentemente com os resultados para PVA dispostos na mesma tabela. Os valores encontrados são próximos, e ainda melhores, dos valores reportados por Roy e Rhim (2021), onde os resultados demonstraram $6,1 \cdot 10^{-10} \text{ g.m}^{-1}.\text{Pa}^{-1}.\text{s}^{-1}$ para filmes a base de carragenana e glicerol, e ainda, $6,8 \cdot 10^{-10} \text{ g.m}^{-1}.\text{Pa}^{-1}.\text{s}^{-1}$ para filmes a base de carragenana e glicerol incorporados com extrato de própolis. Martiny *et al.* (2020), utilizaram as mesmas concentrações para filmes controle a base de carragenana e glicerol e obtiveram $6,61 \cdot 10^{-11} \text{ g.m}^{-1}.\text{Pa}^{-1}.\text{s}^{-1}$, bem como $7,43 \cdot 10^{-11} \text{ g.m}^{-1}.\text{Pa}^{-1}.\text{s}^{-1}$ para os filmes contendo extrato de folhas de oliveira, valores esses que foram muito próximos aos valores listados na Tabela 5. Sabe-se que a própolis possui substâncias hidrofóbicas em sua composição, alterando a interação da água com a matriz polimérica e conseqüentemente reduzindo a higroscopicidade dos filmes, visto que os valores de permeabilidade foram menores, ainda que não de forma relevante, nos filmes contendo extrato. Dessa forma, busca-se o desenvolvimento de filmes biopoliméricos que possuam baixo valor de PVA (ou de alta barreira) para aplicações

alimentícias, com o intuito de manter as propriedades biológicas dos alimentos na ausência de gases ou vapores, fator que pode ocasionar no aceleração da vida útil do produto, ou ainda, favorecer à degradação por bactérias ou fungos (ZAVAREZE *et al.*, 2012).

Em relação à solubilidade, conforme o observado, todos os filmes solubilizaram totalmente quando em contato com a água, evidenciando que a presença do extrato não interferiu nessas condições. Essa reação era esperada, visto que segundo Therkelsen (1993), a carragenana é solúvel em solventes polares. Essa solubilidade característica advém dos hidrocoloides hidrofílicos, ou seja, são substâncias solúveis em água e insolúveis em solventes orgânicos. Apesar de que a kappa-carragenana apresenta em sua estrutura unidades de 3,6-anidro-D-galactopiranosose, os quais possuem caráter hidrofóbico, elas são consideradas substâncias de rápida solubilidade. Outro fator é a presença de íons de sódio na estrutura da kappa-carragenana, onde a solubilidade em água sem aquecimento torna-se favorável, diferentemente da iota-carragenana, onde o cátion presente é o potássio, que vem a ser um composto insolúvel em água fria (PEREIRA, 2009). A alta solubilidade é reportada em outros estudos, onde Giyatmi *et al.* (2017) avaliaram as propriedades físicas e de barreira de filmes a base de carragenana e amido e observaram um percentual de 60,49%, bem como Martiny *et al.* (2020), que reportaram solubilidade de $82,60 \pm 3,47\%$ para filmes formulados a base de carragenana, glicerol e água destilada e $76,60 \pm 0,33\%$ para filmes formulados a partir de carragenana, glicerol, água destilada e extrato de folhas de oliveira. Essa característica faz com que a futura aplicação do filme elaborado como embalagem deva ser proposta para alguma matriz alimentícia com baixo conteúdo de umidade.

A Tabela 6 traz os resultados referentes ao potencial ativo dos filmes desenvolvidos, sendo E o filme biopolimérico contendo extrato etanólico, A o filme biopolimérico contendo extrato aquoso, CE o filme bioilimérico controle relativo ao filme E e CA o filme biopolimérico controle relativo ao filme A.

Tabela 6 - Potencial ativo dos filmes controles (CE e CA) e filmes ativos (E e A)

Filme	Atividade antioxidante (%)	Compostos fenólicos totais (mg GAE.g ⁻¹ b.s)
E	89,54 ± 0,01 ^a	3,23 ± 0,30
A	86,43 ± 0,01 ^a	0
CE	0	0
CA	0	0

Nota: Os dados relatados são valores médios e ± desvio médio. Letras diferentes representam diferenças significativas na coluna ($p < 0,05$) pelo teste de T de *Student*
 Fonte: Autora (2022)

Conforme os valores exibidos na Tabela 6, os filmes contendo extrato, tanto etanólico quanto aquoso, foram os únicos filmes que demonstraram caráter ativo para atividade antioxidante, visto que os filmes controles não apresentaram. Ademais, apenas o filme contendo extrato etanólico, apresentou compostos fenólicos totais em sua composição. Ressalta-se que para realização da análise de potencial ativo dos filmes foram necessárias suas solubilizações em água, o que pode ter ocasionado em perdas na atividade biológica do mesmo. Por fim, a Tabela 7 apresenta os resultados da análise microbiológica dos filmes elaborados.

Tabela 7 - Análise microbiológica dos filmes frente às bactérias *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*

