UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE ZOOTECNIA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS

LAURA MARÍA REYES MÉNDEZ

Produção, caracterização e estudo da estabilidade de filmes à base de gelatina e extrato de própolis vermelha enriquecidos com óleos essenciais de manjericão (*Ocicum basilicum*), cravo (*Syzygium aromaticum*) ou hortelã (*Mentha piperita*)

Pirassununga

2017

LAURA MARÍA REYES MÉNDEZ

Produção, caracterização e estudo da estabilidade de filmes à base de gelatina e extrato de própolis vermelha enriquecidos com óleos essenciais de manjericão (*Ocicum basilicum*), cravo (*Syzygium aromaticum*) ou hortelã (*Mentha piperita*)

(Versão corrigida)

Tese apresentada à Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Ciências do programa de pós-graduação de Engenharia de Alimentos

Área de concentração: Ciências da Engenharia de Alimentos

Orientador: Prof. Dr. Paulo José do Amaral Sobral

Pirassununga

2017

Ficha catalográfica elaborada pelo
Serviço de Biblioteca e Informação, FZEA/USP, com os
dados fornecidos pelo (a) autor (a)

R456p

Reyes Mendez, Laura Maria
Produção, caracterização e estudo da estabilidade de filmes à base de gelatina e extrato de própolis vermelha enriquecidos com óleos essenciais de man / Laura Maria Reyes Mendez; orientador Paulo José do Amaral Sobral. -- Pirassununga, 2017.
159 f.

Tese (Doutorado - Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos) -- Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo.

1. Antimicrobianos. 2. antioxidantes. 3. biopolimeros. 4. filmes ativos. 5. carne. I. Sobral, Paulo José do Amaral, orient. II. Título.

Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte - o autor

Dedico à minha mãe Ludis, pelo amor e apoio incondicional, ao meu irmão Álvaro pela amizade e encorajamento e a minha família pela confiança e compreensão...

Amo muito vocês.....Obrigada!!!

AGRADECIMIENTOS

À Deus todo poderoso, pela vida e a força espiritual que precisei para enfrentar cada uma das minhas decisões, meus objetivos e desafios durante esta longa jornada de formação profissional.

À Ludis Teresa Mendez, minha mãe, por todo o amor, a força moral e sua amizade única e incondicional, pelo apoio contínuo e orientação nas decisões ao longo da minha vida. Obrigada, minha mãe, por estar perto sem importar a distância.

À Álvaro Andrés Reyes, meu irmão, por dar-me sempre uma voz de encorajamento e apoiar-me nas decisões que marcaram cada etapa da minha vida.

À Rodrigo Alberto Reyes, meu pai, meus avós Gilma e Ricardo, que do céu cuidam, protegem e guiam cada um dos meus passos.

A meus Tios Alfonso, Ricardo, Germán e Marina, meus primos Eduardo, Viviana, Juan Camilo, Ana Sofia e Sara Lucia pelo amor e apoio, por ter acreditado em mim e nas minhas decisões, por fazer este processo mais fácil com cada palavra de ânimo. Muito obrigada, família.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Paulo José do Amaral Sobral, pela oportunidade de me receber como sua aluna, por me ajudar a crescer como profissional e como pessoa, pela paciência neste processo de formação. Muito obrigada por me permitir trabalhar e aprender com você.

Aos técnicos de laboratório Ana Mônica e Rodrigo, pela colaboração e ajuda na realização do meu projeto, pela paciência e disponibilidade em me ajudar ao longo da minha estadia no laboratório.

Aos colegas do Laboratório de Tecnologia de Alimentos pelo apoio, ajuda e amizade, principalmente Germán e Cristian.

À Profa. Dra. Mariza Landgraf por disponibilizar o Laboratório de microbiologia de alimentos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas- USP para realização de algumas análises.

À Profa. Dr. Andrezza Maria Fernandes e ao pessoal do Laboratório multiusuário de microbiologia pela ajuda e disposição na realização de algumas análises.

À Guillermo Salamanca Grosso, por sua confiança e amizade, por acreditar em mim, pelo incentivo a continuar com minha formação profissional e orientação ao longo de 10 anos. Muito obrigada Guille, nunca vou esquecer suas palavras de apoio e lealdade.

Aos meus amigos colombianos e brasileiros, que, mais que amigos, fomos família. No meu coração sempre guardarei lindas lembranças de cada aniversário, cada comemoração, cada almoço..... A gente se vê em breve...

À minha amiga de coração, Caro, muito obrigada por sempre cuidar de mim, por me escutar e aconselhar. Por nunca me deixar sozinha e ter muita paciência.....Sempre levarei você no meu coração.

À Thaysa e Hugo por terem me acolhido em sua casa no início desta jornada. Nunca vou esquecer, e serei sempre grata. Muito obrigada

À todos os professores da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos que contribuíram com o meu processo de formação.

À CAPES/CNPq pela concessão da bolsa de doutorado do programa de estudante – convênio de pós-graduação PEC-PG Edital N° 042/2012.

À todas as pessoas que me apoiaram para alcançar esta meta..... Muito obrigada.

“Mesmo quando tudo parece desabar, cabe em mim decidir entre rir ou chorar, ir ou ficar, desistir ou lutar, porque descobri, no caminho incerto da vida, que o mais importante é decidir”.

Cora Coralina

“Los seres humanos no nacen para siempre el día en que sus madres los alumbran, sino que la vida los obliga a parirse a sí mismos una y otra vez”

Gabriel García Márquez

RESUMO

REYES, M. L. M. **Produção, caracterização e estudo da estabilidade de filmes à base de gelatina e extrato de própolis vermelha enriquecidos com óleos essenciais de manjericão (*Ocicum basilicum*), cravo (*Syzygium aromaticum*) ou hortelã (*Mentha piperita*)**. 2017. 159 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2017.

Os óleos essenciais e a própolis vermelha são reconhecidos pela atividade antimicrobiana e capacidade antioxidante, e têm sido utilizados em filmes à base de biopolímeros como agentes ativos. O objetivo geral desta tese foi o desenvolvimento de filmes à base de gelatina contendo extrato etanólico de própolis vermelha (EEP) e óleo essencial de cravo (OE cravo), de manjericão (OE manjericão) ou de hortelã (OE hortelã), e aplicação na conservação de carne bovina moída. O EEP e OE´s foram caracterizados em relação ao conteúdo de fenóis totais, atividade antioxidante (ABTS e DPPH) e atividade antimicrobiana contra bactérias Gram (+) *S. aureus*, *L. monocytogenes* e bactérias Gram (-) *E. coli* e *S. enteritidis*. Foram elaborados filmes com diferentes concentrações de OE´s (8 tratamentos) seguindo um delineamento experimental simplex com dois componentes, e quatro filmes controles: gelatina; gelatina e EEP, gelatina e OE cravo, gelatina e OE manjericão. Os filmes foram caracterizados em relação a conteúdo de fenóis, capacidade antioxidante, atividade antimicrobiana, umidade e solubilidade, propriedades mecânicas (tração e perfuração), propriedades óticas e barreira à luz, permeabilidade ao vapor de água (PVA). Também foram realizadas análises por espetroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), por difração de raios x (DXR), por calorimetria diferencial de varredura (DSC), e por microscopia eletrônica de varredura (SEM) e microscopia de força atômica (AFM). O filme ativo que apresentou melhor atividade antimicrobiana e capacidade antioxidante e os filmes controles, foram acondicionados a 4 °C e 58%UR por quatros semanas para avaliação da estabilidade antioxidante e antimicrobiana. Amostras de carne bovina moída foram recobertas com o filme ativo e filmes controles, e acondicionadas a 4 ± 2 °C por 10 dias, com avaliações nos dias 0, 3, 7 e 10 de parâmetros cromáticos, índice de peróxidos (IP) e atividade antimicrobiana frente a coliformes totais, aeróbios mesófilos e *S. aureus*. Observou-se que o EEP apresentou capacidade antioxidante

e atividade antimicrobiana, dependentes do tratamento de extração. Foram adicionados no filme de gelatina o EO cravo e OE manjericão por apresentarem atividade antimicrobiana e capacidade antioxidante maior que OE hortelã. A adição de EEP e OE´s na matriz de gelatina proporcionou um aumento no conteúdo de fenóis totais nos filmes. As propriedades mecânicas foram alteradas com a adição dos OE´s e propriedades óticas e barreira a luz UV-Vis pela adição de EEP. A umidade, solubilidade, PVA não foram modificadas drasticamente com a adição dos compostos ativos. Propriedades térmicas, cristalinidade e os resultados das análises espectrofotométricas FTIR apresentaram discretas modificações. O filme ativo e filmes controles diminuíram o crescimento microbiano nas amostras de carne bovina moída comparado com à amostra controle, além de apresentar diminuição no IP ao longo do tempo. Pode-se concluir que a adição de EEP e OE´s melhorou algumas propriedades físicas, além de conferir atividade antimicrobiana e antioxidante aos filmes de gelatina que podem ser aplicados na conservação de alimentos de baixa ou intermediária umidade e susceptíveis à oxidação lipídica.

Palavras-chave: Antimicrobianos. Antioxidantes. Biopolímeros. Filmes ativos. Carne.

ABSTRACT

REYES, M. L. M. **Production, characterization and stability study of gelatine-based films and red propolis extract enriched with essential oils of basil (*Ocicum basilicum*), clove (*Syzygium aromaticum*) or mint (*Mentha piperita*).** 2017. 159 f. PhD Thesis – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2017.

Essential oils and red propolis are recognized by its antimicrobial activity and antioxidant capacity, and have been used in films based on biopolymers as active agents. The general objective of this thesis was the development of gelatin-based films added with red propolis ethanolic extract (EEP) and essential oil of clove (OE clove), basil (OE basil) and mint (OE mint), and its application for conservation of ground beef. The EEP and OE's were characterized in relation to the total phenol content, antioxidant capacity (ABTS and DPPH) and antimicrobial activity against Gram (+) bacteria *S. aureus*, *L. monocytogenes* and Gram (-) bacteria *E. coli* and *S. enteritidis*. Films with different concentrations of EO clove and EO basil (8 treatments), following a simplex experimental design with two components, and four control films were prepared: gelatin, gelatin and EEP, gelatin and OE clove, gelatin and OE basil. The films were characterized in relation to phenols content, antioxidant capacity, antimicrobial activity, moisture and solubility, mechanical properties (tensile strength and puncture tests), optical properties and light barrier, water vapor permeability (WVP). Moreover, analyses were performed by fourier transform infrared spectroscopy (FTIR), by X-ray diffraction (DXR), by differential scanning calorimetry (DSC), and by scanning electron microscopy (SEM) and atomic force microscopy (AFM). The active film that showed better antimicrobial and antioxidant capacity and controls films were stored at 4 °C and 58% RH for four weeks to evaluate antioxidant and antimicrobial stability. Ground beef were coated with active film and controls films and conditioned at 4 ± 2 ° C for 10 days, with evaluations on days 0, 3, 7 and 10 of the color parameters, peroxide value (PV) and antimicrobial activity against total coliforms, aerobic mesophiles and *S. aureus*. The EEP presented antioxidant capacity and antimicrobial activity, depending on the extraction treatment. OE clove and OE basil were added to the gelatin film because they presented antimicrobial activity and antioxidant capacity higher than OE mint. The addition of EEP and OE's in the gelatin matrix provoked an increase in the content of total phenols in films. The mechanical properties were altered with the addition of OE's and optical

properties and UV-Vis light barrier by addition of EEP. The moisture, solubility, PVA did not change strongly with the addition of the active compounds. Thermal properties, crystallinity and FTIR spectrophotometric results presented slight modifications. The active film and control films decreased the microbial growth in ground beef samples compared to the control sample, besides showing decrease in the PV over time. It can be concluded that the addition of EEP and OE's improved some physical properties, besides conferring antimicrobial and antioxidant activity to the gelatin films that can be applied in the preservation of foods of low or intermediate moisture and susceptible to lipid oxidation.

Keywords: Antimicrobials. Antioxidants. Biopolymers. Active films. Meat.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Compostos identificados em própolis vermelha: transanetol (1), metil eugenol (2), trans-metil eugenol (3), elemicina (4) e tarns-isoelemicina (5), 20(29)-lupen-3-ona (6), 2,3-epoxi-2-(3-metil-2-butenil)-1,4-naftalenediona (7), α-amirina (8), β-amirina (9), cicloartenol..... 24
Figura 1 - Compostos identificados em própolis vermelha: cicloartenol (10), lupeol (11), isoflavona isosativam (12) e terocarpano medicarpina (13)..... 25
Figura 2 - (a) Própolis vermelha bruta, (b) Própolis vermelha moída, (c) Extratos etanólicos de própolis vermelha (EEP)..... 39
Figura 3 - Fluxograma da produção de filmes ativos produzidos com gelatina, EEP, OE de cravo e OE de manjericão..... 46
Figura 4 - Aplicador automático de filmes do Laboratório de Tecnologia de Alimentos. USP/FZEA..... 47
Figura 5 - Texturômetro TA.XT2i usado nos testes de perfuração (a) e tração (b) dos filmes ativos..... 52
Figura 6 - Colorímetro Miniscan EZ (a) e glossímetro Rhopoint 20/60 (b) 53
Figura 7 - Sistema de células usado na determinação da permeabilidade ao vapor de agua dos filmes ativos..... 55
Figura 8 - Espectrofotômetro Spectrum Onen usado nas análises de espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier FTIR em filmes ativos..... 55
Figura 9 - Calorímetro diferencial de varredura TA DSC 2010..... 56
Figura 10 - Microscópio eletrônico de varredura Hitachi, TM3000..... 57
Figura 11 - Microscópio de força atômica NT-MDT SOLVER NEXT SPM..... 58
Figura 12 - Processo de elaboração, aplicação e acondicionamento de carne bovina moída (Contrafilé) em forma de hambúrguer embalada com filmes ativos..... 59
Figura 13 - Colorímetro Miniscan EZ usado no teste de cor em carne bovina moída (Contrafilé) em forma de hambúrguer 60
Figura 14 - Processo de extração lipídica da carne moída. Homogeneização da amostra (a). Centrifugação solução (b). Separação fase clorofórmica (c). Amostra filtrada (d) 61
Figura 15 - Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) dos extratos etanólicos de própolis vermelha na faixa de 4000 – 650 cm^{-1}..... 71
Figura 16 - Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) dos extratos etanólicos de própolis vermelha na faixa de 1800 – 650 cm^{-1}..... 72
Figura 17 - Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) dos óleos essenciais na faixa de 4000 – 650 cm^{-1}..... 80
Figura 18 - Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) dos óleos essenciais na faixa de 4000 – 650 cm^{-1}..... 81
Figura 19 - Atividade antimicrobiana do óleo essencial de cravo (a) *S. enteritidis*, (b) *S. aureus*, (c) *L. monocytogenes*, (d) *E. coli*..... 84
Figura 20 - Atividade antimicrobiana do óleo essencial de manjericão (a) *S. enteritidis*, (b) *S. aureus*, (c) *L. monocytogenes*, (d) *E. coli*..... 85
Figura 21 - Atividade antimicrobiana do óleo essencial de hortelã (a) *S. enteritidis*, (b) *S. aureus*, (c) *L. monocytogenes*, (d) *E. coli*..... 86

Figura 22 - Exemplos das análises do teste de sensibilidade dos filmes ativos frente a bactéria Gram (-) *S. enteritidis*..... 92
Figura 23 - Exemplos das análises do teste de sensibilidade dos filmes ativos frente a bactéria Gram (+) *S. aureus*..... 93
Figura 24 - Exemplos do aspecto visual dos filmes ativos com adição de extrato etanólico de própolis vermelha (a) e filmes controle com gelatina (b) e óleo essencial de cravo (c) e de manjericão (d) 102
Figura 25 - Propriedades de barreira a luz ultravioleta e luz visível dos filmes ativos..... 106
Figura 26 - Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) dos Filmes ativos: F1, F2, F3, F4, F5, F6, F7 e F8..... 110
Figura 27 - Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) dos Filmes controle: C1, C2, C3 e C4..... 111
Figura 28 - Exemplos de termogramas dos filmes ativos F1(a), F2 (b), F4 (c), F5 (d) e F6 (e) 113
Figura 29 - Exemplos de termogramas dos filmes ativos controle C1(a), C2 (b), C3 (c) e C4 (d) 114
Figura 30 - Micrografias dos filmes ativos na superfície de secagem F1 (a), (b), F2 (d), (e), F3 (g), (h) e F4 (j), (k) e criofraturada F1 (c), F2 (f), F3 (i) e F4 (l) 117
Figura 31 - Micrografias dos filmes ativos na superfície de secagem F5 (a), (b), F6 (d), (e), F7 (g), (h) e F8 (j), (k) e criofraturada F5 (c), F6 (f), F7 (i) e F8 (l) 118
Figura 32 - Micrografias dos filmes ativos controle na superfície de secagem C1 (a), (b), C2 (d), (e), C3 (g), (h) e C4 (j), (k) e criofraturada C1 (c), C2 (f), C3 (i) e C4 (l) 119
Figura 33 - Micrografias de AFM dos filmes ativos (Controles): C1 (a,b), C2 (c,d), C3 (e,f) e C4 (g,h)..... 122
Figura 34 - Micrografias de AFM dos filmes ativos: F1 (a,b), F2 (c,d), F4 (e,f), F5 (g,h) e F6 (i,j) 123
Figura 35 - Difratogramas dos filmes ativos e os controles C1, C2, C3 e C4..... 125
Figura 36 - Resultados do conteúdo de fenóis totais do filme ativo F1 e os controles C1, C2, C3 e C4 ao longo do tempo (28 dias) 126
Figura 37 - Resultados de inibição do radical $DPPH^{\bullet}$ do filme ativo F1 e os controles C1, C2, C3 e C4 ao longo do tempo (28 dias) 127
Figura 38 - Resultados de inibição do radical $ABTS^{\bullet+}$ do filme ativo F1 e os controles C1, C2, C3 e C4 ao longo do tempo (28 dias) 128
Figura 39 - Resultados atividade antimicrobiana do filme ativo F1 e os controles C3 e C4 frente a *Salmonella enteritidis* ao longo do tempo (28 dias) 129
Figura 40 - Resultados atividade antimicrobiana do filme ativo F1 e os controles C1, C2, C3 e C4 frente a *Staphylococcus aureus* ao longo do tempo (28 dias) 130
Figura 41 - Resultados do índice de peróxidos (IP) em carne bovina moída em forma de hambúrguer recoberta com o filme ativo F1, os controles C2, C3 e C4 durante 10 dias de armazenagem..... 134
Figura 42 - Efeito do filme ativo F1 e os Controles C2, C3 e C4 em carne bovina moída em forma de hambúrguer acondicionada a 4 ± 2 °C contra coliformes totais..... 136
Figura 43 - Efeito do filme ativo F1 e os Controles C2, C3 e C4 em carne bovina moída em forma de hambúrguer acondicionada a 4 ± 2 °C contra *S. aureus*..... 137

Figura 44 - Efeito do filme ativo F1 e os Controles C2, C3 e C4 em carne bovina moída em forma de hambúrguer acondicionada a 4 ± 2 °C contra aeróbios mesófilos..... 138

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Exemplos de aplicações de filmes e recobrimentos biodegradáveis em produtos cárneos..... 36
Tabela 2 - Proporções dos componentes no planejamento experimental Simplex com 2 componentes..... 48
Tabela 3 - Matriz do planejamento experimental Simplex com 2 componentes e controles.. 48
Tabela 4 - Conteúdo de fenóis totais dos extratos etanólicos de própolis vermelha..... 63
Tabela 5 - Conteúdo de flavonoides dos extratos etanólicos de própolis vermelha..... 65
Tabela 6 - Conteúdo do extrato seco dos extratos etanólicos de própolis vermelha..... 66
Tabela 7 - Resultados da capacidade antioxidante das amostras de extratos etanólicos de própolis vermelha quantificada pelo grau de descoloração do radical DPPH$^{\bullet}$..... 68
Tabela 8 - Resultados da capacidade antioxidante das amostras de extratos etanólicos de própolis vermelha quantificada pelo grau de descoloração do radical ABTS•+..... 69
Tabela 9 - Principais sinais característicos dos extratos etanólicos de própolis vermelha nos espectros FTIR..... 73
Tabela 10 - Atividade antimicrobiana dos extratos etanólicos de própolis vermelha contra *S. aureus*..... 74
Tabela 11 - Concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) do extrato etanólico de própolis vermelha B4..... 76
Tabela 12 - Conteúdo de fenóis totais dos óleos essenciais 77
Tabela 13 - Resultados da capacidade antioxidante dos óleos essenciais quantificada pelo grau de descoloração do radical DPPH$^{\bullet}$..... 77
Tabela 14 - Resultados da capacidade antioxidante dos óleos essenciais quantificada pelo grau de descoloração do cátion ABTS$^{\bullet+}$..... 78
Tabela 15 - Principais sinais características dos óleos essenciais nos espectros FTIR..... 82
Tabela 16 - Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais contra *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *S. enteritidis* e *E. coli*..... 83
Tabela 17 - Concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) dos mínima..... 87
Tabela 18 - Conteúdo de fenóis totais dos Filmes ativos..... 89
Tabela 19 - Resultados da capacidade antioxidante dos Filmes ativos, quantificada pelo grau de descoloração do radical DPPH$^{\bullet}$ e do radical ABTS$^{\bullet+}$..... 90
Tabela 20 - Atividade antimicrobiana dos Filmes ativos contra *S. aureus* e *S. enteritidis* .. 94
Tabela 21 - Valores médios de umidade e solubilidade dos Filmes ativos..... 96
Tabela 22 - Propriedades mecânicas determinadas por teste tração dos Filmes ativos..... 98
Tabela 23 - Valores médios do teste perfuração associados aos Filmes ativos..... 101
Tabela 24 - Valores médios dos parâmetros cromáticos L, a*, b* e diferença de cor (DE) dos Filmes ativos..... 103
Tabela 25 - Valores médios da opacidade (Opa) e brilho dos Filmes ativos..... 105
Tabela 26 - Valores médios de Permeabilidade ao vapor de água (PVA) dos Filmes ativo 108
Tabela 27 - Resultados dos parâmetros obtidos das análises térmicas dos filmes ativos e os controles..... 115
Tabela 28 - Exemplos de valores médios de Rugosidade Ra e Rq dos filmes ativos..... 121
Tabela 29 - Valores médios dos parâmetros cromáticos L, a* e b* na superfície do hambúrguer de carne bovina recoberta com o filme ativo F1, os controles C2, C3 e C4 durante 10 dias de armazenagem..... 132

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO..... 17
2 OBJETIVOS 19
3 REVISÃO DE LITERATURA..... 20
3.1 A Própolis..... 20
3.1.1 Características e composição..... 20
3.1.2 A própolis vermelha 22
3.2 Óleos essenciais 26
3.2.1 Características e composição 26
3.2.2 Atividade antimicrobiana 28
3.2.3 Mecanismos de ação antimicrobiana..... 30
3.3 Embalagens ativas 31
3.3.1 Aplicação em alimentos..... 34
4 MATERIAL E MÉTODOS..... 38
Material..... 38
4.1 Extração e caracterização da própolis vermelha (EEP) 39
4.1.1 Conteúdo de Fenóis totais..... 39
4.1.2 Conteúdo de Flavonoides..... 40
4.1.3 Extrato seco..... 40
4.1.4 Capacidade antioxidante..... 40
4.1.4.1 Determinação da atividade antioxidante pela captura do radical livre DPPH$^{\bullet}$..... 41
4.1.4.2 Determinação da atividade inibitória do radical livre 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin) -6-ácido sulfônico (ABTS$^{\bullet+}$) 41
4.1.5 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) 42
4.1.6 Atividade antimicrobiana..... 42
4.1.6.1 Teste de sensibilidade..... 42
4.1.6.2 Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) 43
4.2 Caracterização dos óleos essenciais..... 43
4.2.1 Conteúdo de Fenóis totais..... 43
4.2.2 Capacidade antioxidante..... 43
4.2.2.1 Determinação da atividade antioxidante pela captura do radical livre DPPH$^{\bullet}$..... 44
4.2.2.2 Determinação da atividade inibitória do radical livre 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin) -6-ácido sulfônico (ABTS$^{\bullet+}$) 44
4.2.3 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) 44
4.2.4 Atividade antimicrobiana..... 44
4.2.4.1 Teste de sensibilidade..... 44
4.2.4.2 Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) 45
4.3 Produção dos filmes..... 45

4.3.1 Desenho experimental..... 47
4.3.2 Conteúdo de fenóis totais..... 49
4.3.3 Capacidade antioxidante..... 49
4.3.3.1 Determinação da atividade antioxidante pela captura do radical livre DPPH$^{\bullet}$..... 49
4.3.3.2 Determinação da atividade inibitória do radical livre 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin) -6-ácido sulfônico (ABTS$^{\bullet+}$) 50
4.3.4 Atividade antimicrobiana..... 50
4.3.5 Umidade e Solubilidade..... 50
4.3.6 Propriedades mecânicas..... 51
4.3.7 Parâmetros cromáticos..... 52
4.3.8 Barreira a radiação à luz UV-Visível..... 54
4.3.9 Permeabilidade ao vapor de água..... 54
4.3.10 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) 55
4.3.11 Calorimetria diferencial de varredura (DSC) 56
4.3.12 Microscopia eletrônica de varredura (SEM) 57
4.3.13 Microscopia de força atômica (AFM) 57
4.3.14 Cristalinidade 58
4.4 Avaliação do efeito do tempo de armazenamento na estabilidade da atividade antioxidante e atividade antimicrobiana da matriz polimérica..... 58
4.5 Aplicação dos filmes ativos em carne bovina moída (Contrafilé) em forma de hambúrguer..... 59
4.5.1 Parâmetros cromáticos na superfície do produto..... 60
4.5.2 Extração lipídica..... 60
4.5.3 Determinação do índice de peróxidos (IP) 61
4.5.4 Análise microbiológica..... 62
4.6 Análise estatística..... 62
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO 63
5.1 Extração e caracterização da própolis vermelha (EEP) 63
5.1.1 Conteúdo de Fenóis totais..... 63
5.1.2 Conteúdo de Flavonoides..... 64
5.1.3 Extrato seco..... 66
5.1.4 Capacidade antioxidante..... 67
5.1.5 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) 70
5.1.6 Atividade antimicrobiana..... 74
5.1.6.1 Teste de sensibilidade..... 74
5.1.6.2 Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) 75
5.2 Caracterização dos óleos essenciais..... 76
5.2.1 Conteúdo de Fenóis totais e capacidade antioxidante..... 76

5.2.3 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) 79
5.2.4 Atividade antimicrobiana..... 83
5.2.4.1 Teste de sensibilidade, Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) 83
5.3 Produção dos filmes..... 88
5.3.1 Conteúdo de fenóis totais e capacidade antioxidante..... 88
5.3.2 Atividade antimicrobiana..... 91
5.3.3 Umidade e Solubilidade..... 95
5.3.4 Propriedades mecânicas..... 97
5.3.5 Parâmetros cromáticos..... 101
5.3.6 Barreira a luz..... 105
5.3.7 Permeabilidade ao vapor de água..... 107
5.3.8 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) 109
5.3.9 Calorimetria diferencial de varredura (DSC) 112
5.3.10 Microscopia eletrônica de varredura (SEM) 116
5.3.11 Microscopia de força atômica (AFM) 120
5.3.12 Cristalinidade..... 124
5.4 Avaliação do efeito do tempo de armazenamento na estabilidade da atividade antioxidante e atividade antimicrobiana da matriz polimérica..... 125
5.5 Aplicação dos filmes ativos em carne bovina moída (Contrafilé) em forma de hambúrguer..... 131
5.5.1 Parâmetros cromáticos na superfície do produto..... 131
5.5.2 Determinação do índice de peróxidos (IP) 133
5.5.3 Análise microbiológica..... 135
6 CONCLUSÕES..... 140
REFERÊNCIAS 142

1 INTRODUÇÃO

Para aumentar a vida de prateleira dos produtos de origem animal e vegetal, tem se implementado diferentes tecnologias como o uso de baixas temperaturas, uso de embalagens com atmosferas modificadas, processos de irradiação, tratamentos hidrotérmicos, entre outros (QUEZADA et al., 2003; RAMOS-GARCÍA; BAUTISTA-BAÑOS; BARRERA-NECHA, 2010). Uma alternativa potencialmente viável para a preservação de frutas, hortaliças e produtos cárneos é a utilização de filmes e recobrimentos comestíveis ou biodegradáveis, que podem ser produzidos com ingredientes ativos, tais como antioxidantes, corantes e antimicrobianos, que, no caso deste último, poderia evitar o crescimento de patógenos e deteriorantes na superfície dos produtos, aumentando a vida de prateleira dos mesmos e conferindo, desta forma, uma maior funcionalidade aos materiais (ALBOOFETILEH et al., 2014; CAGRI; USTUNOL; RYSER, 2004; RAMOS-GARCÍA; BAUTISTA-BAÑOS; BARRERA-NECHA, 2010; TORLAK; SERT, 2013).

Vários estudos têm apontado as vantagens e possíveis aplicações de filmes biodegradáveis como embalagem (BONILLA et al., 2012; FERNÁNDEZ-PAN; CARRIÓN-GRANDA; MATÉ, 2014; GÓMEZ-ESTACA et al., 2010; HAFSA et al., 2016; MATAN, 2012; SIRIPATRAWAN; VITCHAYAKITTI, 2016), embora uma das principais dificuldades na aplicação em alimentos é que as principais macromoléculas utilizadas na produção de filmes são as proteínas e polissacarídeos, que têm boas propriedades mecânicas, mas são altamente permeáveis à água, devido à sua natureza hidrofílica e higroscópica (ANKER et al., 2002; KRISTO; BILIADERIS; ZAMPRAKA, 2007).