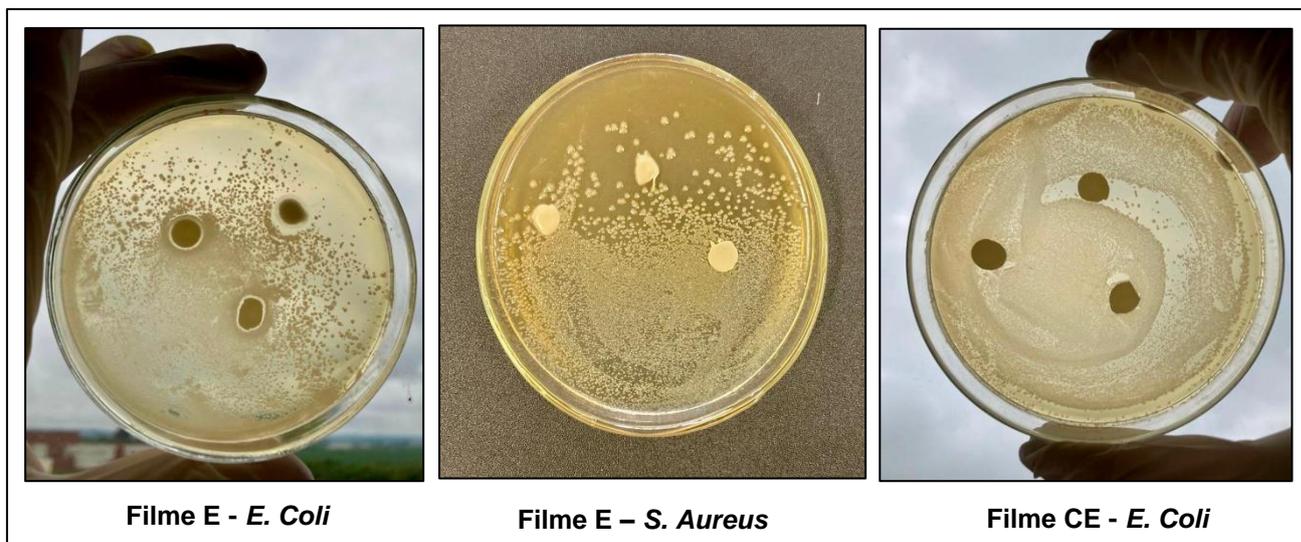
Cepa	Halo (mm)			
	E	A	CE	CA
<i>Staphylococcus aureus</i>	8,14 ± 0,31 ^a	0	0	0
<i>Escherichia coli</i>	6,81 ± 0,21 ^b	0	6,22 ± 0,33 ^c	0

Nota: Os dados relatados são valores médios e ± desvio médio. Letras diferentes representam diferenças significativas nas colunas ($p < 0,05$) pelo teste t de *Student*
 Fonte: Autora (2022)

Conforme o exposto, percebe-se que frente à cepa de *Staphylococcus aureus*, apenas o filme contendo extrato etanólico inibiu o crescimento dos microrganismos (8,14 mm), sendo que para o filme contendo extrato aquoso de própolis e filmes sem extrato não houveram nenhuma inibição, confirmando assim a capacidade antimicrobiana do extrato etanólico utilizado. Apesar de que o filme controle apresentou halo de inibição frente às cepas de *Escherichia coli* (provavelmente devido

ao etanol presente no filme) o filme contendo extrato de própolis possuiu um halo de inibição maior (6,81 mm) quando comparado ao filme controle (6,22 mm). Pobiega *et al.* (2019) analisaram a ação antimicrobiana apenas do extrato de própolis e puderam constatar halos de inibição que variaram entre 9,66 e 25,3 mm para extratos obtidos por extração convencional e halos de 9,95 à 26,89 mm para extratos obtidos por meio da extração ultrassônica. Bastos *et al.* (2011) avaliaram a atividade antibacteriana da própolis marrom frente à *Escherichia coli* e observaram halos de inibição que variaram entre 10 e 11,3 mm, valores próximos aos reportados no presente estudo. Segundo os autores Siripatrawan, Vitchayakitti e Sanguandeeikul (2013), o extrato etanólico de própolis age de forma mais eficaz contra as bactérias Gram-positivas do que contra as Gram-negativas, onde as bactérias Gram-negativas possuem além da membrana celular, uma membrana da camada externa que consiste em fosfolipídios, proteínas e polissacarídeos, dificultando a permeabilidade. Em concordância, o maior halo inibitório desenvolvido nos filmes foi frente as bactérias Gram-positivas (*Staphylococcus aureus*). De Lima *et al.* (2019) avaliaram as propriedades e potencialidades da própolis verde e destacaram que o efeito bactericida do extrato de própolis cresceu à medida que o solvente possuía menor quantidade de água, onde os halos variaram entre 5 a 7 mm para os extratos frente a *Staphylococcus aureus* e entre 5 a 6 mm frente a *Escherichia coli*. Esse comportamento também foi visualizado nos filmes desenvolvidos, onde os filmes contendo extrato etanólico desenvolveram os maiores halos de inibição frente às cepas expostas. Além disso, os valores encontrados corroboram com o estudo reportado por Ardjoum *et al.* (2021), exposto no Quadro 1, onde os halos de inibição contra *S. aureus* e *Penicillium sp.* demonstraram uma zona de inibição de 12,1 e 11,58 mm, respectivamente. A Figura 14 ilustra os halos inibitórios em cada um dos casos.

Figura 14 - Halos de inibição dos filmes E e CE frente às cepas *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*



Fonte: Autora (2022)

Com base no exposto, através da interpretação dos dados contidos nas Tabelas 3,4,5,6 e 7 foi possível analisar que a extração etanólica é capaz de resultar em extratos mais concentrados, com maiores teores de compostos bioativos e conseqüentemente em uma melhor atividade biológica, principalmente no que se refere à atividade antimicrobiana dos filmes. Apesar de o extrato aquoso demonstrar os menores resultados para as análises realizadas devido aos motivos já discutidos anteriormente, pôde-se constatar a presença dos compostos bioativos, ainda que de forma reduzida, havendo a possibilidade da realização do aprimoramento do processo no momento da extração, como variações de temperatura, agitação e volume de água utilizada, por exemplo, objetivando a melhorias no processo afim de obter extratos mais ricos.

De maneira geral, os filmes desenvolvidos incorporados com os extratos demonstraram características interessantes e importantes, tornando-os potenciais materiais para as mais diversas utilidades dentro da indústria alimentícia, atuando como possível alternativa ao uso de embalagens sintéticas.

6 CONCLUSÃO

Os resultados de caracterização da matéria-prima utilizada demonstraram que a própolis marrom *in natura* possui teor de umidade e cinzas dentro do limite assegurado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, órgão esse responsável pela gestão das políticas públicas de estímulo à agropecuária, pelo fomento ao agronegócio e pela regulação e normatização de serviços vinculados ao setor.