Assim, a adição de lipídios na matriz hidrofílica pode ser uma interessante alternativa para obtenção de filmes com melhores atributos (BONILLA et al., 2011; CALO et al., 2015; CHIRALT; ATAR, 2016; FERNÁNDEZ-PAN; CARRIÓN-GRANDA; MATÉ, 2014; GHASEMLOU et al., 2013; SALGADO et al., 2013). Diversos lipídeos (ácidos graxos, ceras) estão sendo estudados visando-se a redução da permeabilidade ao vapor de água de filmes a base de biopolímeros. Nesse sentido, a incorporação de óleos essenciais (OE) representa uma alternativa interessante devido ao seu caráter hidrofóbico, melhorando as propriedades de barreira ao vapor de água dos filmes. Além disso, a presença desses componentes nos filmes pode implicar em outros efeitos positivos, tais como proteção contra o crescimento microbiano e a oxidação lipídica, constituindo assim, filmes

ativos (AHN et al., 2008; BAKKALI et al., 2008; BONILLA et al., 2012; CHIRALT; ATAR, 2016; GUTIERREZ; BARRY-RYAN; BOURKE, 2008; KUMAR et al., 2012; ROJAS-GRAÜ; SOLIVA-FORTUNY; MARTÍN-BELLOSO, 2009; ROJAS-GRAÜ et al., 2006, 2007; ZINOVIADOU; KOUTSOUMANIS; BILIADERIS, 2009).

Do mesmo modo, devido à tendência dos consumidores em obter produtos mais naturais possíveis, muitas pesquisas têm se focado na substituição de antimicrobianos e antioxidantes sintéticos por naturais, os quais são encontrados majoritariamente em plantas, ervas e especiarias (CALO et al., 2015; HOLLEY; PATEL, 2005), as quais tem sido amplamente utilizadas tanto na medicina popular quanto para aumentar a durabilidade e segurança dos alimentos (GYAWALI; IBRAHIM, 2014; PRAKASH et al., 2015; SASIDHARAN et al., 2008). Igualmente, outro produto natural amplamente conhecido por sua atividade antimicrobiana, antioxidante, anti-inflamatória, imunomoduladora, anti-hipertensivos, anestésicos, antineoplásicos, anti-HIV e anticariogênica, é a própolis (PARK; ALENCAR; AGUIAR, 2002; RIGHI et al., 2011; SALAMANCA, 2013; SALATINO et al., 2011; TRUSHEVA et al., 2006), sendo que, a própolis vermelha brasileira apresenta maior teor de fenóis, flavonoides, capacidade antimicrobiana e antifúngica que outros tipos de própolis brasileiras (ALENCAR et al., 2007; CABRAL et al., 2009; FROZZA et al., 2013; RIGHI et al., 2011).

Dessa maneira, alguns pesquisadores tem adicionado compostos naturais, como própolis, em filmes biodegradáveis (BODINI et al., 2013; CORREA et al., 2009; DRAPAK; DRAPAK; KOVALYUK, 2004; DRAPAK et al., 2006a, 2006b; MASCHERONI et al., 2010; TORLAK; SERT, 2013); e óleos essenciais (ALBOOFETILEH et al., 2014; CHANG-BRAVO; LÓPEZ-CÓRDOBA; MARTINO, 2014; FERNÁNDEZ-PAN; CARRIÓN-GRANDA; MATÉ, 2014; GÓMEZ-ESTACA et al., 2010; SÁNCHEZ ALDANA et al., 2015), proporcionando melhores características estruturais e atividade antimicrobiana, antifúngica e antioxidante, visando-se uma maior aplicação em produtos alimentícios e aumentando a vida de prateleira dos mesmos.

2 OBJETIVOS

O objetivo geral desta tese foi o desenvolvimento de filmes biodegradáveis à base de gelatina e extrato etanólico de própolis vermelha (EEP) enriquecido com óleos essenciais.

Os objetivos específicos foram:

- Determinação do melhor método de extração da própolis vermelha em relação ao conteúdo de fenóis, flavonoides e extrato seco.
- Caracterização dos óleos essenciais e do EEP em relação a atividade antimicrobiana e capacidade antioxidante.
- Implementação e otimização dos processos que contribuíram para o desenvolvimento e caracterização de filmes biodegradáveis à base de gelatina, EEP, óleo essencial de manjericão e cravo.
- Avaliação da estabilidade microbiológica e capacidade antioxidante dos filmes biodegradáveis em condições de refrigeração por um tempo determinado.
- Aplicação do filme biodegradável com melhores características microbiológicas e antioxidantes em músculo bovino moído (Contrafilé) para avaliação da vida de prateleira.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 A Própolis

3.1.1 Características e composição

A própolis é uma substância de natureza complexa, elaborada pelas abelhas a partir de resinas, pólen e óleos essenciais de diversas partes das plantas. Sua composição depende da época, vegetação e local de coleta (NUNES et al., 2009; PARK; ALENCAR; AGUIAR, 2002; SALAMANCA; CORREA; PRINCIPAL, 2007). Pode ser definida como uma mistura complexa de origem biológica elaborada a partir de resinas, bálsamos, gomas e outras exsudações das plantas, que a abelha *Apis melífera* recolhe e modifica, adicionando-lhes ceras, pólen e enzimas, entre outros materiais (FARRÉ; FRASQUET; SÁNCHEZ, 2004; SALAMANCA; CORREA; PRINCIPAL, 2007). A própolis apresenta natureza lipofílica, consistência dura e quebradiça, mas torna-se mole, flexível, gomosa e muito pegajosa quando aquecida. Até cerca de 15 °C a própolis é dura, e torna-se maleável com o aumento da temperatura. Possui um ponto de fusão entre 60 e 70 °C (SALAMANCA, 2013). O odor aromático e característico, além da cor que, vai desde o verde e amarelo até vermelho e marrom, depende da origem botânica e idade da própolis.

A composição da própolis é complexa, já que depende da origem botânica e geográfica (POPOVA et al., 2005, 2007; TRUSHEVA et al., 2006). Segundo Burdock (1998) e Salamanca et al. (2007), no geral, a composição da própolis é fração resinosa (40-50%); ceras (8-12%), compostos da fração volátil (3-5%), pólen e materiais de aglomeração (3-5%), apresentando alguns microelementos como alumínio, cálcio, estrôncio, ferro, cobre, manganês e pequenas quantidades de vitaminas B1, B2, B6, C e E. Atualmente são conhecidos mais de 300 compostos diferentes, principalmente flavonoides, ácidos aromáticos, ésteres, aldeídos e cetonas, agliconas, ésteres de ácidos graxos, terpenos, esteroides, aminoácidos, polissacarídeos, hidrocarbonetos e álcoois, entre outros (BURDOCK, 1998; LOTTI et al., 2011; LU; CHEN; CHOU, 2005; SALAMANCA, 2013).

Os compostos que formam a estrutura da própolis são diversos segundo a natureza química dos constituintes, encontrando-se os ácidos alifáticos e seus ésteres que apresentam cadeias alifáticas entre 10 e 14 átomos de carbono e são aportados principalmente por cera de abelhas (Cadeias longas) e exsudações das plantas (Cadeias curtas). Encontra-se também o grupo de

compostos da própolis derivados do ácido cinâmico que apresentam atividade antifúngica e antibacteriana, com ação fitoinibidora ou antigerminativa e o cafeato de prenilo (BANKOVA; MARCUCCI, 2000; BANKOVA et al., 2002). Outros compostos com princípios ativos são as hidroquinonas, álcool benzílico, álcool feniletílico, álcool cinâmico, α e β derivados do glicerofosfato e vanilina. Entre os flavonoides presentes na própolis, as chalconas são consideradas como responsáveis pela atividade biológica da mesma, principalmente pela ação antibacteriana, antifúngica, antitumoral e anti-inflamatória. Algumas cetonas e terpenóides estão presentes na matriz da própolis, como minerais, vitaminas do complexo B, provitamina A, polissacarídeos e aminoácidos (SALAMANCA, 2013).

A própolis é uma fonte natural de antioxidantes (ALENCAR et al., 2007; CABRAL et al., 2012; POPOVA et al., 2004; TRUSHEVA et al., 2006). Suas propriedades são devidas à sua atividade anti radical, particularmente frente ao radical alcóxi e, em menor medida, superóxido, e ao efeito inibidor sobre o íon de cobre, o iniciador da oxidação da lipoproteína de baixa densidade (FARRÉ; FRASQUET; SÁNCHEZ, 2004; SALAMANCA; CORREA; PRINCIPAL, 2007). É por isso que os constituintes de maior interesse na própolis são os compostos fenólicos que constituem cerca ao 50% do peso total extraídos; dentre eles encontra-se flavonoides que apresentam em sua estrutura química um número variável de grupos hidroxilo fenólicos com propriedades quelantes com o ferro e outros metais de transição como Fe^{2+}, Cu^{2+}, Zn^{2+}, o que confere uma alta capacidade antioxidante (CLAUS et al., 2000; ISLA et al., 2001, 2005). Na própolis europeia são predominantes os flavonoides enquanto na brasileira são mais abundantes os ácidos fenólicos (PALOMINO et al., 2010). Outros compostos fenólicos presentes na própolis são os ácidos p-cumárico, caféico, felúrico e ésteres destes ácidos (SALAMANCA, 2013).

Atualmente, a própolis é reconhecida no mundo e tem sido registrada no sistema *Chemical Abstracts Servic*e (CAS) 9009-62-5, como produto apícola resinoso e complexo, com uma variável aparência física, colhida e transformada pelas abelhas melíferas (*A. melífera*), que varia dependendo da vegetação que visitam. Em quase todos os países do mundo, a própolis tem sido reconhecida e seu uso é regulamentado como produto para consumo humano, bem como produto medicinal ou aditivo em produtos cosméticos ou alimentos (SALAMANCA, 2013). Ela é usada na indústria farmacêutica, tanto para a medicina veterinária quanto para a medicina humana, na agricultura, cosmética e na indústria alimentícia; na elaboração de bebidas e alimentos funcionais,

como conservante de frutas em pós-colheita e alimentos congelados (FARRÉ; FRASQUET; SÁNCHEZ, 2004; PALOMINO, 2009; TOSI et al., 2007).

É por isso que vários pesquisadores têm demostrado a atividade antimicrobiana e antifúngica da própolis frente a vários microrganismos, sendo mais efetiva em bactérias Gram (+) e fungos (FARRÉ; FRASQUET; SÁNCHEZ, 2004; PALOMINO et al., 2010). A atividade antimicrobiana e antifúngica é atribuída aos componentes cinâmicos e flavonoides, que alteram a membrana ou parede celular do microrganismo causando danos funcionais e estruturais, além da inibição do RNA-polimerase bacteriano (FARRÉ; FRASQUET; SÁNCHEZ, 2004; HEINZE et al., 1998; MIRZOEVA; GRISHANIN; CALDER, 1997; UZEL et al., 2005).

Dentre os microrganismos sobre os quais a própolis tem efeito, encontram-se *Bacillus larvae*, *B. subtilis*, *B.* da tuberculose, *Staphylococcous auereus*, *Streptomyces sobrinus*, *S. mutans*, *S. cricetus*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Shigella*, *Giardia lambia*, *Bacteroides nodosos* e *Klebsiella pneumoniae* (FARRÉ; FRASQUET; SÁNCHEZ, 2004; MIRZOEVA; GRISHANIN; CALDER, 1997; MORENO et al., 2000). Na própolis brasileira, Bankova e Marcucci (2000), Marcucci et al. (2001) e Sfornin et al. (2000), tem identificado compostos fenólicos como o ácido 3,5-diprenil-p-cumárico que possui atividade antibacteriana frente a *Escherichia coli*, *Pseudômonas aeuroginosa*, *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus faecalis*.

3.1.2 A própolis vermelha

A própolis brasileira foi classificada em doze grupos por Park, Alencar e Aguiar (2002), baseando-se nas características físico-químicas, na região geográfica de origem e na vegetação de onde foi extraída: cinco no grupo da região sul (Grupo 3), um no Sudeste (Grupo 12) e seis no Nordeste (Grupo 6), com diferenças em composição e novos compostos com atividade biológica como os derivados do ácido cinâmico, artepilina C e flavonoides, principalmente, próprios da própolis verde. Porém, a própolis vermelha, a qual é encontrada, sobretudo nas áreas litorâneas das regiões norte e nordeste do Brasil, ainda é pouco estudada (NUNES et al., 2009), e é classificada

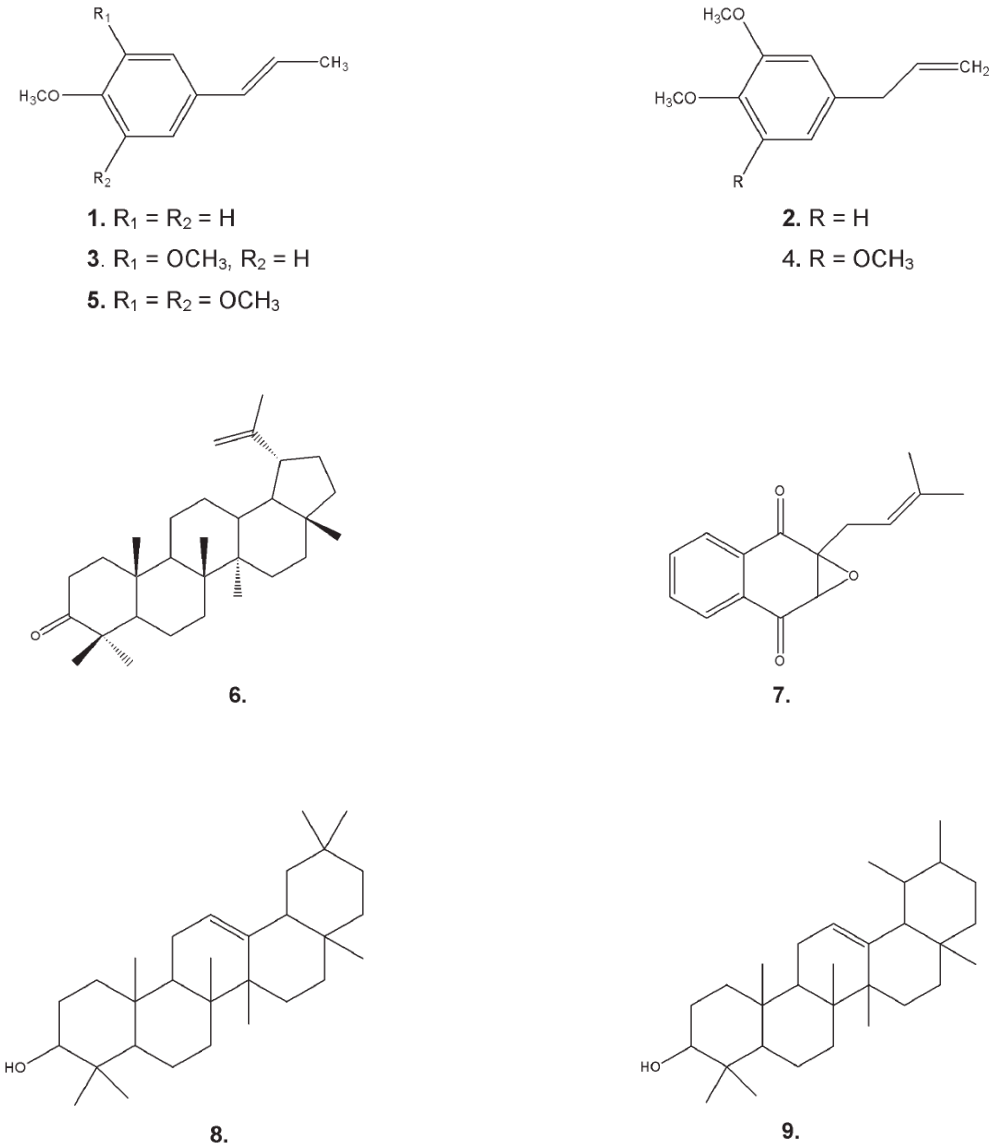
como o grupo 13 (ALENCAR et al., 2007; CABRAL et al., 2009; SILVA et al., 2008; TRUSHEVA et al., 2006).

Com tudo isso, novas fontes de espécies vegetais para a elaboração de própolis por parte da *A. mellífera* e diversas espécies do gênero Melipona, tem sido reportadas. A leguminosa *Dalbergia ecastophyllum* L., espécie endêmica do nordeste do Brasil, estado de Alagoas, Bahia, Paraíba, Sergipe e Pernambuco, tem sido referenciada como a fonte botânica da própolis vermelha brasileira (DAUGSCH et al., 2008). A própolis vermelha e a resina desta leguminosa (*Dalbergia ecastophyllum* L.), contem 3-hidroxi-8,9-dimetoxipterocarpin e medicarpina (TRUSHEVA et al., 2006). Similar à própolis vermelha do Brasil, em Cuba, México, Colômbia e Venezuela tem se reportado própolis vermelha de resinas florais e exsudações do gênero *Clusia*, espécies arbustivas estabelecidas em américa tropical e subtropical (SALAMANCA, 2013). Daugsch et al. (2008) identificaram a fonte de resinas e exsudados que as abelhas coletam para a elaboração da própolis vermelha, a partir de *Dalbergia ecastophyllum*, através de cromatografia de camada delgada.

Trusheva et al. (2006) identificaram 14 compostos na própolis vermelha com origem botânica de *Dalbergia ecastophyllum*, sendo que seis deles foram reportados como novas moléculas marcadoras da própolis brasileira. Entre os compostos identificados (Figura 1) se encontram os derivados do fenilpropano, transanetol (1), metil eugenol, trans-metil isoeugenol, elemicina e trans-isoelemicina; a elemicina foi o composto maioritário na própolis vermelha. Metil eugenol (2), trans-metil eugenol (3), elemicina (4), trans-isoelemicina (5) e a cetona 20(29)-lupen-3-ona (6) foram encontrados pela primeira vez em amostras de própolis. Além disso, a própolis apresenta álcoois triterpênicos: α-amirina (8), β-amirina (9), cicloartenol (10), lupeol (11); os isoflavonoides: isoflavona isosativam (12) e o terocarpano medicarpina (13); a epóxido naftoquinona 2,3-epoxi-2-(3-metil-2-butenil)-1,4-naftalenediona (7), isolada pela primeira vez de uma fonte natural.

Figura 1 - Compostos identificados em própolis vermelha: transanetol (**1**), metil eugenol (**2**), trans-metil eugenol (**3**), elemicina (**4**) e tarns-isoelemicina (**5**), 20(29)-lupen-3-ona (6), 2,3-epoxi-2-(3-metil-2-butenil)-1,4-naftalenediona (**7**), α-amirina (**8**), β-amirina (**9**), cicloartenol

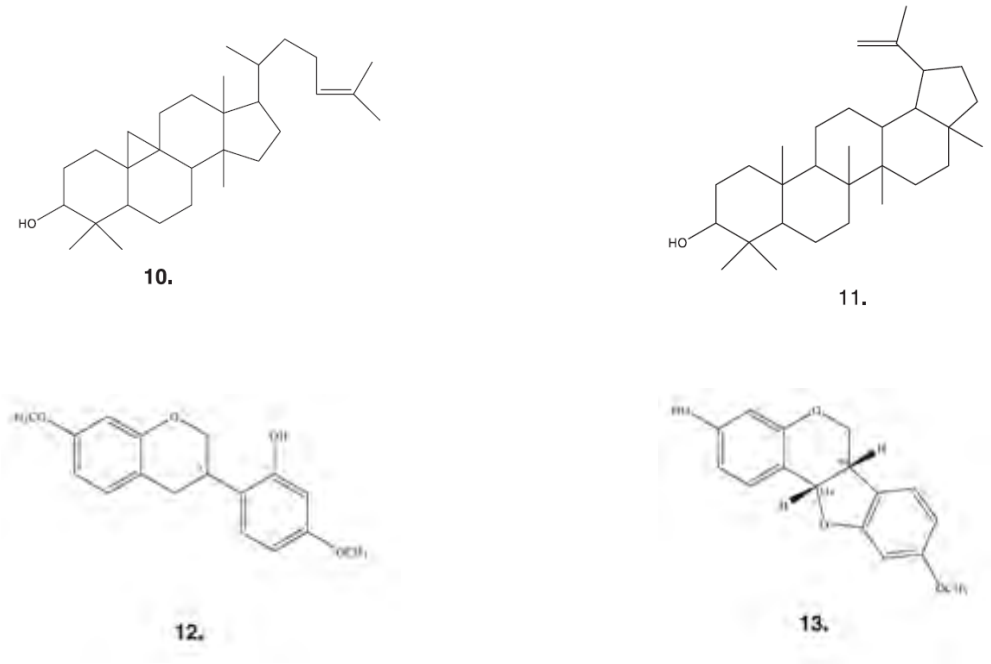
Continua...



Fonte: TRUSHEVA, B. et al. Bioactive constituents of brazilian red propolis. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine : eCAM**, New York, United States, v. 3, n.2, p. 249-54, Jun. 2006.

Figura 1 - Compostos identificados em própolis vermelha: cicloartenol (**10**), lupeol (**11**), isoflavona isosativam (**12**) e terocarpano medicarpina (**13**).

conclusão



Fonte: TRUSHEVA, B. et al. Bioactive constituents of brazilian red propolis. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine : eCAM**, New York, United States, v. 3, n.2, p. 249-54, Jun. 2006.

Poucos pesquisadores têm avaliado a atividade antioxidante e antimicrobiana da própolis vermelha brasileira. Cabral et al. (2009) demostraram uma alta atividade antibacteriana da própolis frente à *Staphylococcus aureus*, encontrando concentrações inibitórias mínimas (CIM) menores que as reportadas por Park et al. (2004) e Woisky e Salatino (1998), em trabalho com outras própolis brasileiras. Além disso, Cabral et al. (2009) também avaliou o teor de compostos fenólicos no extrato etanólico, frações hexânicas e clorofórmica e 5 sub- frações clorofórmicas observando que o extrato etanólico apresentou maior valor em amostras de própolis brasileira.

Por sua parte, Daugsch et al. (2008) avaliaram a atividade antimicrobiana de seis amostras de própolis vermelha e exsudados de *Dalbergia ecastophyllum*, encontrando que as amostras de própolis apresentam uma maior atividade frente à *Staphylococcus aureus* que a resina da planta. Outros estudos realizados por Trusheva et al. (2006) mostraram a atividade antimicrobiana e antifúngica da própolis vermelha brasileira frente a *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Candida albicans*. Outros autores tem demostrado o alto teor de fenóis, compostos fenólicos como

os flavonoides e a eficácia antimicrobiana e antifúngica da própolis vermelha (FROZZA et al., 2013; RIGHI et al., 2011).

Da mesma forma, Oldoni et al. (2011) identificaram dois isoflavonoides (vestitol e neovestitol) e uma chalcona (isoliquiritigenina), encontrando que o vestitol apresenta alta capacidade antioxidante, maior que o neovestitol, desses três compostos, a chalcona apresentou a menor concentração inibitória mínima (CIM) frente aos microrganismos *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans* e *Actimonyces naeslundii*.

3.2 Óleos essenciais

3.2.1 Características e composição

Os óleos essenciais são encontrados em abundância no reino vegetal e podem ser localizados em diferentes partes da planta, como nas folhas de manjericão (*Ocimum basilicum* L.) manjerona (*Origanum majorana* L.), hortelã (*Mentha rotundifolia* L.), alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.), sálvia (*Salvia officinalis* L.), em raízes de açoro (*Acorus Calamos* L.), erva-dos-gatos (*Valeriana officinalis* L.), na casca de canela (*Nees Cinnamomun zeylanicum*), cedro (*Cederla odorata* L.), sândalo (*Santalum album Linn*), em flores como o jasmim (*Jasminum officinale* L.) e rosa (*Rosa sp*.). Também estão presentes nas cascas de algumas frutas como limão, tangerina, laranja (*Citrus sinensis* L.) e frutos de anis (*Pimpinella anisum* L.), cardamomo (*Elettaria cardamomun* L.), aneto (*Anethum graveolens* L.) e erva-doce (*Foeniculum vulgare Miller*) (RAHMAN; GRAY, 2002; RONQUILLO, 2007; ZHU; ZHANG; LO, 2004).

Especificamente, os óleos essenciais são uma mistura de componentes voláteis, produto do metabolismo secundário das plantas (BRENES; ROURA, 2010) em resposta a fatores de stress e, portanto, as condições de crescimento podem afetar o rendimento e conteúdo de óleo (THEIS; LERDAU, 2003), além do processo e condições de extração (FATHI; SEFIDKON, 2012). Entre os componentes principais, os hidrocarbonetos, tais como terpenos, álcoois, ésteres, aldeídos e compostos fenólicos, são responsáveis pelo aroma característico dos óleos essenciais (BAKKALI et al., 2008). A sua composição dependente da parte da planta: flores, folhas, caules, casca, madeira, frutas inteiras, pericarpo ou semente, ou raízes (NOVAK et al., 2005; OLAWORE et al., 2005).

Diversos estudos têm sido realizados com óleos essenciais das mais diversas plantas, e sua atividade antimicrobiana frente a microrganismos patógenos e deterioradores tem sido comprovada (CUEVA et al., 2010; GUTIERREZ; BARRY-RYAN; BOURKE, 2008; NEGI, 2012; PEREIRA et al., 2008; TAJKARIMI; IBRAHIM; CLIVER, 2010). Entre seus compostos principais e majoritários, os fenólicos são reconhecidos como os compostos ativos das plantas, ervas e especiarias, atribuindo-lhes a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais (HOLLEY; PATEL, 2005; TABART et al., 2009).

Assim, diversos óleos essenciais, principalmente de cravo, orégano, tomilho entre outros, apresentam atividade inibitória contra microrganismos de importância nos alimentos (GOÑI et al., 2009; HOLLEY; PATEL, 2005; TYAGI; MALIK, 2011). Além disso, apresentam atividade antifúngica contra patógenos pós-colheita em uma ampla gama de fungos (BÓSQUEZ-MOLINA; BAUTISTA-BAÑOS; MORALES-LÓPEZ, 2009; DAFERERA; ZIOGAS; POLISSIOU, 2000; OMIDBEYGI et al., 2007; RAMOS-GARCÍA; BAUTISTA-BAÑOS; BARRERA-NECHA, 2010; RANA; RANA; RAJAK, 2011; TYAGI; MALIK, 2011)

Especificamente, o cravo (*Syzigium aromaticum)* é uma das especiarias mais usadas no mundo por muitos séculos para a preservação dos alimentos, além do uso medicinal. O óleo essencial de cravo se apresenta como uma fonte de compostos fenólicos como o eugenol, acetato de eugenol, ácido gálico, flavonoides, ácidos hidroxibenzóicos, ácidos hidroxicinâmicos e hidroxifenil propano (CORTÉS-ROJAS; DE SOUZA; OLIVEIRA, 2014). Entre seus componentes mais importantes e majoritários, o eugenol, é encontrado em concentrações variando de 9381,70 a 14650,00 mg/100g do produto fresco (CORTÉS-ROJAS; DE SOUZA; OLIVEIRA, 2014; NEVEU et al., 2010). Por outro lado, o ácido gálico também é encontrado em altas concentrações no cravo (783,50mg/100g produto fresco) (SHAN et al., 2005).

Por outro lado, Opalchenova; Obreshkova (2003) identificaram os compostos majoritários do óleo essencial de manjericão por cromatografia gasosa, encontrando linalol (54,95%), metilchavicol (11,98%), metilcinamato (7,24%) e linoleno (0,14%). No óleo essencial de hortelã (*Mentha piperita*) foram determinados, por análises de cromatografia gasosa- espectrometria de massa (GC-MS), o mentol (26,53%), a mentona (25,83%) e o acetato de mentilo (7,35%) (KUMAR et al., 2012).

3.2.2 Atividade antimicrobiana

A atividade antibacteriana dos óleos essenciais pode estar relacionada com a composição dos óleos voláteis de cada planta, com a configuração estrutural dos compostos constituintes dos óleos, com seus grupos funcionais e com possíveis interações sinérgicas entre seus componentes (DORMAN; DEANS, 2000; HINNEBURG; DAMIEN DORMAN; HILTUNEN, 2006). Por essa razão, diversos estudos têm sido realizados com óleos essenciais de plantas (as mais diversas) e a atividade antimicrobiana contra microrganismos patogênicos e de deterioração de alimentos tem sido avaliada (GUTIERREZ; BARRY-RYAN; BOURKE, 2008; PEREIRA et al., 2008). É o caso de Mytle et al. (2006) e Wilson et al. (1997) que demonstraram o uso do óleo essencial de cravo (*Syzygium aromaticum* L.) em produtos pós-colheita mostrando a inibição do crescimento de *Listeria monocytogenes* e inibição da germinação de *Botrytis cinerea*, respectivamente.

Goñi et al. (2009) avaliaram a atividade antimicrobiana na fase vapor de uma combinação de óleos essenciais de canela e cravo contra quatro bactérias Gram-negativas (*Escherichia coli*, *Yersinia enterocolitica*, *Pseudomonas aeuroginosa* e *Salmonella choleraesuis*) e quatro bactérias Gram-positivas (*Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus* e *Enterococcus faecalis*) através do índice de concentração inibidora fraccionada (CIF) da mistura. Pode-se observar neste trabalho que quando foi aplicada a concentração mínima inibitória dos vapores contendo os óleos essenciais, houve um efeito antagônico frente ao crescimento de *E.coli*, enquanto, quando foi usada concentrações máximas de inibição, houve um efeito sinérgico na inibição de *L. monocytogenes*, *B. cereus* e *Y. enterocolitica*.

Entretanto, Tyagi e Malik (2011) estudaram a composição química e o potencial antimicrobiano do óleo essencial de *Mentha piperita* em líquido e em fase vapor contra microrganismos de origem alimentar (*Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus subtilis* e *Staphylococcus aureus*), os fungos (*Penicillium digitatum*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Mucor* spp, e *Fusarium oxysporum*) e as leveduras (*Candida albicans* e *Sacchromyces cerevisiae*) com o método de diluição em ágar, difusão em poço e volatilização em disco, respectivamente; reportando valores de concentrações mínimas inibitórias de 1,13 a 2,25 mg/ml, e concentração mínima bactericida e fungicida de 2,25 a 9 mg/ml.

Singh, Shushni e Belkheir (2015) avaliaram a atividade de óleo e extrato de hortelã (*Mentha piperita*) contra algumas cepas de bactérias Gram-positivas (*Staphylococcus aureus* e *Streptococcus pyogenes*), e Gram-negativas (*Escherchia coli* e *Klebsiella pneumonia*) pelo método de difusão em ágar usando como controle o antibiótico gentamicina. Esses autores verificaram que o óleo essencial de hortelã inibiu o crescimento dos microrganismos, e os resultados da inibição foram similares aos obtidos com o antibiótico gentamicina. Além disso, o óleo essencial de hortelã mostrou um espectro mais amplo da atividade antimicrobiana que a apresentada pelo antibiótico controle. As concentrações inibitórias mínimas para as espécies bacterianas, variaram entre 0,4% a 0,7% v/v. Aqueles autores concluíram que o óleo de hortelã pode ser usado como um bom agente de conservação por inibir alguns agentes patogênicos de origem alimentar.

Em outros estudos, Fu et al. (2007) avaliaram a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de cravo e alecrim puros e combinados contra *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Bacilus subtilis*, *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris* e *Pseudomonas aeruginosa* e determinaram concentrações mínimas inibitórias entre 0,062 e 0,500% v/v, considerando-os como agentes anti-infeções ou como conservante de alimentos.

Além da atividade antimicrobiana, os óleos essenciais têm apresentado atividade antifúngica frente a um grande número de fungos. A atividade antifúngica de óleos essenciais é associada ao teor de fenol monoterpeno especialmente no tomilho (*Thymus vulgari* L.), orégano (*Origanum vulgare* L.) e cravo (*Eugenia caryophyllata Thunb*.). Seu mecanismo de ação está associado à capacidade de interagir com o citoplasma do patógeno e seu modo de ação parece ser estreitamente relacionada com a solubilidade de cada composto (RONQUILLO, 2007).

Omidbeygi et al. (2007) avaliaram a atividade antifúngica dos óleos essências de tomilho, alfavaca-do-campo e cravo frente *Aspergillus Xavus* em meio liquido e em extrato de tomate, os quais foram mantidos a 25 °C por 2 meses com adições de 0, 50, 200, 350 e 500 ppm dos óleos. As análises da atividade antifúngica dos óleos mostraram que todos estes inibiram o crescimento do *A. Xavus*, sendo maior a eficácia do óleo de tomilho (350 ppm) e alfavaca-do-campo (500 ppm). Além disso, foi feita análise sensorial dos produtos contendo 500 ppm do óleo de tomilho com aceitação por parte dos consumidores. Rana, Rana e Rajak (2011) determinaram a atividade antifúngica do óleo essencial de cravo em diferentes cepas, apresentando sensibilidade crescente: *Muco*r sp < *Microsporum gypseum* < *Fusarium monoliforme* < *Trichophytum rubrum* < *Aspergillus*

sp. < *Fusarium oxysporum*. Igualmente, foi usada a técnica de cromatografia liquida de alta eficiência (HPLC) onde foi confirmado o alto conteúdo de eugenol no óleo essencial de cravo, o que é atribuído atividade antifúngica.

Da mesma maneira, Omidbeygi et al. (2007) avaliaram o efeito antifúngico dos óleos essenciais de tomilho, alfavaca-do-campo e cravo em concentrações de 0, 50, 200, 350 e 500 ppm frente *Aspergillus flavus* em meio liquido e em pasta de tomate, encontrando que todos os óleos essenciais inibiram o crescimento do fungo, sendo que o tomilho e o alfavaca-do-campo apresentaram maior inibição nas concentrações de 350 e 500 ppm respectivamente; a 500 ppm o óleo essencial de cravo inibiu o 87.5% do crescimento do fungo.

3.2.3 Mecanismos de ação antimicrobiana

Os efeitos antimicrobianos de óleos essenciais foram examinados contra uma ampla gama de microrganismos ao longo dos anos, mas os mecanismos de ação sobre os microrganismos ainda não são completamente compreendidos (CALO et al., 2015). Considerando o teor de diferentes grupos de compostos químicos presentes nos óleos essenciais, é importante esclarecer que sua atividade antimicrobiana não é atribuída a um mecanismo específico; porém, existem alguns sítios de ação na célula onde pode ocorrer dano na membrana citoplasmática, degradação da parede celular, dano nas proteínas, filtração do conteúdo celular, coagulação do citoplasma e diminuição da força motriz (BAJPAI; BAEK; KANG, 2012; SKANDAMIS; NYCHAS, 2001).

Em particular, uma das características importantes dos óleos essenciais é a hidrofobicidade, a qual permite a separação dos lipídeos da membrana celular e da mitocôndria, desacoplando a estrutura e tornando-a mais permeável, o que permite a filtração de íons e outros conteúdos celulares (BÓSQUEZ-MOLINA; BAUTISTA-BAÑOS; MORALES-LÓPEZ, 2009; BOSQUEZ-MOLINA et al., 2010; GARCÍA-GARCÍA; PALOU-GARCÍA, 2008; HU; DINH; JOYCE, 2009; OOSTERHAVEN; POOLMAN; SMID, 1995; RAMOS-GARCÍA; BAUTISTA-BAÑOS; BARRERA-NECHA, 2010).

Burt et al. (2007) demostraram que ao expor células a altas concentrações de carvacrol e ρ-cimeno, alterações na concentração dos ácidos graxos da membrana celular podem ocorrer, com um aumento nos ácidos graxos insaturados. Além disso, os compostos dos óleos essenciais também

podem atuar sobre as proteínas da membrana citoplasmática. As enzimas ATPases que se encontram nesta membrana podem ser atingidas por moléculas lipídicas, afetando a regulação de energia e a sínteses de compostos estruturais (ELGAYYAR et al., 2001; GARCÍA-GARCÍA; PALOU-GARCÍA, 2008).

3.3 Embalagens ativas

Diferentes tecnologias têm se implementado para aumentar a vida de prateleira dos produtos de origem animal e vegetal, como o armazenamento à baixas temperaturas, o uso de embalagens plásticas, embalagens com atmosferas modificadas, aplicação de tratamentos hidrotérmicos, irradiação e formulações com agentes biológicos, dentre outras (QUEZADA et al., 2003; RAMOS-GARCÍA; BAUTISTA-BAÑOS; BARRERA-NECHA, 2010). Como consequência, várias pesquisas têm apontado o uso de recobrimentos e filmes como veículo de aditivos, os quais podem proporcionar aos produtos alimentícios proteção contra microrganismos (BOSQUEZ-MOLINA et al., 2010; DURANGO et al., 2005). No entanto, altas quantidades de aditivos podem afetar a qualidade sensorial dos produtos nos quais são aplicados (MIN; KROCHTA, 2005; RAMOS-GARCÍA; BAUTISTA-BAÑOS; BARRERA-NECHA, 2010).

Em particular, o crescimento de microrganismos, tanto deterioradores quanto patogênicos reduz a vida de prateleira dos alimentos e aumenta o risco de transmissão de doenças. Esta contaminação microbiana é maior na superfície do produto, e pode ser prevenida pela incorporação de agentes antimicrobianos no filme ou revestimento, ou pelo uso de polissacarídeos com propriedades antimicrobianas naturais (DEBEAUFORT; QUEZADA-GALLO; VOILLEY, 1998; DURANGO et al., 2005). É por isso, que uma embalagem antimicrobiana, que se encontra em contato direto com o alimento e possua uma liberação gradativa dos compostos antimicrobianos, tem função importante na conservação dos alimentos (APPENDINI; HOTCHKISS, 2002; DURANGO et al., 2005).

Em definição, a embalagem antimicrobiana é uma forma de embalagem ativa que poderia aumentar a vida de prateleira dos produtos e fornecer segurança aos consumidores. Sua ação é de reduzir, inibir ou retardar o crescimento de microrganismos patogênicos em alimentos embalados

e em materiais de embalagens (APPENDINI; HOTCHKISS, 2002; VERMEIREN et al., 1999). Os agentes antimicrobianos podem controlar a contaminação microbiana mediante três mecanismos: redução da taxa de crescimento dos microrganismos, aumento da fase lag ou inativação por contato (DURANGO et al., 2005; QUINTAVALLA; VICINI, 2002).

Diferentes compostos têm sido propostos por suas atividades antimicrobianas em embalagens de alimentos, incluindo ácidos orgânicos, enzimas como a lisozima, fungicidas, e antimicrobianos naturais como as especiarias que são ricas em compostos fenólicos, tais como os flavonoides e ácidos fenólicos (DADALIOGLU; EVRENDILEK, 2004; THARANATHAN, 2003). Em filmes e revestimentos biodegradáveis, uma baixa taxa de difusão do antimicrobiano é desejável, pois mantém a concentração do agente alta por um tempo mais longo. A liberação do antimicrobiano, no caso de polímeros, deve ser mínima, entretanto, a concentração do antimicrobiano na superfície deve permanecer acima da concentração inibitória mínima (DURANGO et al., 2005; HAN, 2000). Os agentes antimicrobianos podem ser adicionados aos polímeros mediante fusão, ou por solubilização do composto dentro da matriz. Devido a muitos agentes antimicrobianos serem sensíveis ao calor, o método por solubilização é o mais indicado para incorporá-los na matriz do biopolímero (APPENDINI; HOTCHKISS, 2002; DURANGO et al., 2005).

Quanto aos produtos naturais, os principais agentes antimicrobianos incorporados nos recobrimentos e filmes são os óleos essenciais (ASSIS; PESSOA, 2004; ROJAS, 2006), os quais, quando tem sido empregados puros ou em altas concentrações, tem apresentado toxicidade em humanos, causando irritações na pele ou até câncer; mas o uso em mínimas concentrações não gera alterações no organismo, sendo considerado um produto GRAS (*Generally Recognized As Safe*) (BAKKALI et al., 2008; CHALOVA; CRANDALL; RICKE, 2010; FRIEDLY et al., 2009).

Além da atividade antimicrobiana e capacidade antioxidante, propriedades físicas, mecânicas e de barreira em filmes com adição de óleos essenciais tem sido avaliada por vários pesquisadores (LEE; LEE; SONG, 2015; MUPPALLA et al., 2014; SALGADO et al., 2013). Ghasemlou et al. (2013) incorporaram óleos essenciais de *Zataria multiflora Boiss* e *Mentha pulegium* em três níveis (1, 2 e 3% v/v) em filmes de amido desenvolvidos pelo método *casting*. Foram avaliadas as propriedades mecânicas, permeabilidade ao vapor de água e barreira ao oxigênio. O incremento do conteúdo dos óleos essenciais provocou um incremento nos valores de

elongação, mas não houve câmbios significativos nos valores de resistência à tração. Por outra parte, ao aumentar a concentração dos óleos a 3% v/v a permeabilidade ao vapor de água diminuiu significativamente, mas, a barreira ao oxigênio não foi afetada pelo aumento da concentração dos óleos. Do mesmo modo, Teixeira et al. (2014) incorporaram óleos essenciais de cravo, alho ou orégano em filmes de proteína de peixe e avaliaram as propriedades físicas, mecânicas, antioxidantes e antimicrobianas. A incorporação de óleo essencial de alho, cravo ou orégano no filme diminuiu significativamente a espessura, solubilidade em água, força de ruptura e alongamento, enquanto aumentou a atividade antioxidante. Particularmente, a adição de óleo essencial de cravo apresentou baixa permeabilidade ao vapor de água quando comparada com ao filme controle.

Seydim e Sarikus (2006) avaliaram a atividade antimicrobiana de filmes produzidos à base de proteínas do soro contendo óleos essenciais de orégano, rosemary e alho. Esses autores concluíram que os filmes contendo óleos essenciais de orégano e de alho foram efetivos contra as bactérias *Escherichia coli* O157:H7, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enteritidis*, *Listeria monocytogenes* e *Lactobacillus plantarum*; entretanto os filmes incorporados com óleo essencial de alecrim não apresentaram efeito inibitório contra os mesmos microrganismos. Segundo aqueles autores, a adição direta de óleos essenciais aos alimentos resultaria em uma imediata redução da população bacteriana, mas poderia alterar as características sensoriais dos mesmos. Logo, a incorporação destes compostos nos filmes pode ter uma aplicação suplementar em embalagens de alimentos. Sánchez Aldana et al. (2015) desenvolveram filmes de pectina com incorporação de óleo essencial de limão mexicano e avaliaram sua atividade antimicrobiana frente as bactérias patogênicas *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella Typhimurium*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes* pelo método de difusão por disco, encontrando uma ampla zona de inibição frente a *E. coli* e as outras bactérias, o que leva a uma possível aplicação dos filmes na preservação de alimentos e aumento da vida de prateleira.

Alboofetileh et al. (2014) desenvolveram filmes nanocompósitos de alginato e nanoargila com óleos essenciais de cravo, coentro, alcaravia, manjerona, canela e cominho e testaram frente a três agentes patogênicos de origem alimentar (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, e *Listeria monocytogenes*), sendo que a manjerona apresentou a maior eficácia antimicrobiana, seguido do cravo e da canela; a atividade foi avaliada por 12 dias com resultados satisfatórios.

Poucos trabalhos têm sido desenvolvidos em relação à utilização de extrato de própolis na elaboração de filmes biodegradáveis. Correa (2011) recobriu sementes de girassol com filmes a base de pectina contendo extrato hidroalcoólico de própolis vermelha em concentrações de 1, 2.5, 5 e 7.5%. A atividade antifúngica dos filmes foi testada contra o fungo *Alternaria alternata.* O filme que apresentou melhor desempenho antifúngico e que poderia ser utilizada como recobrimento de sementes foi o filme contendo 5% de extrato hidroalcoólico de própolis vermelha. Bodini et al. (2013) avaliaram o uso do extrato de própolis verde (EEP) em diferentes concentrações como agente antioxidante e antimicrobiano e seu efeito nas propriedades físicas em filmes de gelatina plastificados com sorbitol, encontrando que a adição do EEP na matriz polimérica apresenta atividade antimicrobiana frente a *Staphylococcus aureus* quando este se encontrou em concentrações de 40 e 200 g EEP/100 g gelatina, além disso, o conteúdo de fenóis e a atividade antimicrobiana foi estável por 177 dias de estocagem.

Torlak e Sert (2013) avaliaram a eficácia antimicrobiana de filmes de quitosana, extrato etanólico de própolis (EEP) e polipropileno frente a microrganismos patogênicos de origem alimentar (*Bacillus cereus*, *Cronobacter sakazakii*, *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium* e *Staphylococcus aureus*). Esses autores demonstraram que a película de quitosana exibiu a atividade antibacteriana de largo espectro, e a incorporação de 10% EPP no filme aumentou a atividade antibacteriana contra todos os patógenos testados. Os resultados deste estudo revelaram que a própolis é um antimicrobiano promissor para as aplicações de embalagem de alimentos. Goy e Bernardes Filho (2013) produziram filmes de quitosana e extrato etanólico de própolis (EEP) encontrando um efeito positivo na redução da hidrofobicidade do filme com adição do EEP. Além disso, a incorporação de 15 e 25% de EEP na matriz filmogênica favoreceu a atividade bacteriostática dos filmes frente ao *Staphylococcus aureus*.

3.3.1 Aplicação em alimentos

Além de se avaliar as propriedades mecânicas, de barreira e antimicrobiana do filme bioativo, os pesquisadores também têm procurado demonstrar sua viabilidade e possibilidade de aplicação. Tapia et al. (2007) recobriram cilindros de maçã e papaia com soluções formadoras de filmes à base de alginato ou gelana contendo bifidobactérias viáveis. Esses autores concluíram que estes filmes parecem ter um potencial adequado para o recobrimento de produtos de alta umidade como as frutas frescas cortadas. Os recobrimentos também parecem ser eficientes como meio de

suporte às bifidobactérias, o que abre novas possibilidades para o desenvolvimento de produtos probióticos. Filmes de gelatina - amido de milho foram utilizados para o recobrimento de abacates após a colheita (AGUILAR-MÉNDEZ et al., 2008), visando o aumento da vida de prateleira do produto. A utilização do filme de gelatina-amido de milho melhorou a firmeza da polpa de abacate, conservação da cor da casca e menor perda de peso, o que favoreceu a conservação do abacate.

Amendoins secos foram embalados em saquinhos preparados com filmes comestíveis de concentrado proteico de soro de leite e azeite de oliva, e armazenados sob umidade e temperatura controladas (JAVANMARD, 2008). A maioria dos filmes diminuiu a transferência de umidade e todos reduziram a formação de peróxidos nos amendoins durante a estocagem. Logo, os filmes podem ser uma alternativa viável para melhorar a vida de prateleira e algumas propriedades sensoriais dos amendoins. Du et al. (2008) avaliaram a atividade antimicrobiana (*Escherichia coli* O157:H7), estabilidade na estocagem e propriedades mecânicas, físicas e químicas de um novo filme feito de tomate contendo carvacrol, o principal constituinte do orégano. Os filmes foram capazes de inibir o crescimento microbiano, e o carvacrol nos filmes foi estável durante a estocagem a 5 e 25 ºC por um período superior a 98 dias.

No trabalho de Oussalah et al. (2004), pedaços de músculo de carne bovina foram recobertos por filmes à base de proteínas do leite contendo óleos essenciais de orégano e pimenta, cujo objetivo foi controlar o crescimento de bactérias patogênicas e deteriorantes (*Escherichia coli e Pseudomonas spp*) e aumentar a vida de prateleira durante a armazenagem à 4 ºC. O recobrimento de filme com óleos essenciais ajudou na redução da carga microbiana e aumentou a atividade antioxidante durante 7 dias de estocagem. Em outro estudo, Oussalah et al. (2006) mostraram o potencial de filmes de alginato contendo óleos essenciais na preservação de músculo de carne bovina. Outros trabalhos usando filmes biodegradáveis aplicados em produtos cárneos são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 - Exemplos de aplicações de filmes e recobrimentos biodegradáveis em produtos cárneos.

Filme/Revestimento	Composto ativo	Alimento	Autor
Quitosana (2%)	OE Cravo (1,5%)	Salsicha de porco • 25 dias armazenamento • Análise microbiológica, física, química e sensorial	Lekjing (2016)
Proteína isolada de soro de leite (10%)	OE Orégano e cravo (1-2%)	Filé de peito de frango • 13 dias armazenamento • Análise microbiológica	Fernández-Pan, Carrión-Granda e Maté (2014)
Quitosana (2-5%) Ácido poli láctico (2%)	Etil lauroil Arginato (LAE) Nisina	Carne de peru pronta para consumo • Análises microbiológicas	Guo et al. (2014)
Quitosana (1%)	Óleo girassol (1%)	Hambúrguer carne de porco • 8 dias armazenamento • Análises microbiológicas, antioxidantes, metamioglobina	Vargas, Albors e Chiralt (2011)
Gelatina bovina (6 - 8%) Quitosana (2%)	OE Cravo (4,5 – 6%)	Peixe fresco • 11 dias de armazenamento • Análise química e microbiológica	Gómez-Estaca et al. (2010)

Fonte: Própria autoria.

Por outro lado, Matan (2012) desenvolveu filmes de proteína de soro adicionados com óleos essenciais de canela, cravo, anis, açafrão, folhas de goiabeira, noz-moscada e limão em concentrações de 2, 4 e 6% v/v, para avaliar sua atividade antimicrobiana (*Staphylococcus aureus*) e antifúngica (*Aspergillus flavus*, *Penicillium* sp.) em peixe seco. Os filmes com óleo essencial de anis apresentaram a maior efetividade frente ao mofo comparado aos outros óleos essenciais, e aumentou a vida de prateleira do peixe por 21 dias, estocados à 30 °C. Fernández-Pan, Carrión-Granda e Maté (2014) desenvolveram filmes de proteína isolada de soro de leite com óleos essenciais de orégano e cravo como agentes antimicrobianos para ser aplicados em filés de peito de frango, encontrando que os filmes adicionados com óleo essencial de orégano apresentaram a

maior atividade frente a *Pseudomonas* spp., além de aumentar a vida de prateleira dos filés de 6 a 13 dias de estocagem à 4 °C. Em outro estudo, Gómez-Estaca et al. (2010) desenvolveram filmes de gelatina e quitosana adicionados com óleos essenciais de cravo, erva-doce, cipreste, lavanda, tomilho, erva sagrada, pinho e alecrim como agentes antimicrobianos na conservação de peixe. Os filmes foram testados contra 18 bactérias, encontrando que óleo de cravo apresentou o maior efeito inibitório seguido do alecrim e lavanda; além isso, foi avaliado o efeito conservante dos óleos num extrato de peixe, onde o cravo e o tomilho foram os mais efetivos.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Material

Os filmes foram produzidos com Gelatina comercial do Tipo A, fornecida pela empresa Gelnex (Itá-Santa Catarina, Brasil); usando-se plastificante, o glicerol (Synth). A lecitina foi utilizada como agente tensoativo (E 322, caramuru, São Simão-GO). Os compostos bioativos escolhidos foram a própolis vermelha da região de Alagoas-Brasil, adquirida na empresa Essenciale Ltda e os óleos essenciais de manjericão (*Ocicum basilicum*), cravo (*Syzygium aromaticum*) e hortelã (*Mentha piperita*) obtidos na Oficina de Ervas Farmácia de Manipulação LTDA-EPP, Ribeirão Preto.

Para as análises do conteúdo de fenóis totais foram utilizados os reagentes Folin-Ciocalteau (Sigma-Aldrich), Carbonato de sódio (Merck) e ácido gálico (Sigma-Aldrich). Cloreto de alumínio (Fluka Analytical) e quercetina (Sigma-Aldrich) foram usados para a quantificação de flavonoides nos extratos etanólico de própolis. Para a determinação da capacidade antioxidante pelos métodos de captura do radical livre $DPPH^{\bullet}$ e atividade inibitória do radical livre 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin) -6-ácido sulfônico ($ABTS^{\bullet+}$), foram utilizados os reagentes DPPH (Sigma-Aldrich), ABTS (Sigma-Aldrich), persulfato de potássio (Merck) e Trolox (Sigma-Aldrich).

As cepas utilizadas nas análises microbiológicas (*Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Salmonella enteritidis* ATCC 13076 e *Echerichia coli* ATCC 25922) foram fornecidas pelo Laboratório multiusuário de microbiologia da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de alimentos FZEA/USP. A *Listeria monocytogenes* ATCC 7644, SCOOT A, 508 (isolada de salame), 595 (isolada de salame), 500 (isolada de salame) e *Listeria innocua* 225/07 foram fornecidas pelo Laboratório de microbiologia de alimentos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, USP, São Paulo. Nos testes de sensibilidade microbiológica, Concentração Mínima Inibitória (CMI) e Concentração Mínima Bactericida (CMB) dos óleos essenciais, extrato de própolis vermelha e filmes biodegradáveis foi utilizado caldo Müller Hinton (OXOID), caldo Tryptic Soy Broth TSB (Bacto™) e Tween 80 0,5% w/w (Sigma-Aldrich), Ágar Müller Hinton (Acumedia) para *S. aureus*, *S. enteritidis* e *E. coli*; para as diferentes cepas de *Listeria* foi utilizado Ágar Tryptone Soy Agar TSA (OXOID) com extrato de levedura YE 0,6% w/v (OXOID).

4.1 Extração e caracterização da própolis vermelha (EEP)

Para o preparo dos extratos, 20 g da própolis vermelha moída (Figura 2) foram adicionadas à 30 mL de álcool etílico em diferentes concentrações: 70, 80, 90% e 96% e mantida sob agitação mecânica por 48 horas à 25 °C (LU; CHEN; CHOU, 2005; PALOMINO, 2009; SALAMANCA; CORREA; PRINCIPAL, 2007) ou por 30 min à 50 °C (BODINI et al., 2013), após este período as amostras foram filtradas em papel Whatmann N°1. O extrato final foi preservado em frascos âmbar à 5 °C. Os extratos foram caracterizados em relação ao conteúdo de fenóis totais, flavonoides, atividade antimicrobiana e extrato seco para estabelecer o melhor método de extração. A caracterização geral do extrato foi feita seguindo metodologia da norma Argentina (IRAM, 2000) 15935.

Figura 2 - (a) Própolis vermelha bruta, (b) Própolis vermelha moída, (c) Extratos etanólicos de própolis vermelha (EEP).

a

c

b

Fonte: Própria autoria.

4.1.1. Conteúdo de Fenóis totais:

O conteúdo de fenóis totais foi quantificado seguindo o método colorimétrico descrito por Singleton e Rossi Jr (1965) com algumas modificações. Uma curva padrão de ácido gálico (100 µg/mL) foi feita em concentrações de 0 a 60 µL em intervalos de 10 µL e adição de etanol até um volume final de 100 µL, seguido da adição de 500 µL do reagente de Folin- Ciocalteau (1/10). Após 2 min, 400 µL de carbonato de sódio (4%) foi adicionado. As amostras foram incubadas por 60 min a temperatura ambiente e protegidas da luz para posterior leitura no espectrofotômetro a 760 nm. Para a quantificação do conteúdo de fenóis totais nas amostras de EEP, foram tomados

100 µL previamente diluídos (1000 vezes) em etanol absoluto, com posterior adição do reagente de Folin- Ciocalteau e do carbonato de sódio, como foi feito na curva padrão. Os resultados foram expressos como µg de Ácido Gálico/mL de extrato.

4.1.2 Conteúdo de Flavonoides:

A determinação do conteúdo de flavonoides dos extratos EEP foi feita seguindo metodologia descrita por Kumazawa, Hamasaka e Nakayama (2004), Miliauskas, Venskutonis e Van Beek (2004). Uma curva padrão de quercetina em concentrações de 0, 0,6, 1,2, 2,4, 4,8, 7,2 e 9,6 µg/mL, usando como diluente etanol absoluto, foi feita após incubação por 40 min a temperatura ambiente protegida da luz, com leituras das absorbâncias à 415 nm em espectrofotômetro UV-Vis Perkin Elmer Precisely (Lambda 35). A 50 µL da amostra diluída (100 vezes) em etanol absoluto foram adicionados 50 µL da solução de cloreto de alumínio (2%). O período de incubação e as leituras das absorbâncias foram feitas como na curva padrão. Os resultados foram expressos em µg de Quercetina/mL de extrato.

4.1.3 Extrato seco:

Os EEP foram submetidos ao processo de rotaevaporação até eliminação total do solvente. O sólido obtido foi submetido à secagem em estufa por 2 horas à 70 °C. O Extrato seco (%) foi calculado com a equação (1) (TOLOSA; CAÑIZARES, 2002):

$$Extrato\ seco\ (base\ úmida) = \frac{P}{m} x\ 100 \qquad (1)$$

onde, *P* é o peso do extrato seco (g) e *m*, o peso da amostra (g).

4.1.4. Capacidade antioxidante:

As análises da capacidade antioxidante das amostras do EEP foram feitas por dois métodos, captura do radical livre 2,2-difenil-1-picril hidrazilo ($DPPH^{\bullet}$) e atividade inibitória do radical livre 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin) -6-ácido sulfônico ($ABTS^{\bullet+}$).

4.1.4.1. Determinação da atividade antioxidante pela captura do radical livre DPPH$^{\bullet}$:

A determinação da capacidade antioxidante das amostras de EEP foi quantificada pelo grau de descoloração do radical DPPH$^{\bullet}$, seguindo a metodologia descrita por Brand-Williams, Cuvelier e Berset (1995). Uma curva padrão do radical DPPH$^{\bullet}$ (0,06mM), foi feita variando as concentrações finais do radical entre 0 e 60 µM, com intervalos de 10 µM, usando como diluente álcool etílico. A leitura foi realizada em espectrofotômetro a 515 nm. Para a determinação da Concentração Eficiente de antioxidante para inibir 50% da concentração inicial de DPPH$^{\bullet}$ (EC_{50}), foi feita uma curva com seis concentrações diferentes do EEP, com diluição inicial de 1000 vezes, e em ambiente escuro, foi transferido uma alíquota de 0,1 mL e 3,9 mL do radical DPPH$^{\bullet}$ (0,06mM). As leituras foram feitas a 515 nm ao tempo zero, 1 min e cada 15 min até a reação estabilizar. A atividade sequestradora de radicais foi medida como a diminuição da absorbância de DPPH e calculada utilizando a equação (2):

$$\%Inibição = 100 - \frac{[Abs_{Amostra} - Abs_{Branco}]}{Abs_{Controle}} x100 \qquad (2)$$

onde $Abs_{Amostra}$ é a absorbância da amostra com DPPH; Abs_{Branco} é a absorbância do branco sem adição do DPPH; $Abs_{Controle}$ é a absorbância da solução de DPPH em etanol.

4.1.4.2 Determinação da atividade inibitória do radical livre 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin) -6-ácido sulfônico (ABTS$^{\bullet+}$):

A solução do radical ABTS$^{\bullet+}$ foi preparada com adição do ABTS (2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin) -6-ácido sulfônico) (7 mM) e persulfato de potássio (2,45 mM). A solução foi deixada no escuro por 12 a 16 horas em agitação constante para reagir. Para o ensaio, a solução do radical ABTS$^{\bullet+}$ foi diluída em etanol absoluto até uma leitura da absorbância entre 0,70 e 0,75 a 734 nm seguindo a metodologia descrita por Re et al. (1999). A curva padrão foi feita com solução de Trolox 2500 µM; concentrações entre 0 e 17,5 µM foram misturadas com 990 µL da solução do radical ABTS$^{\bullet+}$, incubadas por 6min a temperatura ambiente e protegidas da luz para leitura em espectrofotômetro a 734 nm. Foi feita uma curva com seis concentrações diferentes do EEP por triplicata, onde, 10 µL da amostra previamente diluída (1000 vezes) em etanol absoluto foram

misturados com 990 µL da solução do radical $ABTS^{\bullet+}$, incubadas por 6 min a temperatura ambiente e protegidas da luz para leitura em espectrofotômetro a 734 nm. Os resultados foram expressados como a capacidade antioxidante em equivalentes de Trolox (TEAC em µmol Trolox/g amostra).