No que se refere às técnicas de extração, observou-se que a efetividade da técnica variou conforme o solvente utilizado, sendo a técnica de ultrassom utilizando o sonificador de ponteira o método mais satisfatório quando o solvente utilizado foi a água. Por outro lado, quando utilizado etanol como solvente, a técnica mais eficaz foi o banho ultrassônico. Os resultados de atividade antioxidante para o extrato aquoso variaram entre 7,34 e 37,04% e os compostos fenólicos totais variaram entre 2,40 e 16,29 mg GAE.g⁻¹ b.s. Para o extrato etanólico, a atividade antioxidante e os compostos fenólicos totais variaram entre 93,41 e 94,28% e 63,08 e 147,45 mg GAE.g⁻¹ b.s., respectivamente. Essa variação solidifica a ideia de que as variações no processo no momento da extração implicam no resultado final de obtenção dos compostos bioativos.

Em relação a formulação dos filmes, a técnica de *casting* empregada foi satisfatória, resultando em filmes opacos para filmes adicionados de extrato etanólico e filmes translúcidos para filmes adicionados de extrato aquoso. Os filmes formados demonstraram homogeneidade, uniformidade e fácil remoção das placas de *Petri* dos quais foram acondicionados. Os filmes formulados apresentaram espessura de 0,051 e 0,046 ± 0,01 mm quando usado extrato etanólico e extrato aquoso, respectivamente. As propriedades mecânicas apresentaram redução de 56,5 % para o extrato etanólico e 15,8 % para o extrato aquoso no que se refere a resistência à tração em relação ao filme controle, enquanto que para alongação e permeabilidade ao vapor de água a presença do extrato não interferiu nas propriedades dos filmes. Além disso, todos os filmes demonstraram um caráter de total solubilidade em água. Ainda, os filmes contendo extrato etanólico foram capazes de formar halos de inibição frente às cepas de bactérias Gram-positivas (*Staphylococcus aureus*) e Gram-negativas (*Escherichia coli*) que foram de 8,14 e 6,81 mm, respectivamente, evidenciando o caráter antimicrobiano da própolis utilizada e potencial ativo do filme.

Assim, evidencia-se a possibilidade de inserção do produto elaborado no mercado de produtos que não sejam prejudiciais ao meio ambiente, podendo ser utilizados tanto como embalagens a fim de proteger o alimento contido (visto suas propriedades físicas e mecânicas), como agir de forma secundária, participando ativamente como barreira antimicrobiana, por exemplo, agregando dessa forma ainda mais valor ao filme biopolimérico.

7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Como proposta para trabalhos futuros, indica-se:

- A execução de um planejamento experimental, afim de averiguar de maneira mais eficiente as melhores condições de extração;
- O estudo da biodegradabilidade do filme formulado, variando/simulando parâmetros e fatores como clima, água do mar, temperatura, pH do solo, dentre outros;
- O estudo da melhor adequação do filme quando em contato com algum alimento específico selecionado, avaliando suas propriedades de barreira, visual, morfológica, dentre outras;
- A realização da análise de flavonoides dos extratos de própolis.

REFERÊNCIAS

ADILAH, A. N. *et al.* Utilization of mango peel extracts on the biodegradable films for active packaging. **Food Packaging and Shelf Life**, v. 16, n. May 2017, p. 1–7, 2018. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S2214289417301266>. Acesso em: 08 set. 2021.

ADOLAR, A.; WASICKY, R.; ELFRIEDE, B. Extração por fluido supercrítico. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 1997. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rbfar/a/6pZbYHtVFRDcB9vYZLfWsKC/>. Acesso em: 08 set. 2021.

APPENDINI, P.; E HOTCHKISS, J. H. Review of antimicrobial food packaging. **Innovative Food Science e Emerging Technologies**, v. 3, p.113–126, 2002. Disponível em: [https://www.scirp.org/\(S\(351jmbntvnsjt1aadkposzje\)\)/reference/ReferencesPapers.aspx?ReferenceID=1571197](https://www.scirp.org/(S(351jmbntvnsjt1aadkposzje))/reference/ReferencesPapers.aspx?ReferenceID=1571197). Acesso em: 08 set. 2021.

ARDJOUR, N. *et al.* Development of antimicrobial films based on poly(lactic acid) incorporated with *Thymus vulgaris* essential oil and ethanolic extract of Mediterranean propolis. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 185, p. 535–542, ago.2021. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0141813021014239>. Acesso em: 08 set. 2021.

Associação Brasileira de Estudos de Abelhas. Disponível em: <https://abelha.org.br/>. Acesso em: 09 set. 2021.

ASTM - American Society for Testing and Materials. ASTM **D882-02**: Standard Test Method for Tensile Properties of Thin Plastic Sheeting, 2002.

ASTM - American Society for Testing and Materials. ASTM **E96/E96-16**: Standard Test Methods for Water Vapor Transmission of Materials, 2016.

AOAC (1995). Official Methods of Analysis of the AOAC international, 16th ed. **Method 970.12**. Association of Official Analytical Chemists International. Washington, DC, USA.

AVILA, L.B. *et al.* Carrageenan-Based Films Incorporated with Jaboticaba Peel Extract: An Innovative Material for Active Food Packaging. **Molecules**, v. 25, ed. 23, 2020. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1420-3049/25/23/5563>. Acesso em: 24 set. 2021.

BARRETO, A. *et al.* **Controle de qualidade da própolis**. v. 33, p. 48, 2020. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/1128584/controle-de-qualidade-da-propolis>. Acesso em: 08 set. 2021.

BASTOS, V. D. Biopolímeros e polímeros de matérias-primas renováveis alternativos aos Petroquímicos. **Revista do BNDES**, v. 14, n. 28, p. 201–234, 2007. Disponível em: <https://web.bndes.gov.br/bib/jspui/handle/1408/11834>. Acesso em: 08 set. 2021.

BANSKOTA, A. H.; TEZUKA, Y.; KADOTA, S. Recent progress in pharmacological research of propolis. **Phytotherapy Research**, v. 15, n. 7, p. 561–571, 2001. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/ptr.1029>. Acesso em: 08 set. 2021.