4.1.5. Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR):

A análises de espectroscopia FTIR das amostras de EEP foram feitas seguindo metodologia descrita por Vicentini et al. (2005). Após a extração, foi evaporado o solvente por rotaevaporação e a amostra seca foi colocada em espectrofotômetro Spectrum One (Perkin Elmer, USA) usando o acessório Universal ATR; as análises foram feitas em um intervalo espectral de 650 a 4000 cm^{-1} e 16 varreduras espectrais.

4.1.6 Atividade antimicrobiana.

4.1.6.1 Teste de sensibilidade:

A atividade antimicrobiana da própolis vermelha foi determinada pelo método de difusão em disco frente as bactérias Gram (+) *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213) e as bactérias Gram (-) *Esherichia coli* (ATCC 25922) e *Salmonella enteritidis* (ATCC 13076). Inicialmente, as bactérias *S. aureus*, *E. coli* e *S. enteritidis* foram reativadas em caldo *Brain Heart Infusion* (BHI) durante 24 horas a 37 °C e diluídas até obter suspensões microbianas de turbidez ao tubo de 0,5 na escala McFarland, o que corresponde a 10^8 UFC/mL. A suspensão diluída foi semeada com *swabs* estéreis na superfície das placas contendo ágar Mueller- Hinton (LUSTOSA, 2007; NCCLS, 1999; OLIVEIRA et al., 2013). Foram colocados 20 µL do EEP em discos de papel filtro (Whatman N°1) de 6 mm de diâmetro previamente esterilizados em luz ultravioleta por 30 min (BODINI, 2011; LUSTOSA, 2007; PARK et al., 1998). Como controle positivo e negativo, foram utilizados discos impregnados com cloranfenicol (2,5% w/v) e etanol absoluto respectivamente. Os discos foram colocados na superfície das placas e incubadas a 37 °C por 24 horas. Após este período o diâmetro de inibição foi medido considerando-se o diâmetro dos discos em milímetros (6 mm).

4.1.6.2 Concentração Mínima Inibitória (CMI) e Concentração Mínima Bactericida (CMB):

As determinações da CMI e CMB foram feitas para o EEP que apresentou o maior conteúdo de fenóis totais, flavonoides e sensibilidade frente as bactérias testadas no item 4.2.6.1. Inicialmente foi preparada uma solução de caldo Müller Hinton com Tween 80 (0,5% w/w), homogeneizada em homogeneizador Ultra Turraz (Modelo TP18/1059, Janke & Kunkel, Alemanha) a 5000 rpm por 5 min. Após esta etapa, foi incorporado o EEP (1% w/w) e homogeneizado novamente. Foram feitas diluições seriadas até uma concentração de 0,1% w/w. Em microplacas de 96 poços foram colocados 200 µL da amostra e 20 µL de caldo com o microrganismo em uma concentração de 10^6 UFC/mL e incubados a 37 °C por 24 h. Devido a turbidez apresentada pela amostra de EEP, após o período de incubação foi colocado 10 µL do corante Rezasurina (0,001 g/L) em cada poço e incubado a 37 °C por 2 h. Os poços onde não houve mudança de cor azul escuro a rosa foram considerados como o valor da CMI. Em placas com ágar Müller Hinton foi feita semeadura por esgotamento de 10 µL de cada poço onde não houve crescimento microbiano da bactéria *S. aureus*, e em placas com ágar Tryptome Soy Agar e Yeast Extract (TSA+YE 0,6%) para a bactéria *L. monocytogenes*. As placas foram incubadas por mais 24 h a 37 °C. Onde não houve crescimento microbiano foi considerado como a CMB.

4.2 Caracterização dos óleos essenciais

4.2.1. Conteúdo de Fenóis totais:

A quantificação do conteúdo de fenóis totais nos óleos essenciais foi feita como descrito na seção 4.1.1., usando uma diluição de 5000, 1000 e 10 vezes para óleo essencial de cravo, manjericão e hortelã, respectivamente.

4.2.2. Capacidade antioxidante:

As análises da capacidade antioxidante dos três óleos essenciais: cravo, manjericão e hortelã, foram feitas por dois métodos, captura do radical livre 2,2-difenil-1-picril hidrazilo

(DPPH$^{\bullet}$) e atividade inibitória do radical livre 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin) -6-ácido sulfônico (ABTS$^{\bullet+}$).

4.2.2.1. Determinação da atividade antioxidante pela captura do radical livre DPPH$^{\bullet}$:

A determinação da atividade antioxidante pela captura do radical livre DPPH$^{\bullet}$ nos óleos essenciais, foi feita seguindo a metodologia descrita na seção 4.1.4.1., usando uma diluição de 5000, 500 e 5 vezes para óleo essencial de cravo, manjericão e hortelã respectivamente.

4.2.2.2. Determinação da atividade inibitória do radical livre 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin) -6-ácido sulfônico (ABTS$^{\bullet+}$):

A determinação da atividade inibitória do radical livre 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin) -6-ácido sulfônico (ABTS$^{\bullet+}$) dos óleos essenciais foi feita como descrita na seção 4.1.4.2., usando uma diluição de 5000, 500 e 5 vezes para óleo essencial de cravo, manjericão e hortelã respectivamente.

4.2.3. Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR):

A análises de espectroscopia FTIR dos óleos essenciais foram feitas como descrito na seção 4.1.6., onde uma amostra de cada óleo foi colocada diretamente no espectrofotômetro Spectrum One (Perkin Elmer, USA).

4.2.4. Atividade antimicrobiana.

4.2.4.1. Teste de sensibilidade:

A atividade antimicrobiana dos óleos essenciais foi determinada pelo método de difusão em disco frente as bactérias Gram (+) *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213), *Listeria monocytogenes* (ATCC 7644) e as bactérias Gram (-) *Esherichia coli* (ATCC 25922) e *Salmonella enteritidis* (ATCC 13076), onde discos de papel filtro (Whatman N°1) de 6 mm de diâmetro

previamente esterilizados em luz ultravioleta por 30 min, foram impregnados com 20 µL do óleo a testar. O procedimento para a determinação do halo de inibição foi feito como descrito na seção 4.1.7.1.

4.2.4.2 Concentração Mínima Inibitória (CMI) e Concentração Mínima Bactericida (CMB):

A concentração mínima inibitória (CMI) e concentração mínima bactericida (CMB) dos três óleos essenciais foi feita como o descrito na seção 4.2.7.2., para as quatro bactérias: *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213), *Listeria monocytogenes* (ATCC 7644), *Esherichia coli* (ATCC 25922) e *Salmonella enteritidis* (ATCC 13076), usando diluições de 0,5 – 0,05% w/w para OE de cravo, 1,0 – 0,08% w/w para OE de manjericão e 1,5 – 0,08% w/w para OE de hortelã.

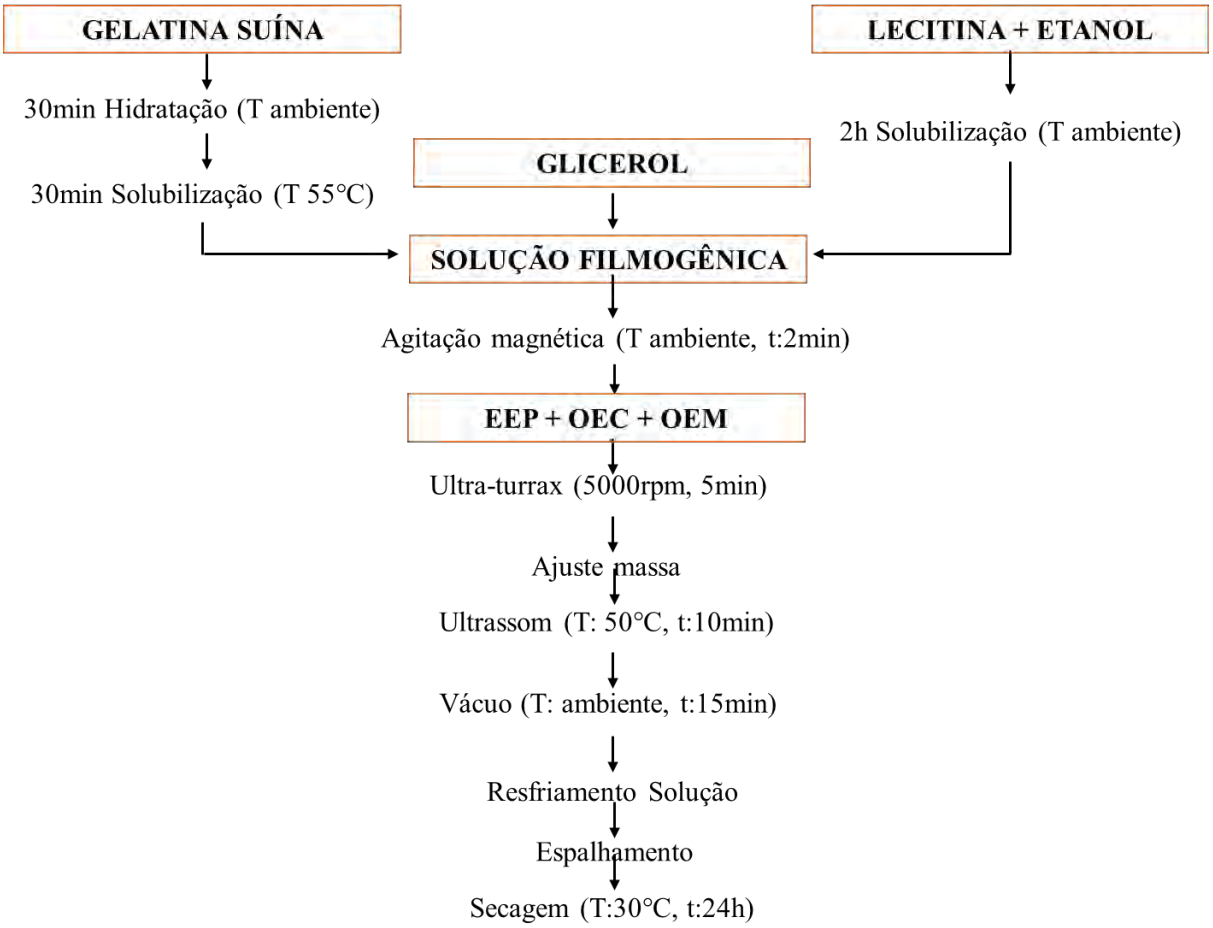
4.3 Produção dos filmes

As formulações dos filmes foram fixadas de acordo com um planejamento experimental simplex com 2 componentes. Os filmes foram produzidos pelo método *spreading* após a hidratação da gelatina (4 g/100g solução), à temperatura ambiente (30 min), seguida de solubilização (T = 55 °C, t = 30 min). A lecitina (35 g/100g plastificante) e o etanol (20 g/100g solução) foram mantidos sob agitação magnética por 2 horas a temperatura ambiente. Após este período, foi adicionado o plastificante glicerol (25 g/100g gelatina) à solução filmogênica e mantida sob agitação magnética (2 min). Em seguida, a própolis (Tratamento B4: 25°C x 48h, etanol 96%) (0.8 g/100g solução) e o óleo essencial de cravo (0.0 – 0.3 g/100g solução) e o óleo essencial de manjericão (0.0 – 0.8 g/100g solução) foram adicionados à solução filmogênica e submetidos a agitação utilizando um agitador ultraturrax (Ika, Modelo T18basic) (5.000 rpm, 5 min). A eliminação de bolhas da solução foi feita utilizando-se banho ultrassom (T: 50 °C, t:10 min) e posteriormente vácuo (15 min) (Figura 3).

A solução filmogênica (125 g) a uma temperatura de ±19°C, foi dispersa em placas de acrílico (26 x 30 x 0,2 cm) utilizando-se um aplicador automático de filmes (TKB Erichesen, Speed II), a uma velocidade de espalhamento de 35 mm/s; acoplado a um banho ultratermostatizado (Marconi, MA 184/20) para o controle da temperatura da superfície de espalhamento (Figura 4). A

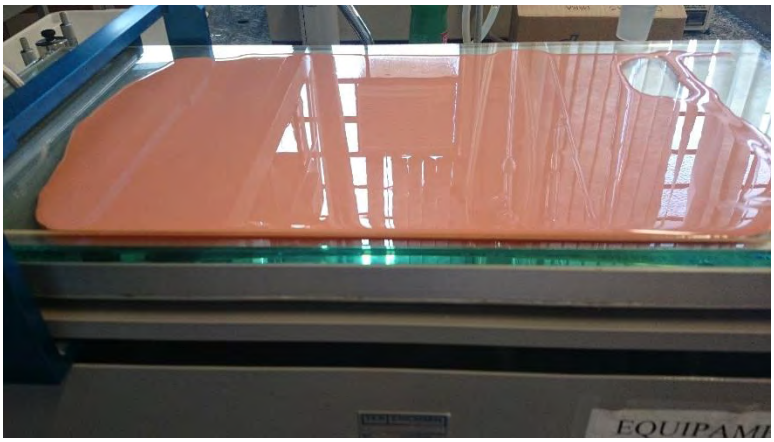
solução filmogênica foi submetida à secagem em estufa com ventilação forçada (Marconi, MA 035) a 30 °C por 24 h. A espessura dos filmes, foi determinada como a média aritmética de dez medidas aleatórias sobre a área do filme com um micrômetro digital (resolução 0,001 mm, Mitutoyo), controlada através da relação massa seca de solução/área do suporte.

Figura 3 - Fluxograma da produção de filmes ativos produzidos com gelatina, EEP, OE de cravo e OE de manjericão.



Fonte: Própria autoria.

Figura 4 - Aplicador automático de filmes do Laboratório de Tecnologia de Alimentos. USP/FZEA.



Fonte: Própria autoria.

Previamente às caracterizações, os filmes foram acondicionados em dessecadores contendo solução salina saturada de brometo de sódio (umidade relativa de 58%) em condições fixas de temperatura (25 °C) por três dias. As caracterizações dos filmes foram realizadas em sala climatizada à temperatura de 25 ºC e umidade relativa na faixa de 55 a 65% (CORONADO, 2012; DIAS et al., 2013; SOBRAL et al., 2001).

4.3.1. Desenho experimental:

No preparo, as formulações foram fixadas de acordo com os critérios do planejamento experimental simplex com 2 componentes usando o software Design Expert® v.7.0. As proporções dos componentes podem ser observadas na Tabela 2; mantendo-se constante as concentrações de gelatina (4 g/100g solução), glicerol (25 g/100g gelatina), lecitina (35 g/100g plastificante), etanol (20 g/100g solução) e extrato etanólico de própolis vermelha EEP (0,8 g/100g solução).

Tabela 2 - Proporções dos componentes no planejamento experimental Simplex com 2 componentes.

Componente	Proporção componente (g/100g solução)		
	0	**½**	**1**
Óleo essencial Cravo	0,0	0,15	0,3
Óleo essencial Manjericão	0,0	0,4	0,8

Óleo essencial (g/100g de solução).
Fonte: Própria autoria.

A matriz do planejamento experimental e os controles está apresentada na Tabela 3. Foram avaliadas as 8 formulações estabelecidas no desenho experimental (F1, F2, F3, F4, F5, F5, F7 e F8) e 4 controles: C1: Gelatina (4 g/100g solução), C2: Gelatina (4 g/100g solução) + EEP (0,8 g/100g solução), C3: Gelatina (4 g/100g solução) + OE cravo (0,3 g/100g solução) e C4: Gelatina (4 g/100g solução) + OE manjericão (0,8 g/100g solução).

Tabela 3 - Matriz do planejamento experimental Simplex com 2 componentes e controles.

	Componentes					
	Gelatina (g/100g sol)	Glicerol (g/100g gel)	Lecitina (g/100g glicerol)	EEP (g/100g sol)	OE Cravo (g/100g sol)	OE Manjericão (g/100g sol)
F1	4,0	25	35	0,8	0,15	0,40
F2	4,0	25	35	0,8	0,30	0,0
F3	4,0	25	35	0,8	0,30	0,0
F4	4,0	25	35	0,8	0,225	0,2
F5	4,0	25	35	0,8	0,075	0,6
F6	4,0	25	35	0,8	0,0	0,8
F7	4,0	25	35	0,8	0,15	0,40
F8	4,0	25	35	0,8	0,0	0,8
C1	4,0	25	35	0,0	0,0	0,0
C2	4,0	25	35	0,8	0,0	0,0
C3	4,0	25	35	0,0	0,3	0,0
C4	4,0	25	35	0,0	0,0	0,8

Fonte: Própria autoria.

4.3.2. Conteúdo de fenóis totais:

A quantificação de fenóis totais nos filmes foi realizada pelo método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu (SINGLETON; ROSSI JR, 1965). As amostras dos filmes (±0,01 g) foram solubilizadas em 6mL de água destilada a 50 °C por 50 min. Posteriormente, foram adicionados 4 mL de álcool etílico absoluto; a solução foi mantida por mais 10 min a 50 °C (BITENCOURT et al., 2014; BODINI et al., 2013). As amostras foram centrifugadas a 5000 rpm por 5 min. A elaboração da curva padrão e quantificação de fenóis foi a mesma usada para o EEP descrita na seção 4.1.1. Os resultados foram expressos em mg de ácido gálico/g do filme.

4.3.3 Capacidade antioxidante:

A análise da capacidade antioxidante dos filmes biodegradáveis foi feita por dois métodos, captura do radical livre 2,2-difenil-1-picril hidrazilo ($DPPH^{\bullet}$) e atividade inibitória do radical livre 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin) -6-ácido sulfônico ($ABTS^{\bullet+}$).

4.3.3.1 Determinação da atividade antioxidante pela captura do radical livre $DPPH^{\bullet}$:

Este ensaio foi feito seguindo metodologia descrita por Bitencourt et al. (2014) e Moradi et al. (2012). 0,1 g do filme foram diluídos em 6 mL de água destilada a 50 °C por 50 min. Posteriormente, foram adicionados 4 mL de álcool etílico absoluto; a solução foi mantida por mais 10 min a 50 °C, e centrifugado a 5000 rpm por 5 min. Uma alíquota de 0,4 mL do filme dissolvido reagiu com 3,6 mL da solução do radical $DPPH^{\bullet}$ em ausência da luz, posteriormente foi centrifugado a 5000 rpm por 5 min e realizou-se a leitura a 515 nm no tempo zero, e após 60 min. A capacidade antioxidante foi determinada pela equação (3):

$$\%\ Seqüestro\ do\ radical\ DPPH^{\bullet} = \left(\frac{Abs_{DPPH} - Abs_{Amostra}}{Abs_{DPPH}}\right) x100 \qquad (3)$$

onde, Abs_{DPPH} é a absorbância da solução de DPPH e $Abs_{Amostra}$ é a absorbância da amostra solubilizada.

4.3.3.2 Determinação da atividade inibitória do radical livre 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin) -6-ácido sulfônico ($ABTS^{\bullet+}$):

Esta análise foi realizada seguindo a metodologia descrita na seção 4.1.4.2. O preparo da amostra de filme solubilizado foi feito segundo o estabelecido na seção 4.3.4.2. A amostra com o radical ABTS foi centrifugada a 5000 rpm por 5 min com posterior leitura no espectrofotômetro a 734 nm, como descrito por Bitencourt et al. (2014).

4.3.4 Atividade antimicrobiana:

A atividade antimicrobiana dos filmes foi determinada pelo método de difusão em disco frente as bactérias Gram (+) *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213), *Listeria monocytogenes* (ATCC 7644), *Esherichia coli* (ATCC 25922) e *Salmonella enteritidis* (ATCC 13076). Os filmes foram cortados em discos de 15 mm e posteriormente colocados sobre a superfície das placas, e incubadas a 30 °C por 24 h. O procedimento para a determinação do halo de inibição foi feito como foi descrito na seção 4.1.7.1.

4.3.5 Umidade e Solubilidade:

Para tais análises, os filmes foram acondicionados em dessecadores com solução saturada de brometo de sódio (NaBr) a 25 °C por 3 dias. A umidade nos filmes foi determinada seguindo metodologia descrita por Gontard; Guilbert; Cuq (1992). As amostras foram colocadas em pesa filtros previamente tarados e pesados, e levadas à estufa à 105 °C por 24 horas. A umidade final dos filmes foi determinada pela seguinte equação (4):

$$Umidade\ (\%) = \left(1 - \frac{m_f}{m_i}\right) x100 \qquad (4)$$

onde, m_f é a massa (g) da amostra seca e m_i e a massa (g) inicial da amostra em base seca.

A solubilidade dos filmes em água foi determinada após 24 horas de imersão, de acordo com Gontard; Guilbert; Cuq (1992). Amostras de filmes, na forma de disco (~2 cm), foram imersas em água destilada (50 mL) e mantidas sob agitação mecânica utilizando-se mesa agitadora MA141 (Marconi) por um período de 24 horas a ±25 °C. Após este período, as amostras foram submetidas a secagem (24 horas, 105 ºC) para determinação da massa seca final da amostra (m_f). O peso inicial foi determinado conhecendo-se a umidade da amostra. A solubilidade foi expressa em termos de matéria seca dissolvida e calculada de acordo à equação (5):

$$\%MS = \frac{m_i - m_f}{m_i} x100 \qquad (5)$$

onde, *%MS* é a porcentagem do material solubilizado (g/100g de filme), m_i é a massa (g) inicial da amostra e m_f é a massa (g) seca da amostra.

4.3.6 Propriedades mecânicas:

As propriedades mecânicas dos filmes foram avaliadas por testes de tração e perfuração utilizando-se um texturômetro TA.XT2i (Stable Micro Systems) com amostras acondicionadas em solução saturada de brometo de sódio (NaBr) por três dias a temperatura ambiente (±25 °C).

No teste de perfuração amostras foram fixadas em uma célula com anel perfurado de 40 mm de diâmetro (Figura 5a). O teste foi realizado utilizando-se uma sonda cilíndrica de 3 mm de diâmetro e velocidade de 1 mm/s (SOBRAL et al., 2001). Os valores de força de perfuração (F, em N) foram obtidos das curvas de força versus deslocamento da sonda. A porcentagem de deformação do filme (D, %) foi calculada com a equação (6):

$$D(\%) = \frac{\sqrt{d^2 + r^2} - r}{r} x100 \qquad (6)$$

onde, *d* é o deslocamento da sonda cilíndrica (mm) e *r* o raio da amostra de filme (20 mm).

O teste de tração foi realizado de acordo com Thomazine, Carvalho e Sobral (2006), seguindo a normativa ASTM, 1985 (D882-02). As amostras dos filmes (15 x 60 mm) foram

cortadas e fixadas em uma sonda *tensile grips* (Figura 5b). A distância inicial de separação foi fixada em 40 mm e a velocidade em 0.9 mm/s. A tensão na ruptura (T em MPa) e a deformação na ruptura (D em %) foram obtidas das curvas de tensão *versus* elongação e, o módulo de elasticidade (ME em MPa) foi determinado calculando-se o coeficiente angular da parte linear da curva de tensão versus elongação, seguindo a equação (7):

$$ME(\%) = \frac{\Delta L}{L} x100 \qquad (7)$$

onde, ΔL é o alongamento do filme (m) e L é o comprimento inicial do filme (m).

Figura 5 - Texturômetro TA.XT2i usado nos testes de perfuração (a) e tração (b) dos filmes ativos.

a

b

Fonte: Própria autoria.

4.3.7. Parâmetros cromáticos:

A cor dos filmes, expressa como diferença total de cor (ΔE*), croma a* (vermelho-verde), b* (croma amarelo-azul) e luminosidade (L*) foi determinada de acordo com Bodini (2011) e Sobral et al. (2001) utilizando-se um colorímetro Miniscan EZ (HunterLab) (Figura 6a). Os filmes foram sobrepostos em um padrão branco para determinar os parâmetros a*, b* e L*. A diferença de cor (ΔE*), foi calculada com a equação (8) (GENNADIOS et al., 1996):

$$\Delta E^* = \sqrt{(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2} \qquad (8)$$

onde,

$$\Delta L^* = L^*{}_{padrão} - L^*{}_{amostra}$$

$$\Delta a^* = a^*{}_{padrão} - a^*{}_{amostra}$$

$$\Delta b^* = b^*{}_{padrão} - b^*{}_{amostra}$$

A opacidade (Opa) foi calculada de acordo com a relação entre a opacidade da amostra sobre o padrão preto (Y_p) e sobre o padrão branco (Y_b), determinadas segundo método Hunterlab e usando-se a equação (9) (SOBRAL, 2000), utilizando-se o mesmo aparelho e software usado nas medidas de cor.

$$Opa = \frac{Y_p}{Y_b} \quad (9)$$

O brilho dos filmes foi medido a partir de dez medidas aleatórias no ângulo de 60º utilizando-se um glossímetro Rhopoint 20/60, de acordo com Villalobos et al. (2005) (Figura 6b).

Figura 6 - Colorímetro Miniscan EZ (a) e glossímetro Rhopoint 20/60 (b).

a

b

Fonte: Própria autoria.

4.3.8 Barreira a radiação à luz UV-Visível:

As propriedades de barreira à luz ultravioleta e visível foram determinadas usando um espectrofotômetro UV-Vis Perkin Elmer Precisely (Lambda 35), seguindo metodologia descrita por Bitencourt et al. (2014). Os filmes ativos foram cortados (12x40 mm) e colocados no lugar da célula para permitir a passagem do feixe de luz. As medições foram feitas em comprimento de onda entre 200 a 700 nm.

4.3.9 Permeabilidade ao vapor de água:

A permeabilidade a vapor de água (PVA) foi determinada de acordo com o método ASTM E96-95 (ASTM, 1995), com algumas modificações (GONTARD; GUILBERT; CUQ, 1992). Os filmes foram fixados em células de alumínio (área exposta 12.29 cm^2) contendo sílica gel (Figura 7). As células foram acondicionadas em dessecadores contendo água destilada (Gradiente de UR=100%) e mantidas em uma estufa com controle eletrônico de temperatura a 25 ºC (±0,2 ºC). O ganho de massa do filme foi medido cada 24 horas por 7 dias. A permeabilidade foi determinada com a seguinte equação (10):

$$PVA(g.mm/h.m^2.KPa) = \frac{G.x}{t.A_e.P_0.(R_1-R_2)} \quad (10)$$

onde, x é a espessura média dos filmes (mm); A_e é a área exposta (cm^2); P_0 é a pressão de vapor de água (Pa) na temperatura média do período; (R_1-R_2) é a diferença de umidade relativa (%); G/t é o coeficiente angular da regressão linear da reta de ganho de massa do sistema versus o tempo (g/h).

Figura 7 - Sistema de células usado na determinação da permeabilidade ao vapor de agua dos filmes ativos.

Fonte: Própria autoria.

4.3.10 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR):

A análises de espectroscopia FTIR nos filmes foram feitas seguindo metodologia descrita por Vicentini et al. (2005). Os filmes foram acondicionados por sete dias em dessecadores contendo sílica gel para a posterior análise. As análises foram realizadas em um espectrofotômetro Spectrum Onen (Perkin Elmer, USA), usando o acessório Universal ATR em um intervalo espectral de 650 a 4000 cm^{-1} e 16 varreduras espectrais (Figura 8).

Figura 8 - Espectrofotômetro Spectrum Onen usado nas análises de espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier FT-IR em filmes ativos.

Fonte: Própria autoria.

4.3.11 Calorimetria diferencial de varredura (DSC):

As análises das propriedades térmicas dos filmes foram realizadas por calorimetria diferencial de varredura (DSC) seguindo metodologia descrita por Sobral; Habitante (2001); Sobral et al. (2011); Telis; Sobral (2001) na unidade TA DSC 2010, controlado por um sistema TA5000 (TA Instruments, New Castle, DE, EUA) (Figura 9). As amostras (~10 mg) foram acondicionadas em células de alumínio herméticas, as quais foram submetidas a análise térmica, entre -150 e 150 °C a 5 °C/min, numa atmosfera inerte de nitrogênio (45 mL/min). O equipamento foi calibrado com amostra de Índio (Tm=146.6 °C, ΔH_m=28.71 $J.g^{-1}$). A análise dos termogramas foi realizada utilizando-se o software universal V1.7F Análise (TA Instruments), onde a temperatura de transição vítrea (T_g) foi determinada como o ponto de inflexão da linha base e a temperatura de fusão (T_m) como o ponto donde ocorreu o pico endotérmico.

Figura 9 - Calorímetro diferencial de varredura TA DSC 2010

Fonte: Própria autoria.

4.3.12 Microscopia eletrônica de varredura (SEM):

As amostras de filmes utilizadas nas análises de SEM foram acondicionadas em dessecadores com sílica gel por sete dias. Ao sexto dia, o dessecador com as amostras foi submetido a vácuo por 24 horas. As amostras foram criofraturadas para análise no microscópio eletrônico de varredura (SEM Hitachi, TM3000, Tokyo, Japão) (Figura 10) com feixe a 15Kv (CARVALHO; GROSSO, 2004).

Figura 10 - Microscópio eletrônico de varredura Hitachi, TM3000.

Fonte: Própria autoria.

4.3.13 Microscopia de força atômica (AFM):

A análise AFM dos filmes foi feita seguindo metodologia descrita por (SARKAR; CHAUDHURI, 1994), usando microscópio de força atômica (NT-MDT SOLVER NEXT SPM – Rússia) (Figura 11). As análises foram feitas no modo semi-contato ou intermitente com velocidade de scan de 0,3 Hz, utilizando uma ponteira com frequência de ressonância 150kHz e constante de força de 5 N/m. A área das imagens foi de 50 μm^2 com resolução de 0,2 um/pixel. A rugosidade

média R_a (nm) e a rugosidade quadrática R_q (nm) foi calculada utilizou-se o software Image Analysis 3.2.5.

Figura 11 - Microscópio de força atômica NT-MDT SOLVER NEXT SPM.

Fonte: Própria autoria.

4.3.14 Cristalinidade:

A cristalinidade dos filmes foi determinada por difração de raios X seguindo metodologia descrita por Bergo; Sobral (2007). As amostras dos filmes (7x12 mm^2) foram sobrepostas numa placa de vidro e colocadas na câmara do equipamento (X-Ray diffractometer RU200B (Rigaku Rotaflez)), acoplado com ânodo de Cu. As medições foram feitas a uma velocidade de 2 °/mn, a temperatura ambiente, 40 KV e corrente de 80 mA.

4.4 Avaliação do efeito do tempo de armazenamento na estabilidade da atividade antioxidante e atividade antimicrobiana da matriz polimérica.

Os filmes controles C1, C2, C3 e C4 e o filme com melhores propriedades antioxidantes e antimicrobianas F1 (50% OE cravo + 50% OE manjericão) foram condicionados em temperatura

(± 4°C) e umidade relativa (58%) controladas durante 1 mês com avaliações semanais. Durante este período os materiais foram caracterizados em relação ao conteúdo de fenóis totais, capacidade antioxidante e atividade antibacteriana seguindo as metodologias descritas nas seções 4.4.3, 4.4.4 e 4.4.5, respectivamente.

4.5 Aplicação dos filmes ativos em carne bovina moída (Contrafilé) em forma de hambúrguer.

O filme ativo (F1) e os 3 filmes controles foram aplicados em hambúrguer de carne moída bovina (Contrafilé) de 30 g com um diâmetro de 70 mm nos os dois lados da peça e colocados em placas de petri e acondicionados em expositor a ± 4 °C por 10 dias (Figura 12). As avaliações da mudança de cor, índice de peróxidos e atividade antimicrobiana frente a *Staphylococcus aureus*, *coliformes totais* e *aeróbios mesófilos*, foi feita no dia 0, 3, 7 e 10 do armazenamento.

Figura 12 - Processo de elaboração, aplicação e acondicionamento de carne moída bovina (Contrafilé) em forma de hambúrguer embalada com filmes ativos.

Fonte: Própria autoria.

4.5.1 Parâmetros cromáticos na superfície do produto:

Os parâmetros cromáticos diferença total de cor (ΔE*), croma vermelho-verde (a*), croma amarelo-azul (b*) e luminosidade (L*) das amostras de carne foram determinados utilizando-se um colorímetro Miniscan XE (HunterLab) (Seção 4.4.7) (Figura 13) seguindo a metodologia descrita por Lekjing (2016).

Figura 13 - Colorímetro Miniscan EZ usado no teste de cor em carne moída bovina (Contrafilé) em forma de hambúrguer.

Fonte: Própria autoria.

4.5.2 Extração lipídica:

A extração lipídica da carne moída foi feita seguindo a metodologia descrita por Lekjing (2016). A amostra (30 g) foi homogeneizada em 210 mL de solução de clorofórmio: metanol: água destilada (60:120:30) e homogenizada a 10000 rpm por 1 min em ultraturrax (Ika, Modelo T18basic) (Figura 14a). Posteriormente, foram adicionado 60 mL de clorofórmio e homogeneizado por 30 s a 1000 rpm, seguido de adição de 60 mL de água destilada e homogeneizado por mais 30 s. A amostra homogeneizada foi centrifugada a 4600 rpm por 10 min (Figura 14b). A fase clorofórmica foi separada e adicionado 4 g de sulfato de sódio anidro (Figura 14c). Posteriormente, a fase clorofórmica foi filtrada em papel Whatman No. 1 (Figura 14d). O solvente foi evaporado a 105 °C em estufa; o extrato lipídico foi deixado em dessecador com sílica gel para posterior análise.

Figura 14 - Processo de extração lipídica da carne moída. Homogeneização da amostra (a). Centrifugação solução (b). Separação fase clorofórmica (c). Amostra filtrada (d).

Fonte: Própria autoria.

4.5.3 Determinação do índice de peróxidos (IP):

O IP foi determinado seguindo metodologia descrita por Lekjing (2016), onde a ±1 g do extrato lipídico foi adicionado 0,5 mL da solução de iodeto de potássio saturado e 30 mL de solução orgânica de clorofórmio: ácido acético (2:3) e deixada em repouso por 1 min. Posteriormente, 30 mL de água destilada foram adicionados, seguido de 0,5 mL da solução de amido (1% w/v) como indicador. O IP das amostras foi determinado por titulação do iodo libertado a partir de iodeto de potássio saturado com uma solução de tiossulfato de sódio 0,01 N padronizado. O IP foi calculado seguindo a equação 11, os valores são expressos em mEq/kg de gordura.

$$IP(mEq/kg\ gordura) = \frac{(V_1 - V_2)\ x\ N\ x\ F\ x\ 1000}{P} \qquad (11)$$

Onde,

V_1: volume de tiossulfato de sódio 0,01 N gasto na titulação.

V_2: volume de tiossulfato de sódio 0,01 N na prova em branco.

N: normalidade

F: fator de correção

P: peso da gordura em grama

1000: conversão para miliequivalente

4.5.4 Análise microbiológica:

A contagem de *aeróbios mesófilos*, *coliformes totais* e *Staphylococcus aureus* foi feita usando Placas 3M™ Petrifilm™, onde inicialmente, a 10 g da amostra de carne moída foi adicionado 100 mL de agua peptonada (0,1%) obtendo uma concentração de 0,1 g/mL. A amostra foi misturada em *stomacher* (Marconi Modelo MA 440) por 2 min, e foram feitas diluições em agua peptonada entre 10^{-1} e 10^{-6} g/mL. Após, 1 mL da diluição foi colocada em cada placa Petrifilm™ e incubada a 37 °C por 24 h para *coliformes totais* e *S. aureus* e a 37 °C por 48 h para *aeróbios mesófilos*. A contagem das placas foi feita usando contador de colônias manual (Phoenix CP 608) e os resultados foram expressados em logUFC/g.

4.6 Análise estatística

A avaliação dos resultados foi realizada através de análise multivariada (ANOVA), estabelecendo diferenças estatísticas entre os valores médios observados em cada uma das formulações através do Teste de Fisher a 95% de confiança utilizando-se o pacote estatístico STATISTICA® v.8.0.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Extração e caracterização da própolis vermelha (EEP)

5.1.1 Conteúdo de Fenóis totais:

Os resultados da quantificação de fenóis totais dos diferentes extratos etanólicos de própolis vermelhas são apresentados na tabela 4. Os tratamentos apresentaram diferenças significativas entre eles ($p<0,05$). Os maiores resultados foram apresentados nas amostras extraídas com etanol ao 96%, sendo que, o tratamento B4 (25°C x 48h) apresentou o maior valor médio (233,30 ± 3,50), seguido do tratamento A4 (201,12 ± 2,91). Os menores valores não apresentaram diferenças significativas ($p>0,05$) entre eles e foram apresentados nos tratamentos A3, B1 e B2.

Tabela 4 - Conteúdo de fenóis totais dos extratos etanólicos de própolis vermelha

Temperatura x Tempo	Concentração etanol	Tratamento	Conteúdo de fenóis totais (mg de Ácido Gálico/g de extrato)
50°C x 30 min	70%	A1	195,6 ± 3,1 [c]
	80%	A2	186,5 ± 1,7 [d]
	90%	A3	172,4 ± 0,8 [e]
	96%	A4	201,1 ± 2,9 [b]
25°C x 48h	70%	B1	173,1 ± 0,4 [e]
	80%	B2	171,3 ± 1,8 [e]
	90%	B3	196,6 ± 2,3 [bc]
	96%	B4	233,3 ± 3,5 [a]

Fonte: Própria autoria
a,b letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa para cada tratamento de EEP

Alencar et al. (2007) obtiveram extratos etanólicos (EEP) usando 100 g de própolis bruta e 450 mL de etanol 80% v/v a 70 °C x 30 min, e além do EEP, quantificaram o conteúdo de fenóis totais das frações hexânicas (H-Fr) e clorofórmicas (Clor-Fr) obtendo valores de 223 ± 22,3, 167 ± 2,2 e 324 ± 4,2 mg de ácido gálico/ g de própolis respectivamente. As diferenças entre as frações são explicadas pela existência de compostos fenólicos com diferentes polaridades na própolis vermelha.

Estudos similares ao anterior foram feitos por Cabral et al. (2009), onde foi usado 100 g de própolis bruta e 450 mL de etanol 80% v/v a 70°C x 30 min para a obtenção do EEP, reportando

teor de fenóis totais de 257,98 mg ácido gálico/ g de própolis. Estes resultados foram superiores aos reportados nesta tese e podem ser explicados pelas diferenças na quantificação dos fenóis, a concentração de extrato usada e a origem da amostra bruta. Trabalhos mais recentes de Cabral et al. (2012) com outros tipos de própolis brasileiras, usando o mesmo método de extração que no estudo da própolis vermelha, demostraram menor teor de fenóis totais (14,8 – 169,6 mg ácido gálico/ g de própolis), indicando que a própolis vermelha brasileira apresenta maior teor de fenóis totais que os reportados em outros tipos de própolis brasileiras.

Outro estudo realizado com própolis vermelha brasileira foi realizado por Frozza et al. (2013), no qual produziram EEP com 1 g de própolis bruta e 10 mL de etanol (70% v/v) por 24 horas a temperatura ambiente e quantificaram o teor de fenóis totais: 151,55 ± 1,95 mg ácido gálico/ g de própolis. Righi et al. (2011) encontraram valores superiores de fenóis totais (416,31mg ácido ρ-cumarico/ g de própolis) em extratos metanólicos de própolis vermelha. As diferenças encontradas podem ser explicadas pelo solvente, concentração de própolis bruta e o método de extração utilizados nesses estudos.

5.1.2 Conteúdo de Flavonoides:

O conteúdo de flavonoides nos extratos etanólicos de própolis vermelha brasileira analisados nesta tese apresentaram diferenças significativa entre eles ($p<0,05$), sendo que, os tratamentos a menor temperatura e maior tempo de extração mostraram os maiores valores (Tabela 5). Similarmente, pode-se observar uma relação direta entre a maior concentração de etanol (%v/v), e maior quantidade de flavonoides extraídos da amostra bruta (Tratamento B4), sendo que, para os dos tratamentos A e B o maior teor foi apresentado quando a extração foi realizada com etanol ao 96%v/v.

Tabela 5 - Conteúdo de flavonoides dos extratos etanólicos de própolis vermelha

Temperatura x Tempo	Concentração etanol	Tratamento	Conteúdo de flavonoides (mg de Quercetina/g de extrato)
50°C x 30 min	70%	A1	15,3 ± 1,07 [f]
	80%	A2	24,3 ± 1,8 [e]
	90%	A3	27,4 ± 2,3 [de]
	96%	A4	30,5 ± 0,9 [cd]
25°C x 48h	70%	B1	30,5 ± 1,8 [cd]
	80%	B2	31,6 ± 3,6 [c]
	90%	B3	40,7 ± 3,1 [b]
	96%	B4	50,0 ± 1,0 [a]

Fonte: Própria autoria.
a,b letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa para cada tratamento de EEP

Alencar et al. (2007) produziram extrato de própolis vermelha usando 200g de própolis bruta e 450 mL de etanol (80% v/v) a 70°C x 30 min; e frações com hexano (H-Fr) e clorofórmio (Clor-Fr). Os valores médios encontrados para o EEP (43 ± 1,0 mg de Quercetina/g de própolis), foram semelhantes aos reportados nesta tese. Para as frações, foram determinados valores de 158 ± 0,9 mg de Quercetina/g de própolis (H-Fr) e 10 ± 0,6 mg de Quercetina/g de própolis (Clor-Fr). O maior teor de flavonoides presentes na H-Fr pode ser explicado pela formação de complexos estáveis com o cátion alumínio, verificada em análise de cromatografia de camada delgada.

Estudos realizados com extratos metanólicos de própolis vermelha brasileira, por Righi et al. (2011) reportaram valores de 32,91 mg de Quercetina/g de própolis, similares aos presentados com outros extratos etanólicos de própolis vermelha e nesta tese. Trabalhos realizados por Miguel et al. (2014) em treze amostras de extratos aquosos e metanólicos de própolis de Portugal coletados nas estações inverno e verão e produzidos com 1 g de própolis bruta e 10 mL de água a 80 °C x 3 h, apresentaram valores muito baixos de flavonoides (0,85 ± 0,06 – 2,76 ± 0,15 mg de Quercetina/g de própolis), encontrando diferenças significativas entre as 13 amostras analisadas, considerando o local de colheita, a estação do ano e o tipo de extrato, aquoso e metanólico. Os resultados obtidos nesta tese são semelhantes aos encontrados por outros autores em própolis vermelha brasileira, sendo que, esta apresenta maior teor de flavonoides que outros tipos de própolis reportados na literatura.

5.1.3 Extrato seco:

Os valores do extrato seco das amostras de extrato etanólico de própolis vermelha são apresentados na Tabela 6. Os tratamentos utilizados para produzir os extratos apresentaram diferenças estatísticas ($p<0,05$), sendo que, as extrações realizadas com etanol ao 96% obtiveram os maiores valores de extrato seco, relacionando estes resultados com os extratos com maior conteúdo de fenóis e flavonoides como foi descrito nas seções anteriores. O tratamento A4 apresentou o maior valor de extrato seco, embora não tenha apresentado o maior teor de fenóis e flavonoides, isso pode ter ocorrido porque a própolis bruta em altas temperaturas, ceras e resinas presentes na amostra foram solubilizadas e aumentaram o extrato seco, mas não a capacidade antioxidante do extrato.

Tabela 6 - Conteúdo do extrato seco dos extratos etanólicos de própolis vermelha

Temperatura x Tempo	Concentração etanol	Tratamento	Extrato seco (g/100g amostra (b.u))
50°C x 30 min	70%	A1	8,4 ± 0,1 [g]
	80%	A2	10,9 ± 0,2 [f]
	90%	A3	14,4 ± 0,6 [e]
	96%	A4	28,7 ± 0,5 [a]
25°C x 48h	70%	B1	21,7 ± 0,4 [c]
	80%	B2	23,7 ± 0,3 [b]
	90%	B3	20,9 ± 0,2 [d]
	96%	B4	23,7 ± 0,1 [b]

Fonte: Própria autoria.
a,b letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa para cada tratamento de EEP

Cunha et al. (2004) produziram extratos etanólicos de 6 amostras de própolis do sudeste do Brasil usando diferentes tratamentos com etanol a 96, 70, 50 e 30% v/v e mantidos a temperatura ambiente por 7, 10, 20 e 30 dias de extração ou extração soxhlet. Observaram-se diferenças estatísticas quando aumentou o tempo de extração de 10 a 20 dias, embora, o maior valor de extrato seco foi apresentado pelas amostras extraídas em soxhlet. Em relação ao solvente, os extratos produzidos com etanol ao 70% apresentou maior extrato seco que os produzidos com etanol ao

96%, mas, estes extratos não apresentaram diferenças estatísticas em relação ao conteúdo de fenóis totais.

Outros trabalhos feitos com própolis brasileira por Funari e Ferro (2006) apresentaram resultados maiores de extrato seco. Foram usadas 3 amostras de própolis bruta (10 g) e extraídas com metanol (150 mL) com sistema soxhlet. Embora, os extratos apresentaram valores médios de 32,2 ± 2,6%, maiores que os reportados nesta tese, o conteúdo de fenóis totais e flavonoides foram menores. Por outro lado, trabalhos feitos com 10 amostras de extratos etanólicos de própolis mexicana (TOLOZA; CAÑIZARES, 2002) produzidas com 20 g de própolis bruta e 200 mL de etanol ao 80%, reportaram valores de 19,61 ± 0,93% para a amostra de própolis vermelha. Estes resultados são semelhantes aos reportados nesta tese, para as amostras com tratamento de 25°C x 48h.

5.1.4 Capacidade antioxidante:

A capacidade antioxidantes dos diferentes extratos etanólicos de própolis vermelha quantificados através da inibição do radical $DPPH^{\bullet}$ e $ABTS^{\bullet+}$ estão apresentados nas tabelas 7 e 8, respectivamente. Os resultados para medir a capacidade antioxidante dos EEP´s frente ao radical $DPPH^{\bullet}$ foram determinados pelos valores de EC50, que indica a concentração do extrato que inibe a metade do radical DPPH e pela porcentagem de inibição total. Os tratamentos apresentaram diferenças estatísticas ($p<0,05$) tanto para os valores de EC50 como para %Inibição, sendo que, a maior atividade sequestrante foi dada pelos tratamentos A3 e B2 (Tabela 7). Em relação a %Inibição, os tratamentos A2, A4 e B2 não apresentaram diferenças estatística ($p>0,05$). A menor atividade antioxidante foi apresentada pelo tratamento A1 e B1.

Resultados semelhantes aos reportados nesta tese foram descritos por Frozza et al. (2013), que produziram extratos etanólicos usando 1 g de própolis vermelha bruta e 10 mL de etanol (70% v/v) a temperatura ambiente por 24 horas, reportando valores de EC50 de 270,1 ± 24,6 µg/mL. Outros estudos da atividade sequestrante do radical livre $DPPH^{\bullet}$ em extrato etanólico de própolis vermelha brasileira (EEP) foi feita por Alencar et al. (2007), onde, 100 g de própolis vermelha bruta e 450 mL de etanol (80% v/v) foram sometidos a tratamento de 70°C x 30 min para a obtenção do EEP. Além disso, foi realizada frações de hexano (H-Fr) e clorofórmio (Clor-Fr) para

determinação da atividade antioxidante usando como referências as substancias BHT e α-tocoferol. Os resultados obtidos neste estudo foram maiores que os reportados nesta tese, encontrando-se entre 55 e 78% de inibição. Estes resultados podem ser explicados devido a menor concentração utilizada neste trabalho para a determinação da atividade sequestrante do radical DPPH•.

Tabela 7 - Resultados da capacidade antioxidante das amostras de extrato etanólico de própolis vermelha quantificada pelo grau de descoloração do radical DPPH•

*Tratamento	Capacidade antioxidante equivalente a Trolox (mg eq Trolox/g própolis)	EC50 (µg/mL)	Inibição (%)
A1	61,0 ± 1,4 [g]	250,4 ± 0,6 [h]	20,2 ± 0,5 [e]
A2	83,1 ± 0,5 [d]	209,8 ± 0,9 [c]	25,4 ± 0,5 [b]
A3	99,8 ± 1,4 [b]	200,4 ± 1,3 [b]	28,3 ± 0,6 [a]
A4	125,2 ± 0,8 [a]	235,3 ± 1,2 [f]	26,1 ± 0,1 [b]
B1	64,8 ± 0,8 [f]	238,7 ± 0,3 [g]	21,2 ± 0,1 [d]
B2	82,8 ± 0,7 [d]	197,7 ± 1,7 [a]	25,5 ± 0,6 [b]
B3	69,1 ± 0,8 [e]	225,1 ± 0,9 [e]	22,0 ± 0,2 [c]
B4	70,4 ± 0,8 [e]	222,1 ± 1,8 [d]	22,6 ± 0,1 [c]

Fonte: Própria autoria.
*A1: 50 °C x 30 min, 70% etanol; A2: 50 °C x 30 min, 80% etanol; A3: 50 °C x 30 min, 90% etanol; A4: 50 °C x 30 min, 96% etanol; B1: 25 °C x 48 h, 70% etanol; B2: 25 °C x 48 h, 80% etanol; B3: 25 °C x 48 h, 90% etanol; B4: 25 °C x 48 h, 96% etanol.
a,b letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa para cada tratamento de EEP

Cabral et al. (2009) produziram extrato de própolis vermelha usando 100 g de própolis vermelha bruta e 450 mL de etanol (80% v/v) a 70°C x 30 min, e frações de hexano, clorofórmio e sub-frações, e avaliaram a atividade sequestradora do radical DPPH• para o extrato, frações e sub-frações, encontrando a maior inibição pela fração de hexano (74,4%), seguida do EEP (50,5%). Porém, avaliações da atividade antioxidante de 2 tipos de própolis brasileira (G6 e G12) feitas por Cabral et al. (2012) com extrato etanólico (80% v/v), mostraram resultados para a tipo G6 de 21,7%; resultado semelhante aos encontrados nesta tese pelas amostras B1 e B3. Diferenças entre resultados reportados por vários autores e os obtidos nesta tese podem ser explicados pela diferença na concentração da amostra, método de extração e determinação da atividade sequestrante.

Em relação a inibição do radical $ABTS^{\bullet+}$ pelos EEP´s, todos os tratamentos apresentaram diferenças estatísticas ($p<0,05$), sendo que, os tratamentos B1 e B2 obtiveram os maiores de %Inibição, 55,3 ± 0,1 e 62,0 ± 0,1 % respectivamente (Tabela 8). Todas amostras sometidas a extração a 25°C x 48h apresentaram maior inibição em relação as amostras tratadas a 50°C x 30 min, apresentando menores valores as amostras A1 e A3. Neste caso, a temperatura e o tempo de tratamento influenciaram diretamente a capacidade de inibição do radical ABTS de cada amostra avaliada.

Tabela 8 - Resultados da capacidade antioxidante das amostras de extrato etanólico de própolis vermelha quantificada pelo grau de descoloração do radical $ABTS^{\bullet+}$.

*Tratamento	Capacidade antioxidante equivalente a Trolox (mg eq Trolox/g própolis)	Inibição (%)
A1	273,5 ± 1,0 ^{g}	36,8 ± 0,3 ^{f}
A2	340,1 ± 1,0 ^{d}	43,0 ± 0,2 ^{e}
A3	301,0 ± 2,5 ^{e}	36,2 ± 0,5 ^{g}
A4	286,8 ± 0,6 ^{f}	36,9 ± 0,2 ^{f}
B1	300,9 ± 1,2 ^{e}	55,3 ± 0,1 ^{b}
B2	387,3 ± 0,7 ^{c}	62,0 ± 0,1 ^{a}
B3	420,7 ± 1,1 ^{b}	53,6 ± 0,3 ^{c}
B4	478,8 ± 0,7 ^{a}	50,5 ± 0,6 ^{d}

Fonte: Própria autoria.
*A1: 50 °C x 30 min, 70% etanol; A2: 50 °C x 30 min, 80% etanol; A3: 50 °C x 30 min, 90% etanol; A4: 50 °C x 30 min, 96% etanol; B1: 25 °C x 48 h, 70% etanol; B2: 25 °C x 48 h, 80% etanol; B3: 25 °C x 48 h, 90% etanol; B4: 25 °C x 48 h, 96% etanol.
a,b letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa para cada tratamento de EEP

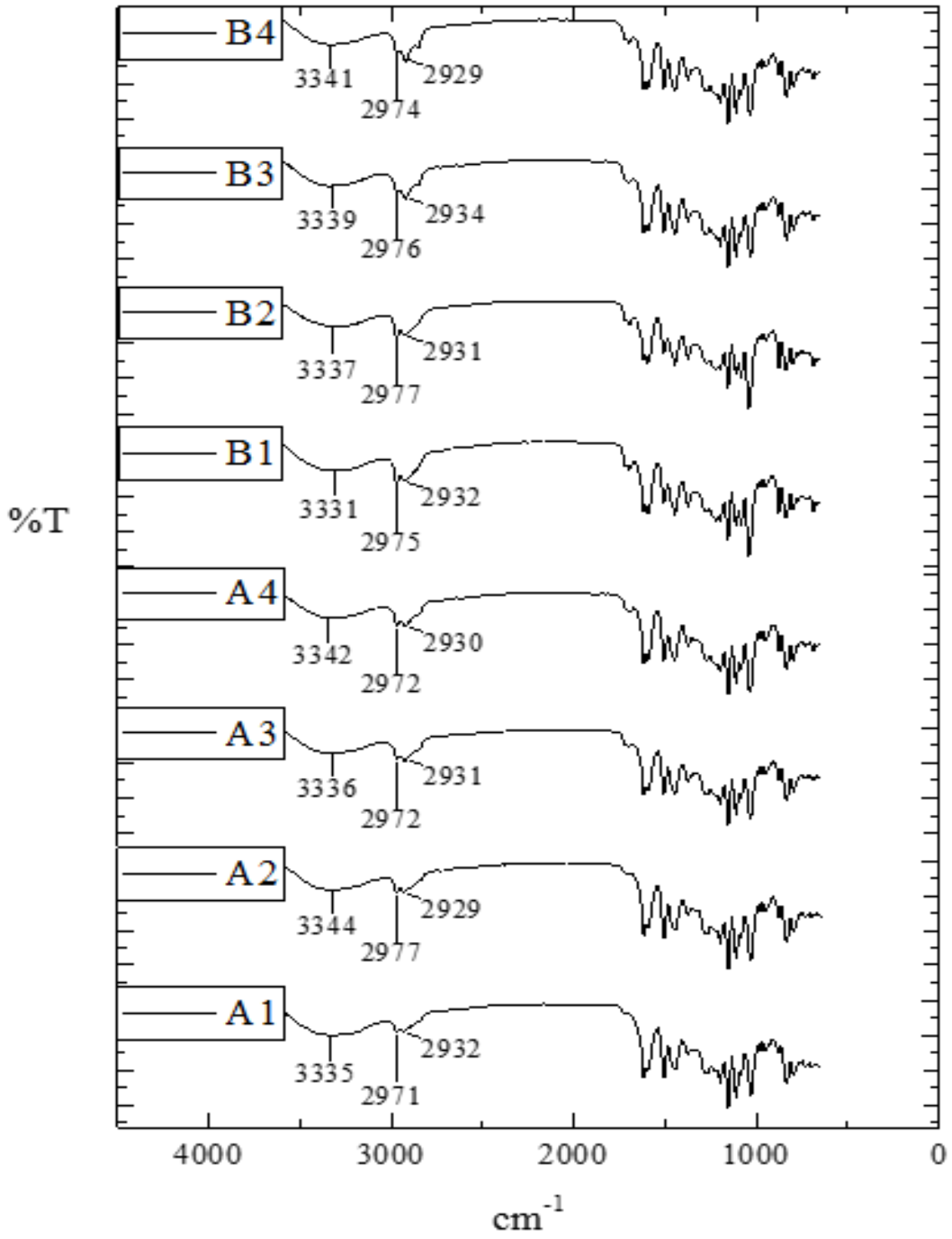
Miguel et al. (2014) produziram extratos aquosos e metanólicos de 13 amostras de própolis de Portugal com 1g de amostra bruta e 10 mL do solvente a 80 °C x 3h. As amostras foram coletadas nas estações de inverno e verão, encontrando-se diferenças estatísticas entre os resultados de %Inibição para o radical ABTS com uma ampla faixa de diferença: 31,20 ± 1,22 – 78,90 ± 2,79%. Da mesma forma, Mohdaly et al. (2015) avaliaram extratos metanólicos de própolis de Egypto em diferentes concentrações encontrando valores de %Inibição entre 31 – 95%. Em relação a própolis

brasileira, Lacerda (2012) avaliou a atividade antioxidante de 14 amostras de própolis das regiões de Santa Catarina e Paraná, encontrando uma variação muito grande no TEAC das amostras de acordo com a região e flora presente no local da coleta. A faixa de valores reportados no estudo foi 78,38 – 384,60 mgEq Trolox/g própolis. Os resultados dos trabalhos citados são semelhantes aos reportados nesta tese, considerando que fatores como local da coleta, solvente e método usado na extração e concentração da amostra usada nas análises afetam diretamente nos resultados das mesmas.