BATTISTI, R. **Revestimento biodegradável e ações antimicrobiana e antioxidante para uso como embalagem ativa em carne bovina fresca**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2016. Disponível em: <https://repositorio.ufsc.br/xmlui/bitstream/handle/123456789/167749/339939.pdf?sequence=1&isAllowed=y>. Acesso em: 08 set. 2021.

BERNARDO, C. L. E., *et al.* Própolis. Cicatrizante e antibiótico natural. **Revista Brasileira de Enfermagem**, 43 (1-2-3-4). Brasília, 1990.

BRAGA, L.A.C. **Revestimentos de carragenanas adicionadas de cera de carnaúba para conservação pós-colheita de frutas**. Tese (Doutorado em fitotecnia) – Universidade Federal Rural do Semi-Árido. Mossoró, 2016. Disponível em: http://repositorio.utfpr.edu.br/jspui/bitstream/1/6545/3/CM_COALM_2013_2_09.pdf. Acesso em: 11 mar. 2022.

BRAGA, L. R.; SILVA, F. M. Embalagens ativas: uma nova abordagem para embalagens alimentícias. **Brazilian Journal of Food Research**, v. 8, n. 4, p. 170, 2017. Disponível em: <https://periodicos.utfpr.edu.br/rebrapa/article/view/4602>. Acesso em: 08 set. 2021.

BRAND-WILLIAMS, W., CUVELIER, M. E., BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT - Food Science and Technology**, Amsterdam, v. 28, p. 25–30, 1995. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0023643895800085>. Acesso em: 20 set. 2021.

BRANEN, A.L.J. Toxicology and biochemistry of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene. **Am. Oil Chemists Soc.**, 1975, 52, 59. Disponível em: http://bjp.sagepub.unboundmedicine.com/medline/citation/805808/Toxicology_and_biochemistry_of_butylated_hydroxyanisole_and_butylated_hydroxytoluene_. Acesso em: 11 mai. 2022.

BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Instrução Normativa SDA nº 03, de 19 jan. 2001. Anexo VI - **Regulamento técnico para fixação de identidade e qualidade de própolis**. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 23 jan. 2001. Disponível em: <https://www.cnabrazil.org.br/artesanaisetradicionais/assets/files/documento%201%200%20instrucao%20normativa%20sda%20n%2003%20de%2019012001.pdf>. Acesso em: 11 set. 2021.

BODINI, R. B. *et al.* Properties of gelatin-based films with added ethanol-propolis extract. **LWT - Food Science and Technology**, v. 51, n. 1, p. 104–110, abr. 2013. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0023643812004379>. Acesso em: 08 set. 2021.

BURDOCK, G. A. Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (propolis). **Food and Chemical Toxicology**, v. 36, n. 4, p. 347–363, 1998. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9651052/>. Acesso em: 08 set. 2021.

CAMPELO, C. S. **Avaliação da coagulabilidade e da calcificação em filmes de quitosana sulfonatada e carragenana**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Centro de Tecnologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2014.

CASTRO, S. L. **Propolis: Biological and Pharmacological Activities. Therapeutic Uses of This Bee-product**, 2001. Disponível em: <https://arbs.biblioteca.unesp.br/index.php/arbs/article/view/15/0>. Acesso em: 08 set. 2021.

CHANG-BRAVO, L.; LÓPEZ-CÓRDOBA, A.; MARTINO, M. Biopolymeric matrices made of carrageenan and corn starch for the antioxidant extracts delivery of Cuban red propolis and yerba mate. **Reactive and Functional Polymers**, v. 85, p. 11–19, 2014. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1381514814002041>. Acesso em: 08 set. 2021.

CHOI, I. *et al.* Effect of oxidized phenolic compounds on cross-linking and properties of biodegradable active packaging film composed of turmeric and gelatina. **LWT - Food Science and Technology**, 2018. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0023643818302895>. Acesso em: 08 set. 2021.

CHONG, F. C.; CHUA, L. S. Effects of Solvent and pH on Stingless Bee Propolis in Ultrasound-Assisted Extraction. **AgriEngineering**, v. 2, n. 2, p. 308–316, 2020. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2624-7402/2/2/20>. Acesso em: 08 set. 2021.

CONDE, L. M. DOS S. Polímeros naturais para aplicações biomédicas. p. 99. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade do Minho, 2011. Disponível em: <https://repositorium.sdum.uminho.pt/handle/1822/13708>. Acesso em: 08 set. 2021.

CORREA-PACHECO, Z. N. *et al.* Physicochemical characterization and antimicrobial activity of edible propolis-chitosan nanoparticle films. **Progress in Organic Coatings**, v. 137, 1 dez. 2019. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0300944019309415>. Acesso em: 08 set. 2021.

DA COSTA, M.A., *et al.* Extração e caracterização da Kappa-carragenana. **Embrapa Agroindústria Tropical**. Fortaleza, Ceará, 2017. Disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/1076707/1/BPD17028.pdf>. Acesso em: 08 set. 2021.

DA ROSA, G.S., *et al.* Development of biodegradable films with improved antioxidant properties based on the addition of carrageenan containing olive leaf extract for food packaging applications. **Journal of Polymers and the Environment**, 28:123–130, 2020. Disponível em: <https://link.springer.com/content/pdf/10.1007/s10924-019-01589-7.pdf>. Acesso em: 20 set. 2021.

DAUGSCH, A. *et al.* Brazilian red propolis - Chemical composition and botanical origin. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 5, n. 4, p. 435–441, 2008. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18955226/>. Acesso em: 08 set. 2021.

DE ALMEIDA, P. P. **Desenvolvimento de embalagem ativa antimicrobiana para pães de forma**. p. 201. Dissertação (Doutorado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2017. Disponível em: <https://repositorio.ufsc.br/xmlui/handle/123456789/178315>. Acesso em: 08 set. 2021.

DE ARAÚJO, G. K. P. *et al.* Physical, antimicrobial and antioxidant properties of starch-based film containing ethanolic propolis extract. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 50, n. 9, p. 2080–2087, 2015. Disponível em: <https://ifst.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/ijfs.12869>. Acesso em: 08 set. 2021.