5.1.5 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR):

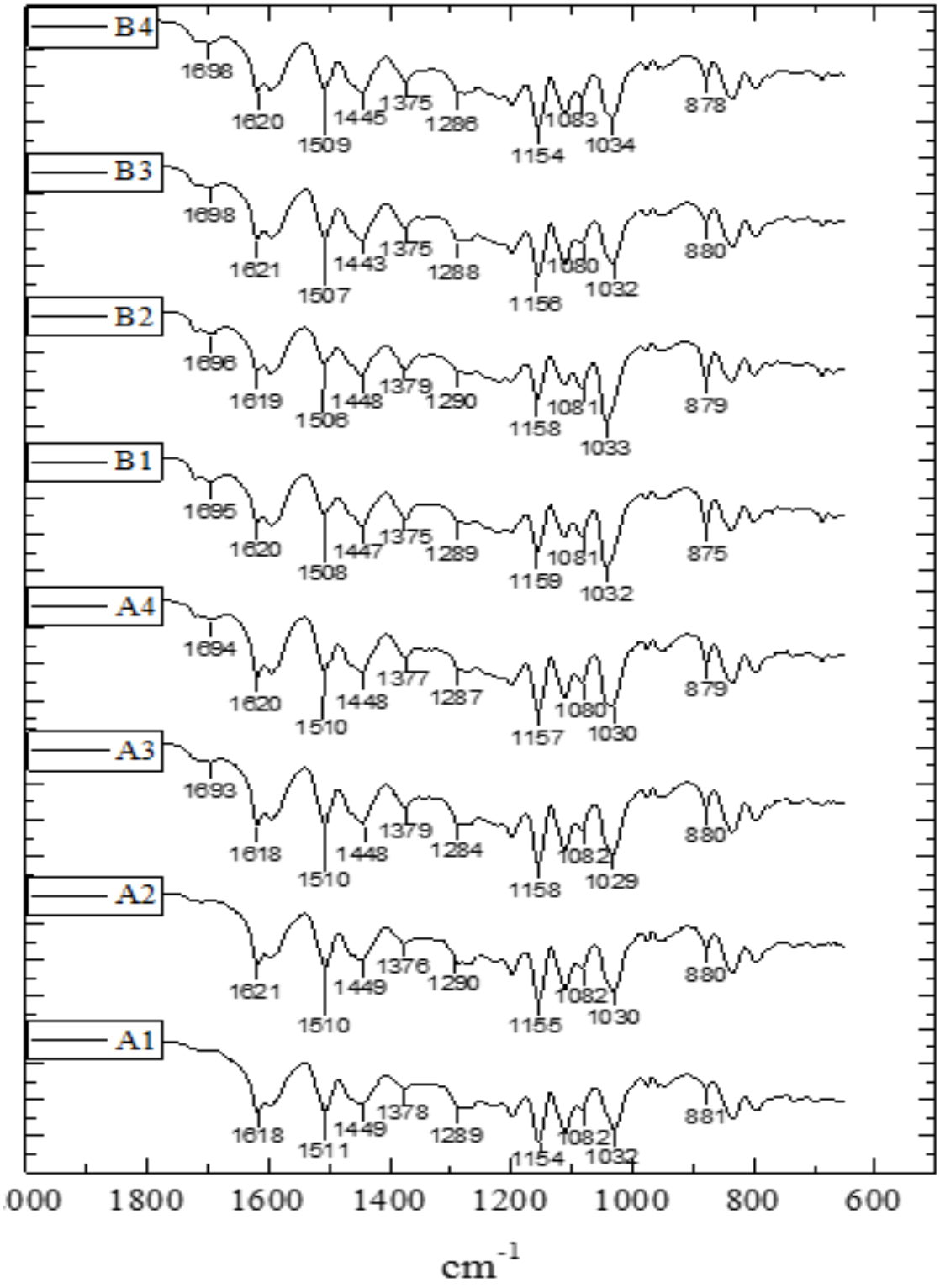
Os sinais característicos dos espectros infravermelhos dos oito extratos etanólicos de própolis vermelha em faixas de 4000 – 650 cm^{-1} e 1800 – 650 cm^{-1} estão apresentados na Figura 15 e Figura 16, respectivamente. Pode-se observar semelhança nos espectros, já que são produzidos com mesma amostra de própolis bruta, variando o solvente e o tratamento usado para a extração.

Figura 15 - Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) dos extratos etanólicos de própolis vermelha na faixa de 4000 – 650 cm^{-1}.



Fonte: Própria autoria.

Figura 16 - Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) dos extratos etanólicos de própolis vermelha na faixa de 1800 – 650 cm^{-1}.



Fonte: Própria autoria.

Tomando como referência estudos feitos em própolis verde brasileira (DE FUNARI; DE OLIVEIRA FERRO; MATHOR, 2007; OLIVEIRA et al., 2016), própolis chinesa (WU et al., 2008b) e própolis mexicana (DELGADO ACEVES; ANDRADE ORTEGA; RAMÍREZ BARRAGÁN, 2015) foram identificados os principais sinais presentes nos espectros dos EEP (Tabela 9).

Tabela 9 – Identificação dos principais sinais característicos dos extratos etanólicos de própolis vermelha nos espectros FTIR.

Comprimento de onda (cm^{-1})	**Tipo de sinal**	**Tipo de enlace**	**Grupos funcionais**
3341	Alongamento	O-H, N-H	Hidroxilos e aminas
2972	Alongamento assimétrico	C-H	Grupos CH_2 de saturação
2932	Alongamento assimétrico	C-H	Grupos CH_2 de saturação
1694	Vibração de flexão assimétrica	C=O	Lipídeos, flavonoides e aminoácidos
1618	Alongamento – vibração assimétrica	C=C	Grupos aromáticos, flavonoides e aminoácidos
1507	Alongamento	Compostos aromáticos	Flavonoides e anéis aromáticos
1445	Vibração de flexão	CH de grupos CH_2 e CH_3, aromáticos	Flavonoides e anéis aromáticos
1375	Vibração de flexão	C-H	Grupos CH_3 de aromáticos
1288	Vibração de flexão (OH) e flexão assimétrica (C-CO)	O-H, C-CO	Hidrocarbonetos
1157	Vibrações (C-O), flexão (C-OH)	C-O, C-OH	Lipídeos, grupos alcoólicos ternários
1083	Vibração de alongamento (C-C) e flexão (C-OH)	C-C, C-OH	Flavonoides e grupos alcoólicos secundários
1033	Alongamento (=C-O-C), alongamento (C-C) e flexão (C-OH)	=C-O-C, C-C, C-OH	Grupos alcoólicos primários
878	Alongamento simétrico	C-C-O	Álcoois primários e secundários

Entre as pequenas variações apresentadas nos extratos, a de maior interesse nesta tese é a ausência nas amostras A1 e A2 do sinal 1694 cm^{-1} referente a vibração de flexão assimétrica no enlace C=O atribuído a lipídeos, flavonoides e aminoácidos, o qual pode ser relacionado com o baixo teor de flavonoides apresentado nestes tratamentos.

5.1.6 Atividade antimicrobiana.

5.1.6.1 Teste de sensibilidade:

A atividade antimicrobiana dos extratos etanólicos de própolis vermelha brasileira foi comprovada para o microrganismo *S. aureus*, mas as bactérias Gram (-) *E. co*li e *S. enteritidis* não apresentaram atividade. Observou-se diferenças estatísticas entre os tratamentos ($p<0,05$), mas só B4 apresentou atividade antimicrobiana destacada frente aos outros tratamentos (Tabela 10). Estes resultados podem ser relacionados com o maior teor de flavonoides e fenóis totais para o tratamento B4.

Tabela 10 - Atividade antimicrobiana dos extratos etanólicos de própolis vermelha contra *S. aureus*.

Temperatura x Tempo	Concentração etanol	Tratamento	Zona de inibição (mm)
50°C x 30 min	70%	A1	14,2 ± 1,0 ^{cd}
	80%	A2	14,0 ± 0,8 ^{cd}
	90%	A3	14,5 ± 0,6 ^{c}
	96%	A4	16,3 ± 1,3 ^{b}
25°C x 48h	70%	B1	15,0 ± 0,8 ^{bc}
	80%	B2	14,8 ± 0,5 ^{c}
	90%	B3	13,0 ± 0,8 ^{d}
	96%	B4	18,0 ± 1,2 ^{a}

Fonte: Própria autoria
a,b letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa para cada tratamento de EEP

A atividade antimicrobiana da própolis vermelha brasileira frente a *S. aureus* tem sido reportada por vários autores (ALENCAR et al., 2007; BISPO JUNIOR et al., 2012; DAUGSCH et

al., 2008; OLDONI et al., 2011; WA et al., 2014), sendo esta bactéria a mais estudada e susceptível a este tipo de produto natural.

Embora alguns autores reportem atividade antimicrobiana da própolis vermelha brasileira contra bactérias Gram (-) *E. coli* (RIGHI et al., 2011; TRUSHEVA et al., 2006) e *Salmonella* (RIGHI et al., 2011), os extratos avaliados nesta tese não reportaram atividade. Principalmente, a atividade antimicrobiana da própolis é atribuída aos compostos fenólicos, especialmente aos flavonoides, ácidos fenólicos e seus ésteres (KUJUMGIEV et al., 1999). Entre os principais flavonoides, os isoflavonoides e as chalconas, são consideradas importantes componentes da própolis vermelha e representam um grupo importante de compostos naturais com ampla atividade biológica, incluindo bactericida e fungicida (NOWAKOWSKA; KĘDZIA; SCHROEDER, 2008; RIGHI et al., 2011; TRUSHEVA et al., 2006).

5.1.6.2 Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM):

A concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) foi determinada para a amostra de própolis B4, pois foi esta que apresentou o maior conteúdo de fenóis totais, flavonoides e maior atividade antimicrobiana. A CIM e CBM foi determinada para as bactérias Gram (+) *S. aureus*, 5 cepas de *L. monocytogenes* e *L. innocua*, visando-se a adição do EEP em filmes biodegradáveis e aplicação em produtos cárneos.

Os valores da CIM e CBM estão apresentados na Tabela 11, sendo que, *S. aureus* apresentou maior sensibilidade ao EEP com CIM de 0,40% w/w e CBM de 0,50% w/w. Em relação as cepas de *L. monocytogenes*, a SCOTT A, apresentou a maior resistência com valores de CMI e CMB de 0,90 e 1,00% w/w respectivamente. A *L. innocua* e as outras 4 cepas de *L. monocytogenes* apresentaram sensibilidade intermediaria em relação a essas 2 cepas referenciadas anteriormente.

Poucos trabalhos sobre atividade antimicrobiana frente a *L. monocytogenes* e *L. innocua* encontram-se reportados na literatura (CASQUETE et al., 2016; DIESTRA et al., 2008; YANG et al., 2006). A comparação dos resultados obtidos nesta tese com os reportados por outros autores é dificultada pelas diferenças de origem botânica, época e local de colheita da matéria bruta (NUNES

et al., 2009), além das metodologias usadas na determinação da concentração mínima inibitória e concentração mínima bactericida para extratos naturais.

Tabela 11 - Concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) do extrato etanólico de própolis vermelha B4

Bactéria	**CIM (% w/w)**	**CBM (% w/w)**
S. aureus ATCC 29213	0,40	0,50
L. monocytogenes SCOTT A	0,90	1,00
L. monocytogenes ATCC 7644	0,60	0,70
L. monocytogenes 595	0,60	0,70
L. monocytogenes 508	0,60	0,70
L. monocytogenes 500	0,70	0,80
L. innocua 225/07	0,70	0,80

Fonte: Própria autoria.

5.2 Caracterização dos óleos essenciais

5.2.1 Conteúdo de Fenóis totais e capacidade antioxidante:

O conteúdo de fenóis totais dos óleos essenciais de cravo, manjericão e cravo estão apresentados na tabela 12. Foram encontradas diferenças estatísticas ($p<0,05$), sendo que, o óleo de cravo apresentou um teor significativamente maior (540,3 ± 0,9 mg AG/g de OE) que em outros óleos avaliados. Esta diferença pode ser atribuída ao componente principal do cravo, o Eugenol; sua capacidade antioxidante tem sido amplamente reportada e é considerado um dos compostos ativos naturais de maior eficácia, sendo sua atividade maior o igual a compostos antioxidantes sintéticos (GÜLÇIN; ELMASTAŞ; ABOUL-ENEIN, 2012; JIROVETZ et al., 2006; LV et al., 2012; MAHDAVIKIA; SAHARKHIZ, 2015; TEIXEIRA et al., 2013).

Tabela 12 - Conteúdo de fenóis totais dos óleos essenciais

Óleo essencial	Conteúdo de fenóis totais (mg de Ácido Gálico/g de OE)
Cravo	540,3 ± 1,0 [a]
Manjericão	56,9 ± 0,5 [b]
Hortelã	0,8 ± 0,1 [c]

Fonte: Própria autoria.
a,b letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa para cada óleo essencial

A atividade antioxidante dos óleos essenciais foi determinada por dois métodos, a redução do radical $DPPH^{\bullet}$ e do cátion $ABTS^{\bullet+}$. Uma das principais diferenças entre os dois métodos é que o radical $ABTS^{\bullet+}$ é mais reativo do que o radical $DPPH^{\bullet}$ e, ao contrário das reações com o radical $DPPH^{\bullet}$ que envolvem transferência de átomos de Hidrogênio, as reações com radicais $ABTS^{\bullet+}$ envolvem processo de transferência de elétrons (GÜLÇIN; ELMASTAŞ; ABOUL-ENEIN, 2012; KAVIARASAN et al., 2007).

Os resultados da capacidade antioxidante dos óleos essenciais quantificada pelo grau de descoloração do radical $DPPH^{\bullet}$ estão apresentados na tabela 13. O menor valor de EC50 foi apresentado pelo óleo essencial de cravo ($p<0,05$), seguido do óleo de manjericão e hortelã. Esse mesmo comportamento foi observado na % de inibição ($p<0,05$). Embora os resultados da capacidade antioxidante estejam relacionados com o conteúdo de fenóis totais, a %Inibição e o EC50 estão diretamente relacionados com as concentrações do óleo utilizado na medição.

Tabela 13 - Resultados da capacidade antioxidante dos óleos essenciais quantificada pelo grau de descoloração do radical $DPPH^{\bullet}$

Óleo essencial	EC50 (µg/mL)	Inibição (%)
Cravo	154,4 ± 1,0 [a]	31,9 ± 0,1 [a]
Manjericão	249,3 ± 1,1 [b]	19,9 ± 0,2 [b]
Hortelã	378,5 ± 1,1 [c]	15,8 ± 0,1 [c]

Fonte: Própria autoria.
EC50: concentração necessária para inibir 50% da concentração inicial de $DPPH^{\bullet}$
a,b letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa para cada óleo essencial

Os resultados da capacidade antioxidante dos três óleos essenciais quantificada pelo grau de descoloração do cátion $ABTS^{\bullet+}$ estão apresentados na tabela 14. A %inibição do óleo essencial do cravo apresentou o maior valor (72,5 ± 0,3%), seguido do óleo de hortelã (48,3 ± 0,2) e óleo de manjericão (47,4 ± 0,1), com diferenças estatísticas entre eles.

Tabela 14 - Resultados da capacidade antioxidante dos óleos essenciais quantificada pelo grau de descoloração do cátion $ABTS^{\bullet+}$.

Óleo essencial	Inibição (%)
Cravo	72,5 ± 0,3 [a]
Manjericão	47,4 ± 0,1 [c]
Hortelã	48,3 ± 0,2 [b]

Fonte: Própria autoria.
a,b letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa para cada óleo essencial

Gülçin, Elmastas e Aboul-Enein (2012) avaliaram a capacidade antioxidante de óleo essencial de cravo e compararam a atividade frente aos compostos antioxidantes sintéticos BHT, BHA, trolox e α-tocoferol em concentrações entre 15 e 45 µg/mL, encontrando que para a inibição do radical $DDPH^{\bullet}$, o maior efeito inibidor foi apresentado pelo óleo essencial de cravo, seguido do BHT, α-tocoferol, BHA e trolox. Em relação a inibição do cátion $ABTS^{\bullet+}$, o óleo essencial de cravo, o BHA e BHT apresentaram os maiores valores, seguido de α-tocoferol e trolox em uma concentração de 45 µg/mL.

Politeo, Jukic e Milos (2007) avaliaram a capacidade antioxidante através da inibição do radical $DPPH^{\bullet}$ de aglyconas voláteis do manjericão e compararam com o óleo essencial de manjericão e o antioxidante sintético BHT e o α-tocoferol em concentrações entre 0,01 e 50 g/L. Esses autores encontraram que após 60 min de reação, os valores de inibição de todos os compostos não apresentaram diferenças estatísticas ($p>0,05$) e que a porcentagem de inibição está em função da concentração do óleo essencial. Singh, Shushni e Belkheir (2015) avaliaram a capacidade antioxidante do óleo essencial de hortelã e os extratos de éter de petróleo, clorofórmico, acetato de etilo, etanólico e aquoso. A maior atividade de inibição do radical DPPH foi exibida pelo óleo

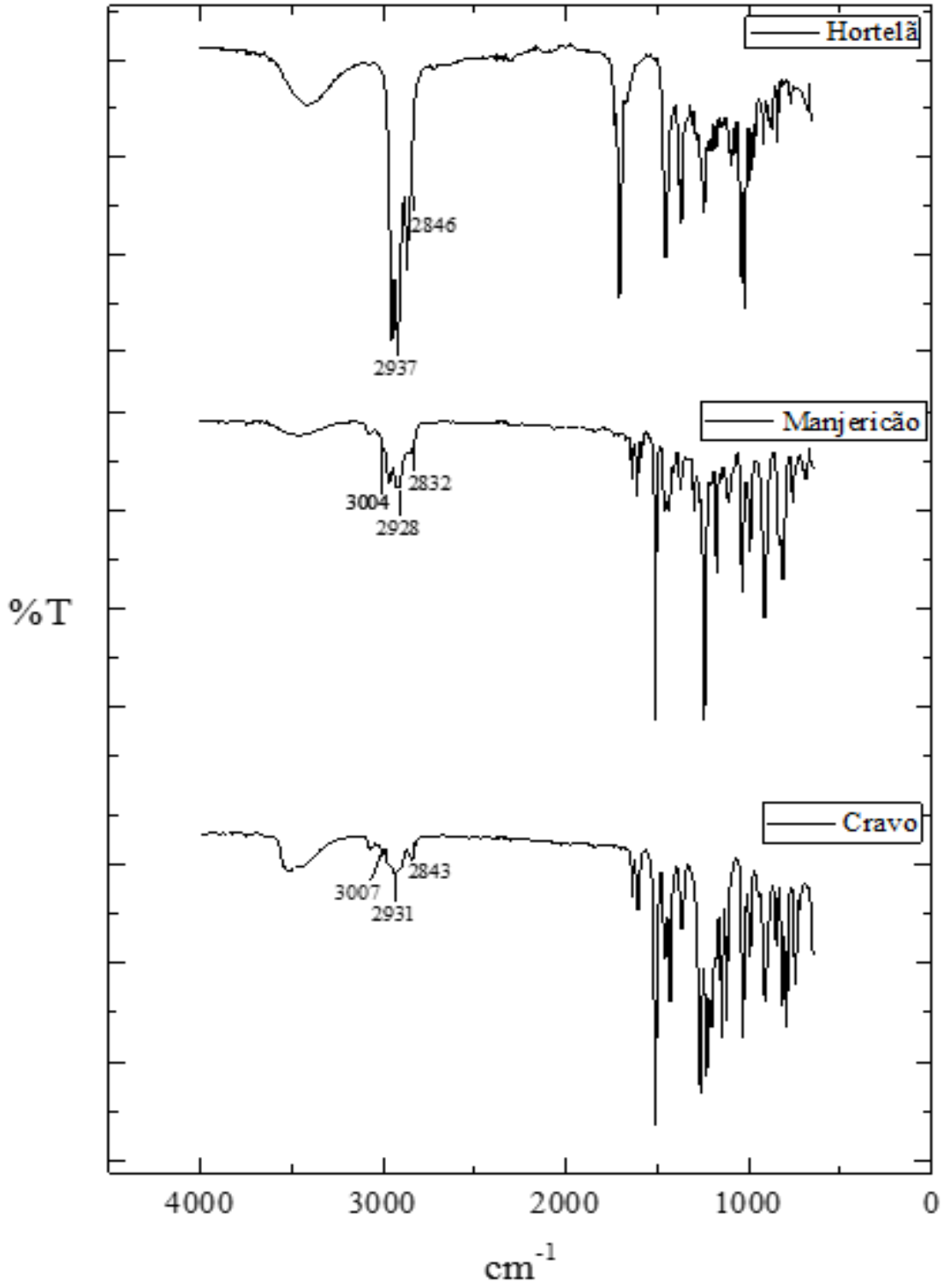
essencial de hortelã seguida do extrato clorofórmico. A menor atividade foi apresentada pelos extratos aquosos e éter de petróleo.

5.2.3 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR):

Os sinais característicos dos espectros infravermelhos dos óleos essenciais de cravo, de manjericão e de hortelã em faixas de 4000 – 650 cm^{-1} e 1800 – 650 cm^{-1} são apresentados na Figura 17 e Figura 18, respectivamente.

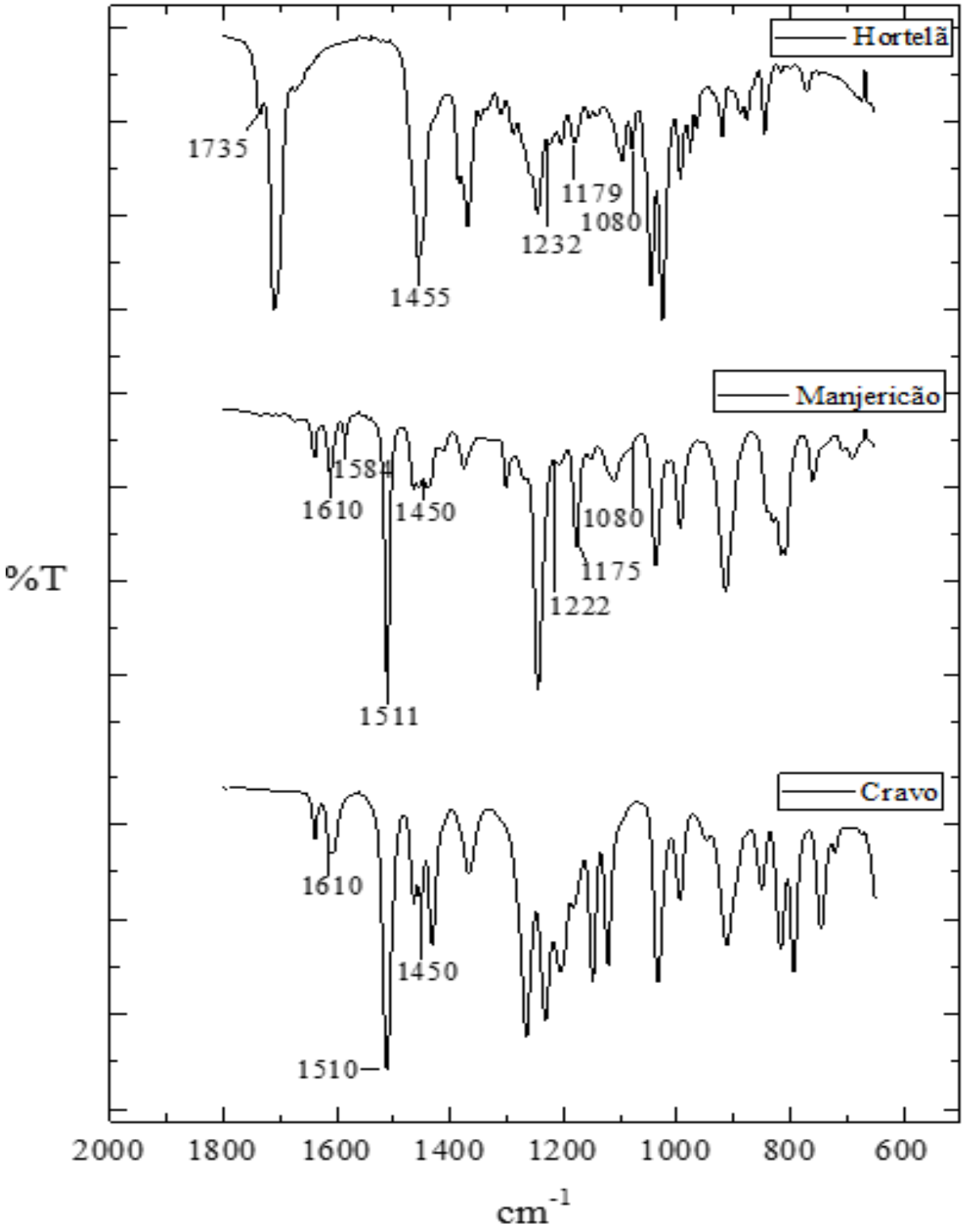
Tomando como referência estudos feitos com diferentes óleos essenciais (GONZÁLEZ-RIVERA et al., 2016; HERNÁNDEZ; ZACCONI, 2009; LI; KONG; WU, 2013; WU et al., 2008a) foram identificados os principais sinais presentes nos espectros (Tabela 15). Entre as principais diferenças observadas nos espectros infravermelhos dos três óleos essenciais, o hortelã apresenta o sinal 1735 cm^{-1}, o qual é atribuído a vibração de estiramento do grupo carbonilo (C=O) no grupo cetona, que pode ser atribuído ao composto fenchona (GONZÁLEZ-RIVERA et al., 2016). Nos óleos essenciais de cravo e manjericão foi encontrado o sinal 1611 cm^{-1}, atribuído a vibrações de estiramento no anel de fenilo próprio do composto maioritário do cravo, o eugenol (GONZÁLEZ-RIVERA et al., 2016; WU et al., 2008a).

Figura 17 - Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) dos óleos essenciais na faixa de 4000 – 650 cm^{-1}.



Fonte: Própria autoria.

Figura 18 - Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) dos óleos essenciais na faixa de 1800 – 650 cm^{-1}.



Fonte: Própria autoria.

Tabela 15 – Identificação dos principais sinais características dos óleos essenciais nos espectros FTIR.

Comprimento de onda (cm^{-1})	Tipo de sinal	Tipo de enlace	Grupos funcionais
3003	Tensão	C=CH	Ácidos graxos insaturados
2937	Alongamento assimétrico	C-H	Grupos CH_2 de saturação
2843	Vibração de tensão simétrica (C-H) e C-H assimétrica em CH_2	C-H, C-H_2	Hidrocarbonetos
1735	Alongamento	C=O	Ésteres de triglicerídeos
1637	Vibração de alongamento	C=O	Aldeído carbônico
1585	Vibração esquelética	C=C	Anéis aromáticos
1511	Alongamento	Compostos aromáticos	Flavonoides e anéis aromáticos
1463	Vibração de flexão C-H em CH_2 e CH_3	C-H, C-H_2, C-H_3	Flavonoides e anéis aromáticos
1451	Vibração de flexão	CH de grupos CH_2 e CH_3, aromáticos	Flavonoides e anéis aromáticos
1231	Vibração de flexão C-H em CH_2 e CH_3	C-H, C-H_2, C-H_3	Flavonoides e anéis aromáticos
1288	Vibração de flexão (OH) e flexão assimétrica (C-CO)	O-H, C-CO	Hidrocarbonetos
1176	Vibrações (C-O), flexão (C-OH)	C-O, C-OH	Lipídeos, grupos alcoólicos ternários
1121	Vibrações de alongamento (C-O) e vibrações de deformação (C-OH)	C-O, C-OH	Flavonoides e grupos alcoólicos secundários
1111	Vibrações de tensão	O-CH_2	
1078	Vibração de alongamento (C-C) e flexão (C-OH)	C-C, C-OH	Flavonoides e grupos alcoólicos secundários
878	Alongamento simétrico	C-C-O	Álcoois primários e secundários
745	Vibrações de absorção	=CH	Anéis de benzeno
720	Vibrações de flexão	$(CH_2)_n$ n>4	Esqueletos carbonados
689	Vibrações de absorção	C-H	Alcanos

5.2.4 Atividade antimicrobiana.

5.2.4.1 Teste de sensibilidade, Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM):

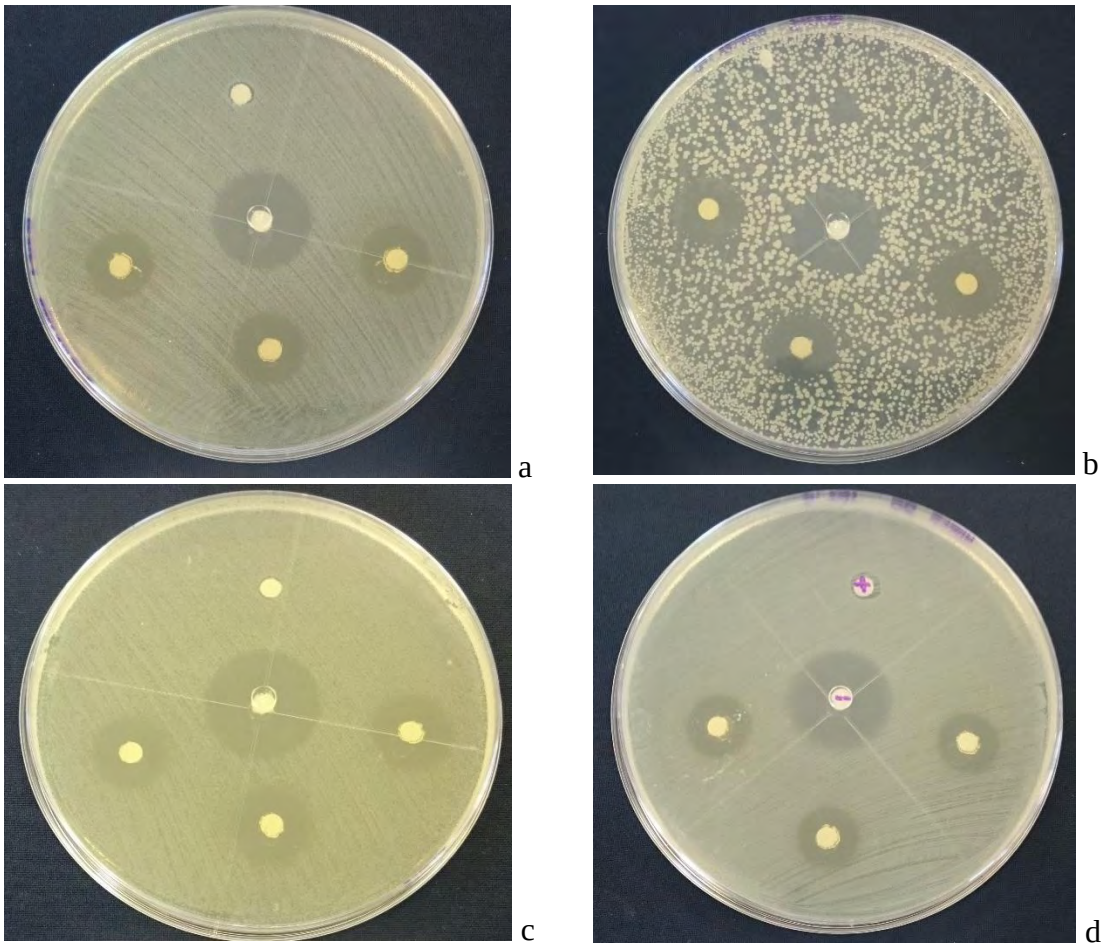
Foi avaliada a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de cravo, manjericão e cravo frente as bactérias Gram (+) *S. aureus*, *L. monocytogenes* e às bactérias Gram (-) *E. coli* e *S. enteritidis*. Observou-se maiores halos de inibição para todas as baterias referenciados para o óleo essencial de cravo (Figura 19), seguido do óleo essencial de manjericão (Figura 20). Os menores halos de inibição foram apresentados pelo óleo essencial de hortelã (Figura 21). Em todas as bactérias testadas com os diferentes óleos essenciais, a maior sensibilidade foi obtida pelo controle com o antibiótico cloranfenicol 2,5% w/v. Os resultados da zona de inibição (mm) estão na tabela 16. Para *S. aureus* e *S. enteritidis* os maiores valores de inibição forma obtidos pelos óleos de cravo e manjericão sem apresentar diferenças estatísticas ($p>0,05$) entre eles. Porém, para *L. monocytogenes* e *E. coli*, houve diferenças estatísticas para todos os óleos essenciais ($p<0,05$). O óleo essencial de cravo apresentou a maior atividade microbiológica para os microrganismos testados, seguido do óleo essencial de manjericão e hortelã.