DE AQUINO, E. S. *et al.* Produção de papel biodegradável utilizando folhas de bananeira. p. 402-411. **Anais do VIII Simpósio de Engenharia de Produção**. São Paulo, Blucher, 2020. Disponível em: <https://www.proceedings.blucher.com.br/article-details/produo-de-papel-biodegradavel-utilizando-folhas-de-bananeira-35121>. Acesso em: 08 set. 2021.

DELAZAR, A. *et al.* Microwave-assisted extraction in natural products isolation. **Methods in Molecular Biology**, v. 864, p. 89–115, 2012. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22367895/>. Acesso em: 08 set. 2021.

DEVEQUI-NUNES, D. *et al.* Chemical characterization and biological activity of six different extracts of propolis through conventional methods and supercritical extraction. **PLoS ONE**, v. 13, n. 12, p. 1–21, 2018. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30513100/>. Acesso em: 08 set. 2021.

DE OLIVEIRA REIS, J. H. *et al.* Evaluation of the antioxidant profile and cytotoxic activity of red propolis extracts from different regions of northeastern Brazil obtained by conventional and ultrasound-assisted extraction. **PLoS ONE**, v. 14, n. 7, p. 1–27, 2019. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31276476/>. Acesso em: 08 set. 2021.

DE PAULA, G. A. **Desenvolvimento de filmes à base de carragenas das algas marinhas *Solieria filiformis* e *Hypnea musciformis* e de um alginato comercial**. p. 79, 2013. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade Federal do Ceará. Fortaleza, 2013. Disponível em: http://www.repositorio.ufc.br/bitstream/riufc/19789/1/2013_tese_gapaula.pdf. Acesso em: 08 set. 2021.

DE SOUZA, F. R. A. *et al.* **Biopolímeros na indústria de alimentos: do aproveitamento de resíduos agroindustriais a produção de biopolímeros.** p. 370–388, 2021. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/350556162_BIOPOLIMEROS_NA_INDUSTRIA_DE_ALIMENTOS_DO_APROVEITAMENTO_DE_RESIDUOS_AGROINDUSTRIAS_A_PRODUCAO_DE_BIOPOLIMEROS. Acesso em: 08 set. 2021.

DI CAPUA, A. *et al.* Preparation and characterization of Chilean propolis coprecipitates using Supercritical Assisted Atomization. **Chemical Engineering Research and Design**, v. 136, p. 776–785, 2018. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0263876218303320>. Acesso em: 08 set. 2021.

DUTTA, B.K. **Principles of Mass Transfer and Separation Process.** Universiti Teknologi Petronas, New Delhi, 2009.

ENCONTRO DE PESQUISA DA FATEB e ENCONTRO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA – Sustentabilidade, Acessibilidade e Direitos Humanos. Anais: Vol. 4 – Engenharia Mecânica e Engenharia Química. Telêmaco Borba, PR. Editora FATEB, 2017. Disponível em: <http://docplayer.com.br/186219524-Viencontrodeiniciacaocientifica.html>. Acesso em: 11 mar. 2022.

EZAZI, A. *et al.* Development of a chitosan-propolis extract edible coating formulation based on physico-chemical attributes of hens' eggs: Optimization and characteristics edible coating of egg using chitosan and propolis. **Food Bioscience**, v. 40, 1 abr. 2021. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S2212429221000195>. Acesso em: 08 set. 2021.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 6 ed. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - Anvisa. Brasília, 2019. Disponível em: FARMACOPEIA_BRASILEIRA_Agencia_Nacional.pdf. Acesso em: 09 set. 2021.

FERNANDA, L.; SILVA, T. **Atividade Imunomoduladora da Própolis de Apis mellifera**, 2018. Disponível em: https://pronutri.fat.edu.br/edicoes/01/Atividade%20Imunomoduladora%20da%20Pr%C3%B3polis%20de%20Apis%20mellifer2_131118.pdf. Acesso em: 08 set. 2021.

FERRO, A. F. P.; BONACELLI, M. B. M.; ASSAD, A. L. D. Oportunidades tecnológicas e estratégias concorrenciais de gestão ambiental: o uso sustentável da biodiversidade brasileira. **Gestão & Produção**, v. 13, n. 3, p. 489–501, 2006. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/gp/a/WFhGRtPynkBTGJYPctH77zr/>. Acesso em: 08 set. 2021.

FUNARI, C. S., FERRO, V. O., Propolis analysis. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26 p. 171-178, 2006.

GAVA, A. J. **Tecnologia de Alimentos. Princípios e Aplicações**. 1 ed. São Paulo. Nobel, 1984. Disponível em: https://www.academia.edu/36520893/Princ%C3%ADpios_de_tecnologia_de_alimentos_Altanir_J_Gava. Acesso em: 08 set. 2021.

GHISALBERTI, E. L. Propolis: A Review. **Bee World**, v. 60, n. 2, p. 59–84, 1979. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/0005772X.1979.11097738>. Acesso em: 08 set. 2021.

HENRIQUE, C. M.; CEREDA, M. P.; SARMENTO, S. B. S. Características físicas de filmes biodegradáveis produzidos a partir de amidos modificados de mandioca. **Food Science and Technology**, v. 28, n. 1, p. 231–240, 2008. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/cta/a/RTrq7rtshCHT3hpH4hF83WF/>. Acesso em: 08 set. 2021.

HOJO, P. A. **Extração de compostos bioativos de própolis verde por alta pressão isostática**. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) - Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 2017. Disponível em: http://repositorio.unicamp.br/bitstream/REPOSIP/332907/1/Hojo_PaulaAshikawa_M.pdf. Acesso em: 08 set. 2021.

IVANKOVIC, A. *et al.* Biodegradable packaging in the food industry. **Journal of Food Safety and Food Quality**. Heft 2, 2017. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/317044744_BIODEGRADABLE_PACKAGING_IN_THE_FOOD_INDUSTRY. Acesso em: 08 set. 2021.

KAZA, *et al.* **What a Waste 2.0: A Global Snapshot of Solid Waste Management to 2050**. Urban Development Series. Washington, DC: World Bank, 2018.

KOSALEC, I. *et al.* Quantitative analysis of the flavonoids in raw propolis from northern Croatia. **Acta Pharmaceutica**, v. 54, n. 1, p. 65–72, 2004. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15050046/>. Acesso em: 08 set. 2021.

KRUG, F.J. **Métodos de Preparo de Amostras: Fundamentos sobre preparo de amostras orgânicas e inorgânicas para análise elementar**. Santa Maria, 2006. Disponível em: <https://docero.com.br/doc/xxc18vv>. Acesso em: 08 set. 2021.

LANDIM, A. P. M. *et al.* Sustentabilidade quanto às embalagens de alimentos no Brasil. **Polimeros**, v. 26, p. 82–92, 2016. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/po/a/Mnh695j5cVys99xsSSx54WM/>. Acesso em: 08 set. 2021.

LINS, M. V. **Influência da temperatura de armazenamento da própolis de três regiões do estado da Paraíba**. p. 78, 2018. Dissertação (Doutorado em Engenharia de Processos) - Universidade Federal de Campina Grande. Campina Grande, 2018. Disponível em: <http://dspace.sti.ufcg.edu.br:8080/jspui/bitstream/riufcg/1505/1/MARIA%20VER%C3%94NICA%20LINS%20%E2%80%93%20DISSERTA%C3%87%C3%83O%20%28PPGEP%29%202018.pdf>. Acesso em: 08 set. 2021.

MACHADO, B. A. S. *et al.* Chemical composition and biological activity of extracts obtained by supercritical extraction and ethanolic extraction of brown, green and red propolis derived from different geographic regions in Brazil. **PLoS ONE**, v. 11, n. 1, p. 1–26, 2016. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26745799/>. Acesso em: 08 set. 2021.

MARQUES DE FARIAS, P. *et al.* Nopal cladode as a novel reinforcing and antioxidant agent for starch-based films: A comparison with lignin and propolis extract. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 183, p. 614–626, 31 jul. 2021. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/351207864_Nopal_cladode_as_a_novel_reinforcing_and_antioxidant_agent_for_starch-based_films_A_comparison_with_lignin_and_propolis_extract. Acesso em: 08 set. 2021.

MARTINY, T. R. *et al.* Bio-Based Active Packaging: Carrageenan Film with Olive Leaf Extract for Lamb Meat Preservation. **Foods**, v. 9, n. 12, p. 1759, 2020. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33261179/>. Acesso em: 08 set. 2021.

MARTINY, T. R. *et al.* Extração e caracterização de carragenana obtida da alga vermelha *Gigartina skottsbergii*, 2017. **14ª Jornada de Pós-Graduação e Pesquisa**. Disponível em: <http://revista.urcamp.edu.br/index.php/rcjppg/article/view/659>. Acesso em: 08 set. 2021.

MARTINY, T.R. *et al.* Optimization of green extraction for the recovery of bioactive compounds from Brazilian olive crops and evaluation of its potential as a natural preservative. **Journal of Environmental Chemical Engineering**. V. 9, 2 ed, 2021. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S2213343721001081?via%3Dihub>. Acesso em: 24 set. 2021.

MARTINY, T. R.; MORAES, C. C.; ROSA, G. S. **Desenvolvimento de filme biodegradável incorporado com extrato foliar de *Olea europaea* L. para aplicação como embalagem ativa**. p. 4683–4686, 2018. Disponível em: <https://www.proceedings.blucher.com.br/article-details/desenvolvimento-de-filme-biodegrvel-incorporado-com-extrato-foliar-de-olea-europaea-l-para-aplicao-como-embalagem-ativa-29607>. Acesso em: 08 set. 2021.

MASSON-DELMOTTE, V.P. *et al.* IPCC, 2021: **Climate Change 2021: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Sixth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change**. Cambridge University.

MA, Y.; LI, L.; WANG, Y. Development of PLA-PHB-based biodegradable active packaging and its application to salmon. **Packaging Technology and Science**, v. 31, n. 11, p. 739–746, 2018. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/pts.2408>. Acesso em: 08 set. 2021.

McHugh, T.H.; Avenabustillos, R.; Krochta, J.M. Hydrophilic Edible Films—Modified Procedure for Water-Vapor Permeability and Explanation of Thickness Effects. **J Food Sci** **1993**, 58, 899–903.

ANGELO, M.P.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos – Uma breve revisão. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, v. 66, n. 1, p. 1–9, 2007. Disponível em: <https://periodicos.saude.sp.gov.br/index.php/RIAL/article/view/32841/31672>. Acesso em: 11 mar. 2022.

MÜLLER, P.S. **Desenvolvimento de embalagem ativa biodegradável de amido de pinhão e de mandioca com antioxidantes e antimicrobianos naturais para conservação de manteiga orgânica**. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) - Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2016. Disponível em: <https://acervodigital.ufpr.br/bitstream/handle/1884/63622/R%20-%20T%20-%20PRISCILA%20SCHULTZ%20MULLER.pdf?sequence=1&isAllowed=y>. Acesso em: 08 set. 2021.

MUTHUKUMARAN, S. *et al.* Mechanisms for the ultrasonic enhancement of dairy whey ultrafiltration. **Journal of Membrane Science**. vol. 258, p. 106-114, 2005. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0376738805001912>. Acesso em: 08 set. 2021.

Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically. **Norma M7-A**. Approved Standard - Sixth Edition, 2003.

OLIVEIRA, V.B, ZUCHETTO, M.; OLIVEIRA, C.F.; PAULA, C.S.; DUARTE, A.F.S.; MIGUEL, M.D.; MIGUEL, O.G. Efeito de diferentes técnicas extrativas no rendimento, atividade antioxidante, doseamentos totais e no perfil por CLAE-DAD de *Dicksonia sellowiana* (presl.). Hook, dicksoniaceae. **Revista Brasileira de Plantas Medicinai**s, v.18, n.1, p. 230-239, 2016. Disponível em: <https://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/lil-782981>. Acesso em: 11 mai. 2022.