Tabela 16 - Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais contra *S. aureus, L. monocytogenes, S. enteritidis* e *E. coli*.

Óleo essencial	**Zona de inibição (mm)**			
	S. aureus	*L. monocytogenes*	*S. enteritidis*	*E. coli*
Cravo	12,7 ± 0,6 [a]	15,7 ± 0,6 [a]	11,7 ± 0,6 [a]	14,0 ± 1,0 [a]
Manjericão	12,7 ± 0,2 [a]	11,3 ± 0,1 [b]	13,7 ± 0,2 [a]	12,0 ± 0,6 [b]
Hortelã	8,0 ± 0,2 [b]	7,3 ± 0,2 [c]	6,0 ± 1,0 [b]	6,7 ± 0,2 [c]

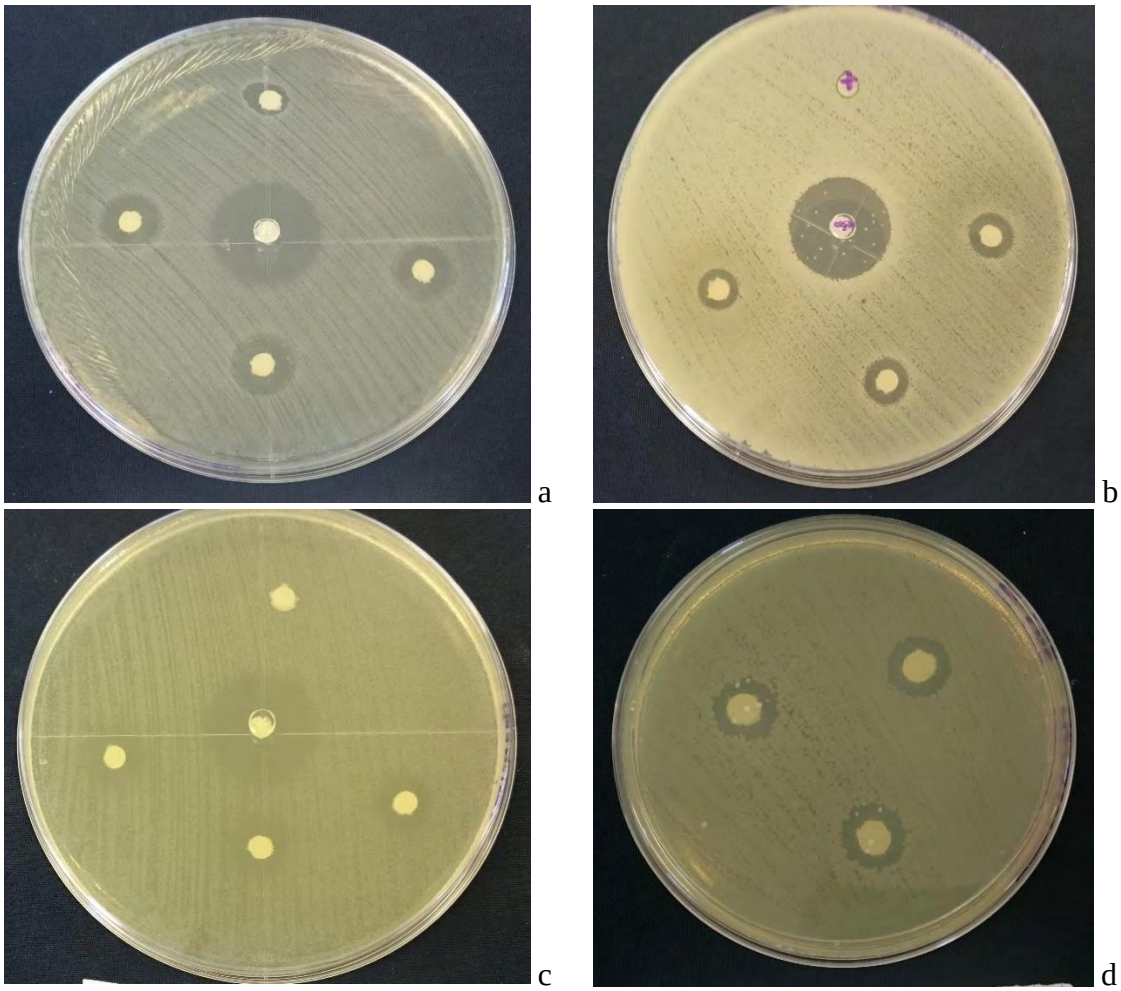
Fonte: Própria autoria.
a,b letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa para cada óleo essencial

Figura 19 - Atividade antimicrobiana do óleo essencial de cravo (a) *S. enteritidis*, (b) *S. aureus*, (c) *L. monocytogenes*, (d) *E. coli*.



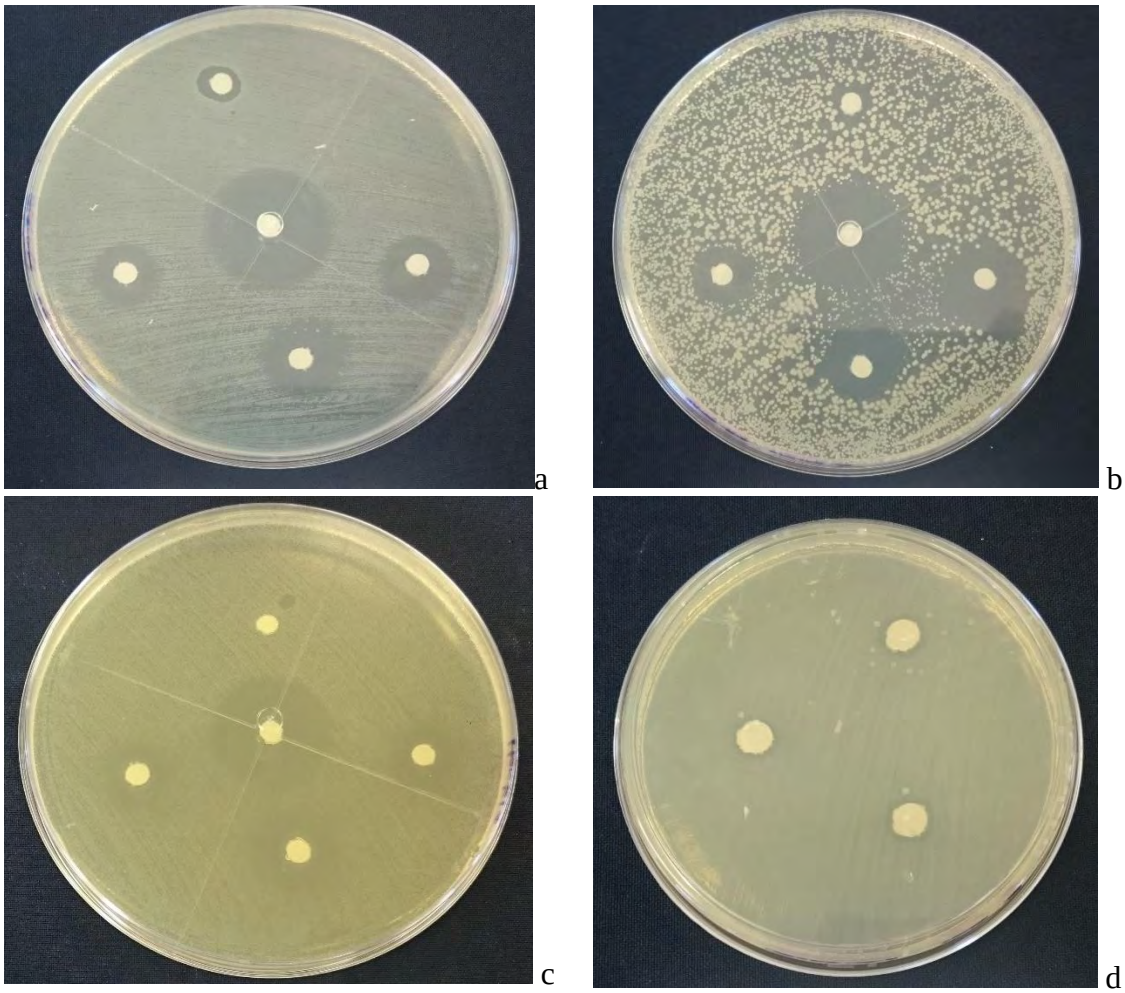
Fonte: Própria autoria.

Figura 20 - Atividade antimicrobiana do óleo essencial de manjericão (a) *S. enteritidis*, (b) *S. aureus*, (c) *L. monocytogenes*, (d) *E. coli*.



Fonte: Própria autoria.

Figura 21 - Atividade antimicrobiana do óleo essencial de hortelã (a) *S. enteritidis*, (b) *S. aureus*, (c) *L. monocytogenes*, (d) *E. coli*.



Fonte: Própria autoria.

A concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) foi determinada com óleos essenciais de cravo, de manjericão e de hortelã, para as bactérias Gram (+) *S. aureus*, 5 cepas de *L. monocytogenes* e *L. innocua*, e as bactérias Gram (-) *E. coli* e *S. enteritidis*, visando-se a adição dos óleos essenciais em filmes biodegradáveis e possível aplicação em produtos cárneos. Esses resultados estão apresentados na tabela 17.

Para todas as bactérias testadas, o óleo essencial de cravo apresentou os menores valores da CIM (0,09 – 0,10% w/w) e CBM (0,10 – 0,20% w/w). No entanto, o óleo essencial de manjericão

apresentou valores intermediarios de CIM e CBM para as cepas de *L. monocytogenes* (0,40 – 1,40% CIM, 0,50-1,50% CBM) e *L. innocua* (1,40 % CIM, 1,50% CBM), com maior efeito sobre *L. monocytogenes* 508. O óleo essencial de hortelã teve uma menor atividade de inibição que os outros óleos para todas as bactérias testadas, o qual é relacionado aos halos de inibição menores reportados no teste de sensibilidade (Figura 21) e o conteúdo de fenóis totais (Tabela 12).

Tabela 17 - Concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) dos óleos essenciais

Bactéria	OE Cravo		OE Manjericão		OE Hortelã	
	CIM (%w/w)	CBM (%w/w)	CIM (%w/w)	CBM (%w/w)	CIM (%w/w)	CBM (%w/w)
S. aureus ATCC 29213	0,10	0,20	0,40	0,50	0,20	0,30
L. monocytogenes SCOTT A	0,10	0,20	0,80	0,90	1,40	1,50
L. monocytogenes ATCC 7644	0,10	0,20	0,60	0,70	0,60	0,70
L. monocytogenes 595	0,10	0,20	0,70	0,80	1,30	1,40
L. monocytogenes 508	0,10	0,20	0,60	0,70	1,30	1,40
L. monocytogenes 500	0,10	0,20	0,75	0,80	0,40	0,50
L. innocua 225/07	0,10	0,20	0,50	0,60	1,40	1,50
S. enteritidis ATCC 13076	0,10	0,20	0,20	0,30	0,20	0,30
E. coli ATCC 25922	0,09	0,10	0,20	0,30	0,30	0,40

Fonte: Própria autoria.

Vários autores têm avaliado a atividade do óleo essencial de manjericão (DUARTE et al., 2005; GOÑI et al., 2009; HUSSAIN et al., 2008; SILVEIRA et al., 2012; TEIXEIRA et al., 2013), cravo (GUTIERREZ; BARRY-RYAN; BOURKE, 2008; OUSSALAH et al., 2007; PRABUSEENIVASAN; JAYAKUMAR; IGNACIMUTHU, 2006; TEIXEIRA et al., 2013) e hortelã (CHANDRA; FAROOQ, 2014; DUARTE et al., 2005; MICKIENĖ; RAGAŽINSKIENĖ; BAKUTIS, 2011). Contudo, a comparação dos resultados desta tese com os reportados na literatura é dificultada pelas diferentes espécies botânicas, local e época de colheita, método de extração dos óleos essenciais e metodologia para a determinação da atividade antimicrobiana.

Considerando os resultados obtidos na atividade antimicrobiana e capacidade antioxidante dos três óleos essências, o óleo essencial de hortelã apresentou menor eficiência, por isso foi excluído do estudo com filme ativo.

5.3 Produção dos filmes

Foram caracterizados 8 filmes ativos (F1, F2, F3, F4, F5, F6, F7 e F8) à base de gelatina com adição de 0,8% w/w de EEP, óleo essencial de cravo (0,0 – 0,3% w/w) e óleo essencial de manjericão (0,0 – 0,8% w/w) e 4 filmes controles, filme de gelatina (C1), filme de gelatina com adição de 0,8% w/w de EEP (C2), filme de gelatina com adição de 0,3% w/w de óleo essencial de cravo (C3) e filme de gelatina com 0,8% w/w de óleo essencial de manjericão (C4).

5.3.1 Conteúdo de fenóis totais e capacidade antioxidante:

O conteúdo de fenóis totais nos filmes ativos e controles apresentou diferenças significativas ($p<0,05$) (Tabela 18), sendo diretamente influenciado pela adição do óleo essencial de cravo, seguido do óleo essencial de manjericão e em menor grau o extrato etanólico de própolis vermelha como pode ser observado nos filmes controle. Os tratamentos com maior conteúdo de OE de cravo (F2 e F3) apresentaram o maior valor de fenóis totais, e, os tratamentos com maior conteúdo de OE de manjericão apresentaram o menor teor. A adição de EEP e óleo essencial de cravo e de manjericão produz filmes com atividade antioxidante.

Tabela 18 - Conteúdo de fenóis totais dos Filmes ativos

Tratamento	Conteúdo Fenóis totais mg de Ácido Gálico/g de filme
F1	44,8 ± 0,7 [c]
F2	58,0 ± 1,4 [a]
F3	55,5 ± 1,2 [b]
F4	40,8 ± 0,1 [e]
F5	29,8 ± 0,3 [h]
F6	37,1 ± 0,5 [f]
F7	42,7 ± 1,3 [d]
F8	37,2 ± 0,9 [f]
C1	4,7 ± 0,9 [j]
C2	27,3 ± 0,9 [i]
C3	40,8 ± 0,4 [e]
C4	32,2 ± 0,1 [g]

Fonte: Própria autoria.
F1: gelatina + 0,8% EEP + 0,15% OE cravo + 0,40% OE manjericão; F2: gelatina + 0,8% EEP + 0,30% OE cravo; F3: gelatina + 0,8% EEP + 0,30% OE cravo; F4: gelatina + 0,8% EEP + 0,225% OE cravo + 0,20% OE manjericão. F5: gelatina + 0,8% EEP + 0,075% OE cravo + 0,60% OE manjericão; F6: gelatina + 0,8% EEP + 0,80% OE manjericão, F7: gelatina + 0,8% EEP + 0,15% OE cravo + 0,40% OE manjericão, F8: gelatina + 0,8% EEP + 0,80% OE manjericão; C1: gelatina; C2: gelatina + 0,8% EEP; C3: gelatina + 0,30% OE cravo; C4: gelatina + 0,80% OE manjericão
a,b letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa para cada formulação de filme ativo

Filmes de quitosana adicionados com extrato hidro alcoólico de própolis de Tailândia em diferentes concentrações exibiram um incremento do teor de fenóis totais com o aumento da concentração do extrato ($p<0,05$), sendo que nos filmes contendo o extrato de própolis o teor de fenóis incrementou em relação ao filme controle (SIRIPATRAWAN; VITCHAYAKITTI, 2016). Por sua parte, Souza et al. (2015) produziram filmes de amido de mandioca adicionados com extrato etanólico de própolis brasileira em concentrações de 0, 0,5, 0,75 e 1% em relação à solução filmogênica total, observando-se que o aumento da concentração do EP elevou a teor de fenóis no filme. Mesmo para as maiores concentrações os resultados foram menores (701 mgEAG/100 g de filme) que os obtidos nesta tese para o controle C2.

A porcentagem de inibição dos radicais $ABTS^{\bullet+}$ e $DPPH^{\bullet}$ dos filmes ativos e controles está apresentada na tabela 19. A adição de óleo essencial de cravo melhorou a capacidade antioxidante dos filmes ativos, sendo que o controle com adição de óleo essencial de cravo (C3) apresentou o

maior valor de inibição para os dois radicais avaliados. Não foi observado um potencial sinérgico entre a própolis vermelha e os óleos essenciais de cravo e de manjericão. Só a adição de óleo essencial de cravo promove importante atividade antioxidante como foi observado nos resultados do controle C3.

Tabela 19 - Resultados da capacidade antioxidante dos Filmes ativos, quantificada pelo grau de descoloração do radical $DPPH^{\bullet}$ e do radical $ABTS^{\bullet+}$.

Tratamento	%Inibição	
	$DPPH^{\bullet}$	**$ABTS^{\bullet+}$**
F1	16,1 ± 0,5 ^{e}	31,7 ± 1,1 ^{bc}
F2	13,8 ± 0,6 ^{g}	27,5 ± 0,8 ^{g}
F3	13,0 ± 0,5 ^{h}	32,5 ± 0,8 ^{b}
F4	14,9 ± 0,3 ^{f}	30,1 ± 0,3 ^{de}
F5	15,8 ± 0,4 ^{e}	20,7 ± 0,5 ^{h}
F6	18,6 ± 0,4 ^{d}	29,9 ± 0,6 ^{de}
F7	19,9 ± 0,6 ^{c}	30,3 ± 0,8 ^{de}
F8	20,2 ± 0,6 ^{c}	29,2 ± 0,6 ^{e}
C1	5,5 ± 0,1 ^{i}	4,6 ± 0,7 ^{i}
C2	23,9 ± 0,8 ^{b}	30,7 ± 0,6 ^{cd}
C3	31,9 ± 0,2 ^{a}	41,8 ± 0,3 ^{a}
C4	23,5 ± 0,1 ^{b}	28,3 ± 0,7 ^{f}

Fonte: Própria autoria.
F1: gelatina + 0,8% EEP + 0,15% OE cravo + 0,40% OE manjericão; F2: gelatina + 0,8% EEP + 0,30% OE cravo; F3: gelatina + 0,8% EEP + 0,30% OE cravo; F4: gelatina + 0,8% EEP + 0,225% OE cravo + 0,20% OE manjericão. F5: gelatina + 0,8% EEP + 0,075% OE cravo + 0,60% OE manjericão; F6: gelatina + 0,8% EEP + 0,80% OE manjericão, F7: gelatina + 0,8% EEP + 0,15% OE cravo + 0,40% OE manjericão, F8: gelatina + 0,8% EEP + 0,80% OE manjericão; C1: gelatina; C2: gelatina + 0,8% EEP; C3: gelatina + 0,30% OE cravo; C4: gelatina + 0,80% OE manjericão
a,b letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa para cada formulação de filme ativo

O tratamento com maior conteúdo de OE de cravo (F3) não apresentou diferenças estatísticas ($p>0,05$) com o tratamento com 50% de cada OE (F1) e o controle com extrato etanólico de própolis vermelha (C2) na inibição do radical $ABTS^{\bullet+}$. Mesmo apresentando diferenças estatísticas entre os tratamentos e os controles, a variação da porcentagem de inibição só foi significativa para o C3. Este resultado pode ser explicado pelo teor de fenóis totais do OE de cravo e o EPP reportados nesta tese.

A maior capacidade antioxidante apresentada pelos filmes ativos e os controles frente ao radical $ABTS^{\bullet+}$ pode ser explicada já que este é um ensaio de descoloração aplicável a antioxidantes lipofílicos e hidrofílicos, incluindo flavonóides, hidroxicinamatos, carotenóides e antioxidantes de plasma (BITENCOURT et al., 2014; RE et al., 1999)

Da mesma forma, a inibição do radical $DPPH^{\bullet}$ apresentou diferenças estatísticas ($p<0,05$) para os tratamentos e controles, sendo maior para o controle C3, seguido dos controles C2 e C4 sem diferenças estatísticas ($p>0,05$) entre eles. Para os tratamentos, os maiores valores de inibição foram obtidos para o filme com maior conteúdo de OE de manjericão (F8) e a mistura F7.

Para os dois radicais, $ABTS^{\bullet+}$ e $DPPH^{\bullet}$, a inibição foi menor para os tratamentos com misturas do extrato etanólico de própolis vermelha e óleos essenciais em relação aos filmes controle. Tal diminuição pode ser devida a interações entre os componentes dos filmes e óleos essenciais e EEP que já não podem estar disponíveis para interagir nas reações da atividade antioxidante; além das perdas de compostos voláteis dos óleos essenciais e o EPP durante o processo de secagem de filmes (TEIXEIRA et al., 2014).

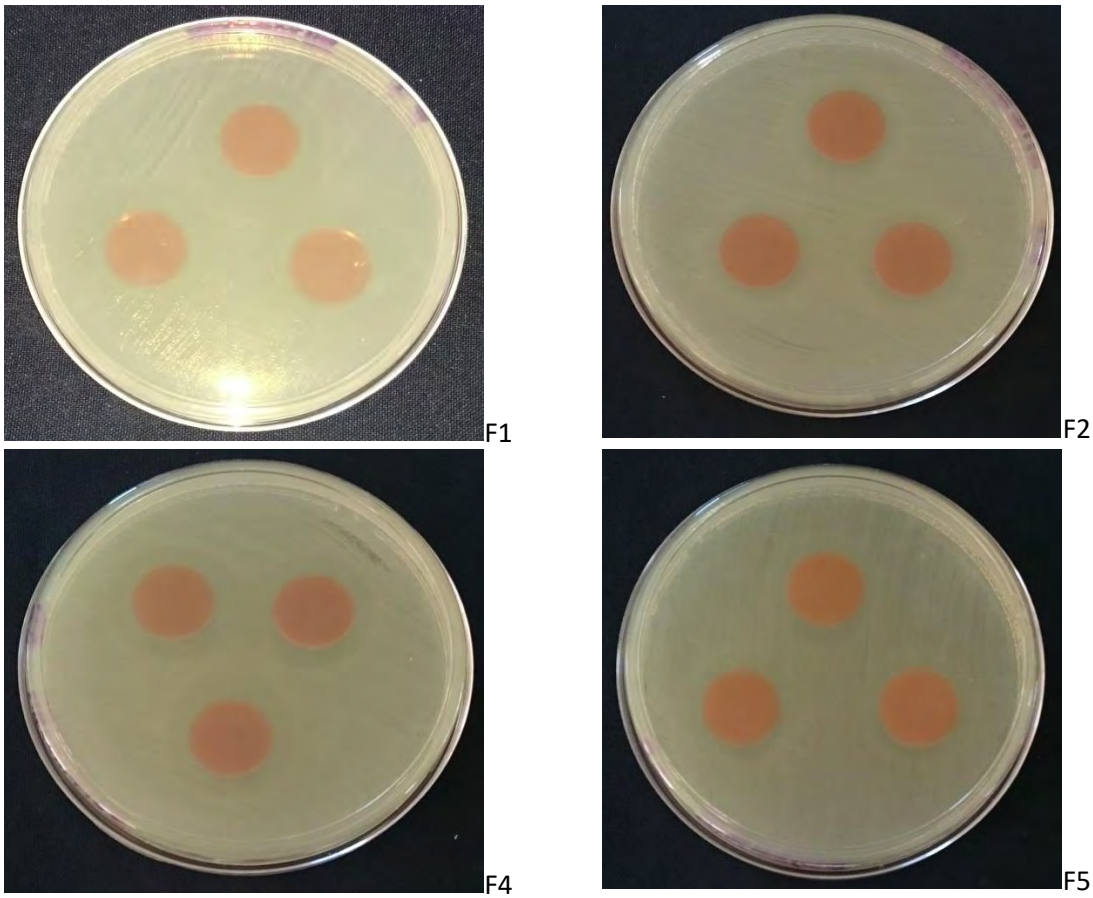
5.3.2 Atividade antimicrobiana:

A atividade antimicrobiana dos filmes ativos e controles foi testada frente ás bactérias Gram (+) *S. aureus* e *L. monocytogenes*, e as bactérias Gram (-) *E. coli* e *S. enteritidis*, sendo que, as concentrações dos óleos essenciais e extrato etanólico de própolis vermelha usadas nos filmes ativos e controles foram efetivas somente para *S. aureus* e *S. enteritidis* (Tabela 20). Exemplos das análises do teste de sensibilidade (Halos de inibição) dos filmes ativos frente a *S. enteritidis* e *S. aureus* foram apresentados na Figura 22 e Figura 23, respectivamente.

A sensibilidade de *S. aureus* foi determinada pela adição do extrato etanólico de própolis vermelha, pois comparando os resultados dos controles com os tratamentos, só o controle com EEP (C2) teve atividade contra o microrganismo; estes resultados podem ser explicados pela maior sensibilidade e menor CIM e CBM apresentada pelo EEP frente aos óleos essenciais. Embora os resultados apresentaram diferenças estatísticas ($p<0,05$), a variação da zona de inibição esteve entre 2,0 e 5,3 mm.

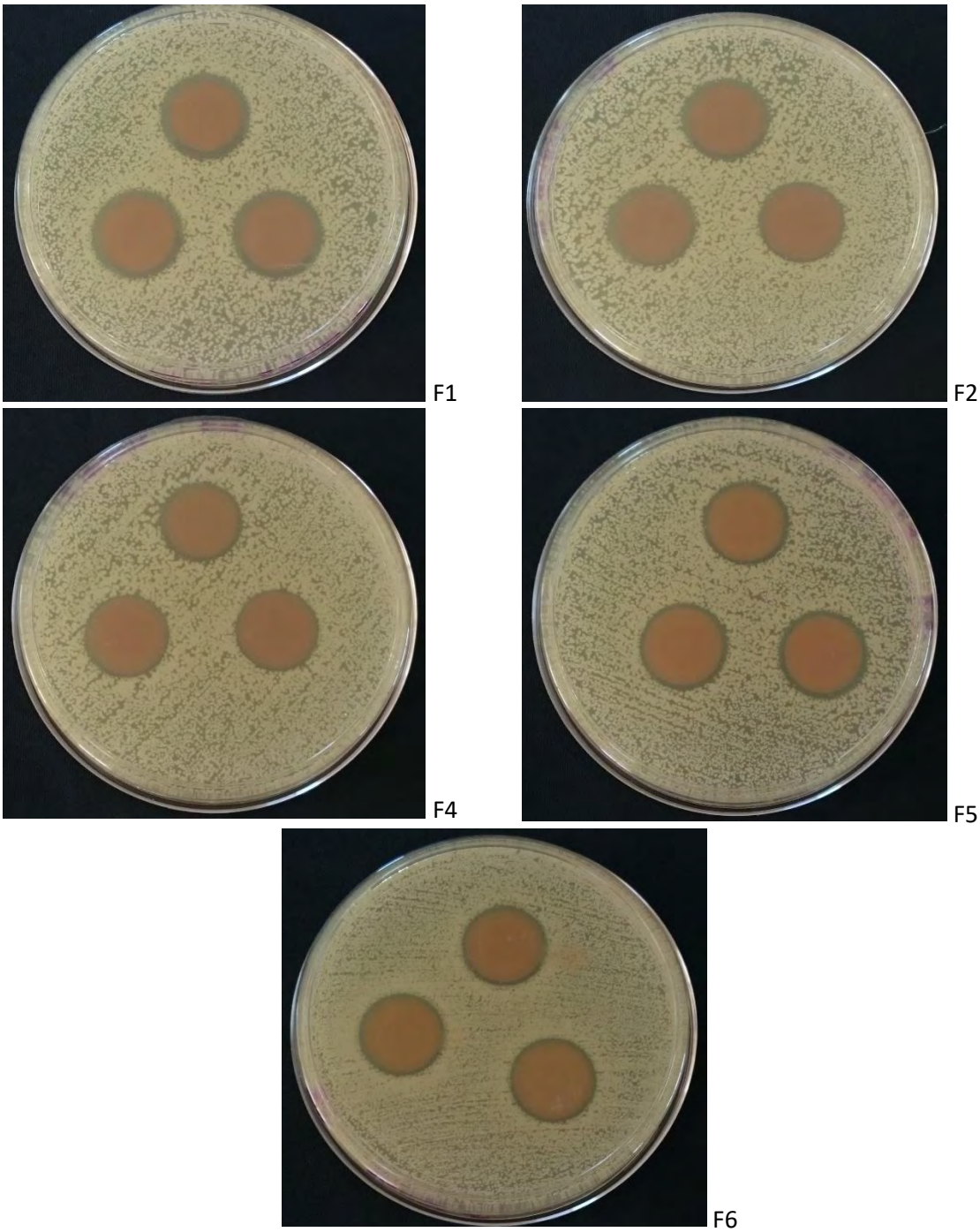
A atividade antimicrobiana frente a bactéria *S. enteritidis* foi determinada pela adição dos óleos essenciais de cravo e manjericão, sendo a menor a atividade apresentada pelo último. Os tratamentos apresentaram diferenças estatísticas ($p<0,05$), sendo que F2 e F3 (100% OE cravo) apresentaram o maior poder inibitório, seguido de F4 (75% OE cravo + 25% OE manjericão). A menor atividade foi reportada pelos tratamentos com maior conteúdo de OE de manjericão (F6 e F8). Estes resultados concordam com a maior atividade apresentada pelo óleo essencial de cravo frente a *S. enteritidis* (Teste sensibilidade, CIM e CBM).