OROIAN, M.; DRANCA, F.; URSACHI, F. Comparative evaluation of maceration, microwave and ultrasonic-assisted extraction of phenolic compounds from propolis. **Journal of Food Science and Technology**, v. 57, n. 1, p. 70–78, 2020. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31975709/>. Acesso em: 08 set. 2021.

PARK, Y.K., *et al.* Estudo da preparação dos extratos própolis e suas aplicações. *Ciência Tecnologia Alimentos*, v.18, p.313-318, 1998. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/cta/a/6v9NPQP8ghxjvkjvwMq6rHL/>. Acesso em: 08 set. 2021.

PARK, Y. K.; ALENCAR, S.M.; AGUILAR, C. L. Bathurst Inlet Port and Road Project: Draft Environmental Impact Statement. Volume 5B, Appendix D-4. Surficial Geology, Soils, and Ecosystem Mapping. **Agricultural and Food Chemisry**, p. 2502–2506, 2007.

PAVIANI, L. C. *et al.* Supercritical CO₂ extraction of raw propolis and its dry ethanolic extract. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 29, n. 2, p. 243–251, 2012. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/bjce/a/gT35vsvYn4FSD3jx6R7QR6N/>. Acesso em: 08 set. 2021.

PEREIRA, L. **Extracção, Caracterização e Utilização das Carragenanas**. Universidade de Coimbra. Coimbra, Portugal, 2010. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/341056733_EXTRACCAO_CHARACTERIZA_CAO_E_UTILIZACAO_DAS_CARRAGENANAS. Acesso em: 08 set. 2021.

PÉREZ-VERGARA, L. D. *et al.* Development and characterization of edible films based on native cassava starch, beeswax, and propolis. **NFS Journal**, v. 21, p. 39–49, 1 nov. 2020. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2352364620300201>. Acesso em: 08 set. 2021.

PERTUSSATTI, C.A. **Gestão ambiental de resíduos plásticos no brasil: subsídios para uma diretriz nacional**. ENAP (Escola Nacional de Administração Pública). Brasília, Distrito Federal, 2020. Disponível em: <https://repositorio.enap.gov.br/bitstream/1/5134/1/Caroline%20Alvarenga%20Pertussatti.pdf>. Acesso em: 08 set. 2021.

PIETTA, P. G.; GARDANA, C.; PIETTA, A. M. Analytical methods for quality control of propolis. **Fitoterapia**, v. 73, n. SUPPL. 1, 2002. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12495705/>. Acesso em: 08 set. 2021.

PODSHIVALOV, A. *et al.* Gelatin/potato starch edible biocomposite films: Correlation between morphology and physical properties. **Carbohydrate Polymers**, v. 157, p. 1162–1172, 2017. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27987819/>. Acesso em: 08 set. 2021.

PINTO, M. S. *et al.* Efeito de extratos de própolis verde sobre bactérias patogênicas isoladas do leite de vacas com mastite*. **Braz. J. vet. Res. anim. Sci.**, São Paulo, v. 38, n. 6, p. 278-283, 2001. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/bjvras/a/6JXdjTx5VHdNpxgW9VNxxDp/?format=pdf>. Acesso em: 09 set. 2021.

POBIEGA, K. *et al.* Comparison of the antimicrobial activity of propolis extracts obtained by means of various extraction methods. **Journal of Food Science and Technology**, v. 56, n. 12, p. 5386–5395, 2019. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31749486/>. Acesso em: 08 set. 2021.

PUGLIESI, L.; LOURENCETTI, C. Impactos ambientais na produção do etanol brasileiro: do campo à indústria. Revista Brasileira Multidisciplinar- **ReBraM**. Vol. 20, n.1, Julho 2017. Disponível em: <https://revistarebram.com/index.php/revistauniara/article/view/472>. Acesso em: 20 set. 2021.

REALINI, C. E.; MARCOS, B. Active and intelligent packaging systems for a modern society. **Meat Science**, v. 98, n. 3, p. 404–419, 2014. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0309174014001995>. Acesso em: 08 set. 2021.

Rede WWF (Fundo Mundial para a Natureza). **Brasil é o 4º país do mundo que mais gera lixo plástico**. Disponível em: <https://www.wwf.org.br/?70222/Brasil-e-o-4-pais-do-mundo-que-mais-gera-lixo-plastico#>. Acesso em: 09 set. 2021.

REIS, J. H. DE O. *et al.* Supercritical Extraction of Red Propolis: Operational Conditions and Chemical Characterization. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 25, n. 20, 2020. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33092095/>. Acesso em: 08 set. 2020.

RIBEIRO, C. *et al.* Optimization of edible coating composition to retard strawberry fruit senescence. **Postharvest Biology and Technology**, v. 44, n. 1, p. 63–70, 2007. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S092552140600322X>. Acesso em: 08 set. 2021.

RIBEIRO, P. B. *et al.* **Estudo fluidodinâmico e avaliação da secagem do resíduo de jambolão em leite de jorro**. XXXVII ENEMP. Universidade Federal de São Carlos, 2015. Disponível em: <http://pdf.blucher.com.br.s3-sa-east-1.amazonaws.com/chemicalengineeringproceedings/enemp2015/SE-419.pdf>. Acesso em: 08 set. 2021.

RUFINO, M. DO S. M. *et al.* FRAP. **Comunicado Técnico, 125 Embrapa**, p. 3–6, 2006. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/664098/metodologia-cientifica-determinacao-da-atividade-antioxidante-total-em-frutas-pelo-metodo-de-reducao-do-ferro-frap>. Acesso em: 09 set. 2021.

SCHWARTZBERG, H.G.; CHAO, R.Y. Solute Diffusivities in Leaching Processes. **Food Technology**, Vol. 36, No. 2, 1982, pp. 73-86. Disponível em: <https://www.scirp.org/reference/ReferencesPapers.aspx?ReferenceID=830356>. Acesso em: 08 set. 2021.

SFORCIN, J. M.; BANKOVA, V. Propolis: Is there a potential for the development of new drugs? **Journal of Ethnopharmacology**, v. 133, n. 2, p. 253–260, 2011. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S037887411000735X>. Acesso em: 08 set. 2021.

SHARMA, S. *et al.* Characterization and Antimicrobial Activity of Biodegradable Active Packaging Enriched with Clove and Thyme Essential Oil for Food Packaging Application. **Foods**, v. 9, n. 1117, p. 16, 2020. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32823666/>. Acesso em: 08 set. 2021.

SILVA, J. C. *et al.* Antimicrobial activity, phenolic profile and role in the inflammation of propolis. **Food and Chemical Toxicology**, v. 50, n. 5, p. 1790–1795, 2012. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0278691512001810>. Acesso em: 08 set. 2021.

SILVA, R. P. D. *et al.* Antioxidant, antimicrobial, antiparasitic, and cytotoxic properties of various Brazilian propolis extracts. **PLoS ONE**, v. 12, n. 3, p. 1–18, 2017. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28358806/>. Acesso em: 09 set. 2021.

SIMÕES, C. C.; DE ARAÚJO, D. B.; DE ARAÚJO, R. P. C. Estudo in vitro e ex vivo da ação de diferentes concentrações de extratos de própolis frente aos microrganismos presentes na saliva de humanos. **Rev. bras. farmacog.**, v. 18, n. 1, p. 84–89, 2008. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rbfar/a/q5TwtPJmVqjgXmhKPxVJD5R/>. Acesso em: 09 set. 2021.

SIMONE-FINSTROM, M.; SPIVAK, M. Propolis and bee health: The natural history and significance of resin use by honey bees. **Apidologie**, v. 41, n. 3, p. 295–311, 2010. Disponível em: <https://link.springer.com/content/pdf/10.1051%2Fapido%2F2010016.pdf>. Acesso em: 08 set. 2021.

SINGLETON, V. L., ROSSI, J. A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic phosphotungstic acid reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**, California, v. 16, p. 144–158, 1965. Disponível em: <https://www.ajevonline.org/content/16/3/144>. Acesso em: 09 set. 2021.

Siripatrawan, U., Vitchayakitti, W. & Sanguandeeikul, R. (2013). Antioxidant and antimicrobial properties of Thai propolis extracted using ethanol aqueous solution. **International Journal of Food Science and Technology**, 48, 22–27. Disponível em: <https://ifst.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1365-2621.2012.03152.x>. Acesso em: 11 mai. 2022.

SOUSA, L. C. F. S. *et al.* Tecnologia de embalagens e conservação de alimentos quanto aos aspectos químico e microbiológico. **Revista ACSA – OJS**, v. V. 8, p. 19–27, 2012. Disponível em: <http://revistas.ufcg.edu.br/acsa/index.php/ACSA/article/view/249>. Acesso em: 08 set. 2021.

SOUZA, I. C. L. **Desenvolvimento de membranas bioativas de colágeno quimicamente modificado contendo própolis vermelha para aplicação em cicatrização de feridas abertas**. Dissertação (Mestrado em Saúde e Ambiente) - Universidade Tiradentes. Aracaju, 2013. Disponível em: <https://openrit.grupotiradentes.com/xmlui/bitstream/handle/set/3028/ISANA%20CARLA%20LEAL%20SOUZA.pdf?sequence=1>. Acesso em: 09 set. 2021.

TAKEUCHI, T. M.; PEREIRA, C. G. Low-Pressure Extraction (Solid – Liquid Extraction, Microwave Assisted, and Ultrasound Assisted) from Condimentary Plants. **Extracting Bioactive Compounds for Food Products**, p. 137–218, 2009. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/284255220_Low-Pressure_Solvent_Extraction_SolidAiLiquid_Extraction_Microwave_Assisted_and_Ultrasound_Assisted_from_Condimentary_Plants. Acesso em: 08 set. 2021.

TRUSHEVA, B.; TRUNKOVA, D.; BANKOVA, V. Different extraction methods of biologically active components from propolis; a preliminary study. **Chemistry Central Journal**, v. 1, n. 1, p. 1–4, 2007. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/5961813_Different_extraction_methods_of_biologically_active_components_from_propolis_A_preliminary_study. Acesso em: 08 set. 2021.

VEGGI, P. C.; MARTINEZ, J.; MEIRELES, M. A. A. Fundamentals of microwave extraction. **Materials Science**, 2012. Disponível em: <https://www.semanticscholar.org/paper/Fundamentals-of-Microwave-Extraction-Veggi-Mart%C3%ADnez/5213aab46e5d1202aaf88b4f42fc5f01fc041c49>. Acesso em: 08 set. 2021.

YANG, H. Y. *et al.* Antibacterial activity of propolis ethanol extract against streptococcus mutans as influenced by concentration, temperature, pH and cell age. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 15, n. 1, p. 75–81, 2007. Disponível em: <https://www.jfda-online.com/journal/vol15/iss1/4/>. Acesso em: 08 set. 2021.

YEO, K. L.; LEO, C. P.; CHAN, D. J. C. Ultrasonic Enhancement on Propolis Extraction at Varied pH and Alcohol Content. **Journal of Food Process Engineering**, v. 38, n. 6, p. 562–570, 2015. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/jfpe.12186>. Acesso em: 08 set. 2021.

YUAN, Y. *et al.* The Phenolic Compounds, Metabolites, and Antioxidant Activity of Propolis Extracted by Ultrasound-Assisted Method. **Journal of Food Science**, v. 84, n. 12, p. 3850–3865, 2019. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31750945/>. Acesso em: 08 set. 2021.

ZABAIYOU, N. *et al.* Biological properties of propolis extracts: Something new from an ancient product. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 207, p. 214–222, 2017. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28411017/>. Acesso em: 08 set. 2021.

ZAVAREZE, E. D. R. *et al.* Development of oxidised and heat–moisture treated potato starch film. **Food Chemistry**, v. 132, n. 1, p. 344–350, maio 2012. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814611015615>. Acesso em: 11 mar. 2022.