Figura 22 - Exemplos das análises do teste de sensibilidade dos filmes ativos frente a bactéria Gram (-) *S. enteritidis*.



Fonte: Própria autoria.

Figura 23 - Exemplos das análises do teste de sensibilidade dos filmes ativos frente a bactéria Gram (+) *S. aureus*.



Fonte: Própria autoria.

Tabela 20 - Atividade antimicrobiana dos Filmes ativos contra *S. aureus e S. enteritidis*.

Tratamento	Zona de inibição (mm)	
	S. aureus	***S. enteritidis***
F1	5,3 ± 0,6 [a]	8,3 ± 1,5 [cde]
F2	3,7 ± 0,6 [b]	10,0 ± 1,0 [b]
F3	2,0 ± 0,1 [d]	11,7 ± 0,6 [a]
F4	2,7 ± 0,6 [cd]	9,3 ± 1,1 [bc]
F5	5,0 ± 0,1 [a]	7,3 ± 0,6 [e]
F6	3,3 ± 0,6 [bc]	7,3 ± 0,6 [e]
F7	3,3 ± 0,6 [bc]	8,7 ± 0,6 [cd]
F8	3,7 ± 0,6 [b]	5,3 ± 0,6 [f]
C1	-	-
C2	5,3 ± 0,6 [a]	-
C3	-	7,7 ± 0,6 [de]
C4	-	3,3 ± 0,6 [g]

Fonte: Própria autoria.
F1: gelatina + 0,8% EEP + 0,15% OE cravo + 0,40% OE manjericão; F2: gelatina + 0,8% EEP + 0,30% OE cravo; F3: gelatina + 0,8% EEP + 0,30% OE cravo; F4: gelatina + 0,8% EEP + 0,225% OE cravo + 0,20% OE manjericão. F5: gelatina + 0,8% EEP + 0,075% OE cravo + 0,60% OE manjericão; F6: gelatina + 0,8% EEP + 0,80% OE manjericão, F7: gelatina + 0,8% EEP + 0,15% OE cravo + 0,40% OE manjericão, F8: gelatina + 0,8% EEP + 0,80% OE manjericão; C1: gelatina; C2: gelatina + 0,8% EEP; C3: gelatina + 0,30% OE cravo; C4: gelatina + 0,80% OE manjericão
-: não apresentou halo de inibição frente à bactéria testada
a,b letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa para cada formulação de filme ativo

A atividade antimicrobiana de filmes biodegradáveis adicionados com compostos ativos frente a diversas bactérias tem sido reportada na literatura. Siripatrawan e Vitchayakitti (2016) avaliaram a eficácia antimicrobiana de filmes de quitosana com extrato etanólico de própolis frente a bactéria Gram (+) *S. aureus* e bactérias Gram (-) *E. coli*, *Pseudomona aeruginosa* e *Salmonella enteritidis*, onde os filmes aditivados com extrato etanólico de própolis apresentaram atividade antimicrobiana, sendo maior para *S. aureus* que para as outras bactérias testadas. Isso foi atribuído aos flavonoides presentes na própolis, como, rutina, quercetina e naringenina. Por sua parte, Alexandre et al. (2016) avaliaram a atividade antimicrobiana de filmes de gelatina com montmorillonita adicionados com óleo essencial de gengibre frente a *S. aureus*, *E. coli*, *Pseudomona aeruginosa* e *S. enteritidis*, encontrando sensibilidade só para *P. aeruginosa* e *S. aureus*, sendo a atividade antimicrobiana maior para a primeira.

Portanto, a atividade antimicrobiana de filmes contendo compostos ativos como a própolis e os óleos essenciais pode ser explicada por diferentes ações, incluindo alteração da permeabilidade na membrana, inibição do DNA em sínteses de RNA, modificações químicas na membrana celular, citoplasma, enzimas e proteínas, e deformação da célula microbiana, e consequentemente a morte celular (MIRZOEVA; GRISHANIN; CALDER, 1997; NAZZARO et al., 2013; SIRIPATRAWAN; VITCHAYAKITTI, 2016).

5.3.3 Umidade e Solubilidade:

A insolubilidade ou resistência à água é uma característica substancial dos filmes biodegradáveis para uso na proteção de alimentos, onde a atividade de água é alta ou quando o filme deve estar em contato com água durante o processamento do alimento revestido, para evitar a exsudação de produtos frescos ou congelados (GONTARD; GUILBERT; CUQ, 1992; HOSSEINI et al., 2015).

A umidade e solubilidade dos filmes ativos e controles (Tabela 21) apresentaram diferenças estatísticas ($p<0,05$), sendo que, os controles com óleos essenciais (C3 e C4) presentaram valores de umidade inferiores ao filme controle (C1). Entre os tratamentos, as formulações com maior conteúdo de OE de cravo (F2 e F3) reportaram os valores de umidade mais alta (19,6 – 18,8%). Os menores valores foram apresentados por os tratamentos F1 e F7 (0,15% OE cravo + 0,4% OE manjericão). Em relação a solubilidade dos filmes, a adição dos óleos essenciais e de própolis causa uma leve diminuição na solubilidade dos tratamentos ($p<0,05$), sendo estes inferiores ao filme controle (C1) e maiores ao tratamento com OE de manjericão (C4). Em termos tecnológicos, tanto a umidade quanto a solubilidade dos filmes não foram alteradas fortemente pelos diversos tratamentos, ou seja, essas propriedades permanecem praticamente as mesmas.

Trabalhos feitos por Bodini et al. (2013) com filmes de gelatina, demostraram que a adição de própolis na matriz polimérica não modificou a umidade e a solubilidade dos filmes, sugerindo que o EEP não interferiu com o arranjo nas cadeias de proteínas e não alterou a característica hidrofílica das películas.

Tabela 21 - Valores médios de umidade e solubilidade dos Filmes ativos

Tratamento	Umidade (%)	Solubilidade (%)
F1	14,7 ± 1,1 [f]	37,7 ± 0,7 [ab]
F2	19,6 ± 0,5 [a]	35,6 ± 0,8 [cd]
F3	18,8 ± 0,7 [b]	35,4 ± 1,4 [de]
F4	18,6 ± 0,1 [b]	36,8 ± 0,2 [bcd]
F5	16,9 ± 0,2 [c]	36,8 ± 1,2 [bcd]
F6	15,5 ± 0,4 [de]	35,7 ± 0,2 [cd]
F7	15,3 ± 0,4 [ef]	37,2 ± 1,2 [abc]
F8	16,2 ± 0,3 [cd]	36,2 ± 1,1 [bcd]
C1	16,2 ± 0,6 [cd]	38,7 ± 1,2 [a]
C2	15,8 ± 0,5 [de]	36,2 ± 0,6 [bcd]
C3	13,6 ± 0,5 [g]	36,4 ± 1,2 [bcd]
C4	12,3 ± 0,5 [h]	33,9 ± 0,8 [e]

Fonte: Própria autoria.
F1: gelatina + 0,8% EEP + 0,15% OE cravo + 0,40% OE manjericão; F2: gelatina + 0,8% EEP + 0,30% OE cravo; F3: gelatina + 0,8% EEP + 0,30% OE cravo; F4: gelatina + 0,8% EEP + 0,225% OE cravo + 0,20% OE manjericão. F5: gelatina + 0,8% EEP + 0,075% OE cravo + 0,60% OE manjericão; F6: gelatina + 0,8% EEP + 0,80% OE manjericão, F7: gelatina + 0,8% EEP + 0,15% OE cravo + 0,40% OE manjericão, F8: gelatina + 0,8% EEP + 0,80% OE manjericão; C1: gelatina; C2: gelatina + 0,8% EEP; C3: gelatina + 0,30% OE cravo; C4: gelatina + 0,80% OE manjericão
a,b letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa para cada formulação de filme ativo

Outros estudos de filmes com gelatina adicionados com óleos essenciais em baixas concentrações demostraram leve diminuição de 1% e 2% na umidade e solubilidade, respectivamente (ALEXANDRE et al., 2016). Ahmad et al. (2012) encontraram que a adição de óleo essencial de bergamota e erva-cidreira em filmes de gelatina de pele de peixe diminuiu a solubilidade dos filmes; este comportamento pode estar associado à natureza hidrofóbica de óleo. Os componentes não polares do óleo interagiram favoravelmente com o domínio hidrofóbico da gelatina, conduzindo ao aumento da hidrofobicidade do filme resultante. Como resultado, a solubilidade da película tornou-se reduzida. Adicionalmente, o maior grau de substituição do glicerol pelo óleo essencial pode aumentar a hidrofobicidade do filme, reduzindo assim as substâncias solúveis dos filmes.

Filmes de gelatina e quitosana adicionados com óleo essencial de orégano em diferentes concentrações apresentaram um aumento significativo na solubilidade dos filmes com respeito ao controle; este comportamento pode ser atribuído às interações re-emergentes entre proteína-

polissacárido com o óleo essencial que enfraquecem as interações que estabilizaram a estrutura de rede. A presença de óleo essencial também pode limitar a interação do glicerol com a matriz proteica, o que permitiria um aumento no seu fenômeno de lixiviação (GÓMEZ-ESTACA et al., 2010; HOSSEINI et al., 2015).

5.3.4 Propriedades mecânicas:

A produção dos filmes ativos e os filmes controles pelo método *spreading* foi feita considerando uma massa constante (125 g) para desta forma, avaliar o efeito da adição do extrato etanólico de própolis vermelha e os óleos essências em diferentes proporções. Os valores médios da espessura e os parâmetros tensão, elongação e módulo de elongação (ME) obtidos no teste de tração estão apresentados na tabela 22. A espessura dos tratamentos está diretamente influenciada pela adição do óleo essencial de manjericão (C4), pois, não foram apresentadas diferenças estatísticas ($p>0,05$) entre o controle de gelatina (C1), controle gelatina + 0,8% EEP (C2) e controle gelatina + 0,3% OE cravo (C3). A espessuras dos tratamentos variou entre 0,082 – 0,088 mm ($p<0,05$), sendo maior para F4 (0,225% OE cravo + 0,2% OE manjericão), seguido das F6 e F8 (0,8% OE manjericão).

Comportamentos semelhantes da espessura de filmes de gelatina adicionados com vários óleos essências foram encontrados por Tongnuanchan et al. (2016), que observou que, o aumento da espessura do filme foi associado com o maior conteúdo de sólidos pela adição de óleo essencial. Além de isso, foi sugerido que o alinhamento da molécula de gelatina na matriz do filme foi formado com menor grau de compactação, quando todos os tipos de óleos foram incorporados, e, as gotas de óleo foram dispersas e localizadas na rede de filmes proteicos, diminuindo assim a interação entre moléculas da proteína. Além disso, a estrutura volumosa da lecitina de soja pode impedir o alinhamento ordenado da cadeia de gelatina, obtendo uma maior saliência na rede dos filmes. Portanto, diferentes tipos de óleos e surfactantes afetam diretamente o alinhamento entre as cadeias peptídicas na rede dos filmes e, portanto, a espessura dos mesmos.

Tabela 22 – Propriedades mecânicas determinadas por teste tração dos Filmes ativos

Tratamento	Espessura (mm)	Tensão (MPa)	Elongação (%)	Módulo de elasticidade (MPa)
F1	0,083 ± 0,001^{de}	25,5 ± 0,4^{f}	47,2 ± 1,8^{g}	4,4 ± 0,1^{e}
F2	0,082 ± 0,002^{e}	28,2 ± 1,0^{e}	50,5 ± 1,7^{f}	5,0 ± 0,1^{d}
F3	0,083 ± 0,003^{cde}	28,4 ± 0,7^{e}	50,6 ± 2,0^{f}	4,9 ± 0,2^{d}
F4	0,088 ± 0,002^{a}	30,0 ± 0,9^{d}	37,5 ± 1,5^{h}	4,6 ± 0,2^{de}
F5	0,084 ± 0,002^{cd}	37,8 ± 0,9^{c}	57,4 ± 1,9^{d}	6,0 ± 0,2^{c}
F6	0,086 ± 0,002^{b}	29,7 ± 0,9^{d}	58,2 ± 1,3^{cd}	4,2 ± 0,2^{e}
F7	0,084 ± 0,002^{cde}	25,2 ± 1,0^{f}	48,2 ± 2,0^{g}	4,4 ± 0,2^{e}
F8	0,085 ± 0,001^{bc}	29,5 ± 0,8^{d}	59,6 ± 1,5^{c}	4,6 ± 1,0^{de}
C1	0,072 ± 0,002^{f}	41,0 ± 1,1^{b}	50,1 ± 0,8^{f}	7,6 ± 0,2^{a}
C2	0,073 ± 0,001^{f}	42,7 ± 1,4^{a}	55,5 ± 1,5^{e}	7,1 ± 1,2^{b}
C3	0,072 ± 0,002^{f}	21,1 ± 0,9^{g}	61,9 ± 1,1^{b}	3,7 ± 0,1^{f}
C4	0,082 ± 0,002^{e}	19,3 ± 0,9^{h}	75,5 ± 2,5^{a}	3,4 ± 0,1^{f}

Fonte: Própria autoria.
F1: gelatina + 0,8% EEP + 0,15% OE cravo + 0,40% OE manjericão; F2: gelatina + 0,8% EEP + 0,30% OE cravo; F3: gelatina + 0,8% EEP + 0,30% OE cravo; F4: gelatina + 0,8% EEP + 0,225% OE cravo + 0,20% OE manjericão. F5: gelatina + 0,8% EEP + 0,075% OE cravo + 0,60% OE manjericão; F6: gelatina + 0,8% EEP + 0,80% OE manjericão, F7: gelatina + 0,8% EEP + 0,15% OE cravo + 0,40% OE manjericão, F8: gelatina + 0,8% EEP + 0,80% OE manjericão; C1: gelatina; C2: gelatina + 0,8% EEP; C3: gelatina + 0,30% OE cravo; C4: gelatina + 0,80% OE manjericão
a,b letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa para cada formulação de filme ativo

Em relação às propriedades mecânicas (Tabela 22), a tensão pode ser definida como a medida da resistência máxima de um filme para suportar uma tensão aplicada, e a elongação na ruptura representa a capacidade de um filme para esticar-se, e o módulo de elasticidade indica a rigidez do filme (PARK; ZHAO, 2004; SIRIPATRAWAN; VITCHAYAKITTI, 2016). Os parâmetros tensão à ruptura e módulo de elasticidade mostraram uma diminuição significativa ($p<0,05$) em relação ao filme controle de gelatina (C1) e o filme controle com adição do óleo essencial de própolis vermelha (C2), sendo que a adição dos óleos essenciais (C3 e C4) diminuiu significativamente o valor destas propriedades. Os valores de tensão apresentaram diferenças estatísticas ($p<0,05$) com variações entre 25 e 37 MPa, sendo que, a F5 (0,075% OE cravo e 0,6% OE manjericão) apresentou o maior valor de tensão a ruptura e as F1 e F7 (0,15% OE cravo e 0,4% OE manjericão) a menor tensão. Para o módulo de elasticidade, os controles C1 e C2 presentaram os maiores valores, considerando eles mais rígidos que os filmes com adição de óleo essencial, porém, a maior flexibilidade foi encontrada por os controles C3 e C4, o que indica que, a adição

de extrato etanólico de própolis vermelha aumenta o modulo de elongação e, porém, reduz a rigidez do filme.

Siripatrawan e Vitchayakitti (2016), com filmes de quitosana com extrato etanólico de própolis, encontraram um aumento nos valores de tensão a ruptura com o incremento na concentração de extrato, o qual pode ser atribuída às interações entre os componentes de própolis (por exemplo, ácidos fenólicos e seus ésteres) que possuem características polares com os grupos hidrofílicos das moléculas de quitosana. Estas interações podem resultar numa maior aderência interfacial entre as moléculas de quitosana e o estrato de própolis na matriz de filme, reforçando as interações cadeia-cadeia do polímero conduzindo a uma resistência mais eficaz ao stress mecânico.

Por outra parte, estudos feitos por Tongnuanchan et al. (2016) em filmes de gelatina de pele de peixe adicionados com óleos essenciais de palma e manjericão demostraram resultados semelhantes aos obtidos nesta tese para os filmes controle C1, C4 e tratamentos. Esses autores encontraram um aumento na espessura dos filmes com o a adição dos óleos, mas o efeito contrário foi observado na tensão a ruptura, variando entre 14,11 – 32,91 MPa e o modulo de elasticidade variando entre 269,58 – 933,80 MPa. As diminuições tanto na tensão como no módulo de elasticidade refletiram a reduzida interação entre as moléculas de gelatina com os óleos essenciais, dando como resultado, uma rede mais solta no filme (TONGNUANCHAN et al., 2016).

Por outra parte, os valores de elongação na ruptura mostraram efeito significativo ($p<0,05$), sendo influenciado pela adição do óleo essencial de cravo e manjericão (C3 e C4) e em menor medida pelo extrato etanólico de própolis vermelha (C2). Entre os tratamentos, a maior elongação na ruptura foi reportada ao filme com maior conteúdo de óleo essencial de manjericão (F6 e F8). Estes resultados sugeriram que a adição de óleo essencial de manjericão e óleo de cravo ou misturas exibem um efeito plastificante no filme.

Estas diferenças podem ser induzidas pela adição de EEP e podem atribuir-se à formação cristalina de componentes da própolis na matriz polimérica que conduz a uma redução na flexibilidade do filme (PASTOR et al., 2010) como também as interações entre a alta concentração de componentes da própolis e a gelatina o qual produz um efeito de reticulação, o que diminui o volume livre e a mobilidade molecular do polímero, causando uma diminuição nos valores de elongação na ruptura (BODINI et al., 2013; SIRIPATRAWAN; VITCHAYAKITTI, 2016). Porém, o aumento dos valores de elongação de filmes à base de gelatina contendo vários óleos foi

provavelmente causado pela menor interação entre cadeias de proteínas na matriz do filme. A ligação do hidrogênio e a interação hidrofóbica foram relatadas como as principais forças associativas na rede de filmes de gelatina (HOQUE; BENJAKUL; PRODPRAN, 2011; PARK et al., 2014; TONGNUANCHAN et al., 2016).

Resultados similares foram reportados por Tongnuancha et al. (2016), encontrando aumento da elongação pela adição de óleo essencial de manjericão e óleo essencial de palma em filmes à base de gelatina de pele de peixe, o qual foi explicado pela a adição de óleos incorporados na matriz de filme que podem aumentar o volume livre entre moléculas de proteína e proporcionar a maior mobilidade, aumentando assim a maior extensibilidade dos filmes resultantes. No entanto, diferentes composições químicas dos óleos essenciais podem afetar as ligações ou interações com moléculas de proteína na matriz de filme, variando as propriedades mecânicas dos filmes.

Em relação ao teste de perfuração, foi determinada a força de perfuração (N) e a deformação na perfuração (%) (Tabela 23). Os tratamentos e controles apresentaram diferenças estatísticas ($p<0,05$) para os dois parâmetros avaliados. Não foi observada uma relação direta entre a adição do extrato etanólico de própolis vermelha e os óleos essenciais, sendo que, a maior força e deformação a perfuração foi apresentada pelos tratamentos com 0,8% OE de manjericão (F2 e F3) e o tratamento com 0,225% de OE de cravo e 0,2% de OE manjericão (F4). Os menores valores de deformação foram apresentados pelos controles, sendo o menor valor apresentado pelo controle de gelatina (C1), seguido dos controles C2, C3 e C4 sem presentar diferenças estatísticas ($P>0,05$).

Resultados semelhantes aos obtidos nesta tese foram reportados por Alexandre et al. (2016), que avaliaram o efeito de nanopartículas de montmorrillonita e óleo essencial de gengibre adicionados a filmes à base de gelatina sobre as propriedades mecânicas, reportado aumento dos parâmetros força e deformação a perfuração com a adição de nanopartículas e óleo essencial. Da mesma forma, trabalhos realizados em filmes de proteína isolada de soja com óleo essencial de linho demostraram pequenas variações nos parâmetros força e deformação a perfuração para diferentes concentrações de óleo essencial, considerando que tanto a espessura do filme como o tamanho de gota das nanoemulsões do óleo afetam as propriedades mecânicas dos filmes analisados (HOPKINS et al., 2015).

Tabela 23 - Valores médios do teste perfuração associados aos Filmes ativos

Tratamento	Força (N)	Deformação (%)
F1	13,6 ± 0,5 [f]	5,2 ± 0,1 [cde]
F2	19,3 ± 0,6 [a]	5,6 ± 0,12 [b]
F3	19,3 ± 0,7 [a]	5,6 ± 0,2 [b]
F4	18,4 ± 0,2 [b]	5,9 ± 0,1 [a]
F5	13,7 ± 0,2 [f]	5,1 ± 0,1 [de]
F6	11,0 ± 0,3 [g]	5,1 ± 0,1 [e]
F7	13,6 ± 1,1 [f]	5,4 ± 0,4 [bcd]
F8	11,3 ± 0,2 [g]	5,4 ± 0,4 [bc]
C1	16,2 ± 0,5 [d]	3,8 ± 0,2 [g]
C2	17,2 ± 0,4 [c]	4,1 ± 0,1 [f]
C3	14,4 ± 0,4 [e]	4,3 ± 0,1 [f]
C4	16,1 ± 0,7 [d]	4,3 ± 0,12 [f]

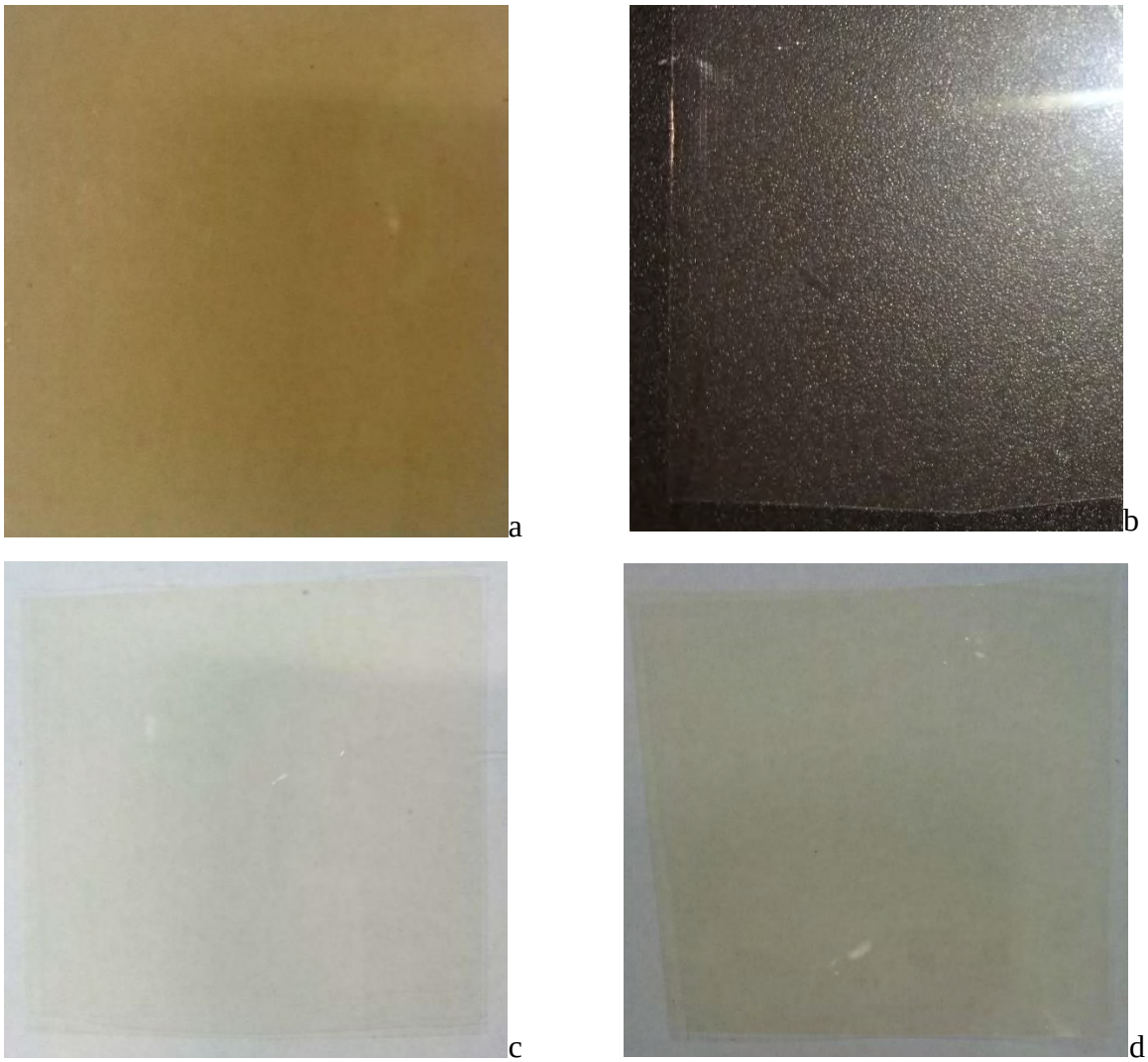
Fonte: Própria autoria.
F1: gelatina + 0,8% EEP + 0,15% OE cravo + 0,40% OE manjericão; F2: gelatina + 0,8% EEP + 0,30% OE cravo; F3: gelatina + 0,8% EEP + 0,30% OE cravo; F4: gelatina + 0,8% EEP + 0,225% OE cravo + 0,20% OE manjericão. F5: gelatina + 0,8% EEP + 0,075% OE cravo + 0,60% OE manjericão; F6: gelatina + 0,8% EEP + 0,80% OE manjericão, F7: gelatina + 0,8% EEP + 0,15% OE cravo + 0,40% OE manjericão, F8: gelatina + 0,8% EEP + 0,80% OE manjericão; C1: gelatina; C2: gelatina + 0,8% EEP; C3: gelatina + 0,30% OE cravo; C4: gelatina + 0,80% OE manjericão
a,b letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa para cada formulação de filme ativo

5.3.5 Parâmetros cromáticos:

As propriedades ópticas dos filmes são um atributo importante que influencia sua aparência e adequação para várias aplicações. Filmes comestíveis claros são tipicamente desejáveis com maior aplicabilidade e aceitabilidade em sistemas de embalagem de alimentos (AHMAD et al., 2012; HOSSEINI et al., 2015).

Os filmes ativos apresentaram coloração vermelha atribuída à adição do extrato etanólico de própolis vermelha (Figura 24a), os filmes sem adição do EEP apresentaram cor mais branca própria da gelatina (Figura 24b); a adição de óleo essencial de cravo e de manjericão, visualmente não afetaram significativamente nas mudanças de cor (Figura 24c e Figura 24d).

Figura 24 - Exemplos do aspecto visual dos filmes ativos com adição de extrato etanólico de própolis vermelha (a) e filmes controle com gelatina (b) e óleo essencial de cravo (c) e de manjericão (d).



Fonte: Própria autoria.

Os valores médios dos parâmetros cromáticos, luminosidade (L*), croma a* (vermelho^{+} - verde^{-}), croma b* (amarelo^{+} - azul^{-}) e diferença de cor (ΔE*) são apresentados na tabela 24. A adição de extrato etanólico de própolis vermelha foi constante para todos os tratamentos (0,8 g/100g solução), e a variação nos parâmetros está determinada pela adição de óleo essencial de cravo e manjericão em diferentes concentrações. Os filmes mais claros foram os controles C1 e C2 sem diferenças estatísticas ($p>0,05$), seguido do controle C4 apresentando menor valor devido à

maior concentração de óleo no filme (0,8%). A adição do EEP indicou filmes menos claros, embora tenham apresentado diferenças estatísticas ($p<0,05$), a variação foi entre 70,8 e 75,6.

Em relação ao parâmetro a*, a adição de EEP influenciou diretamente na coloração vermelha dos filmes, comparados com os controles C1, C3 e C4, com tendência à tonalidade verde, mas a adição de óleos aumentou a tonalidade vermelha de 10,4 (C2) até valores de 16,7 (F3). Contudo, os valores médios dos tratamentos apresentaram diferenças estatísticas ($p<0,05$), mas a variação entre eles não foi muito expressiva, indicando a dominância do EEP na coloração vermelha. O mesmo comportamento foi encontrado para o parâmetro b*, onde os filmes controles sem adição de EEP apresentaram uma coloração menos amarela que os filmes contendo EEP. Os valores entre os tratamentos oscilaram entre 29,0 e 36,0 (Tabela 23), sendo maiores ao filme controle com EEP (C2).

Tabela 24 - Valores médios dos parâmetros cromáticos L*, a*, b* e diferença de cor (ΔE*) dos Filmes ativos

Tratamento	L*	a*	b*	ΔE*
F1	$74,6 \pm 0,8^{e}$	$13,2 \pm 1,0^{d}$	$33,1 \pm 0,5^{c}$	$47,8 \pm 0,9^{b}$
F2	$72,7 \pm 0,7^{g}$	$14,7 \pm 1,5^{bc}$	$29,0 \pm 0,5^{e}$	$43,9 \pm 1,1^{d}$
F3	$74,0 \pm 0,7^{ef}$	$16,7 \pm 0,3^{a}$	$29,2 \pm 0,4^{e}$	$45,1 \pm 0,6^{c}$
F4	$75,6 \pm 0,6^{d}$	$14,4 \pm 0,4^{c}$	$31,3 \pm 1,4^{d}$	$39,9 \pm 0,7^{e}$
F5	$70,8 \pm 0,9^{h}$	$12,9 \pm 0,5^{d}$	$36,1 \pm 0,9^{a}$	$53,7 \pm 0,6^{a}$
F6	$73,2 \pm 0,5^{fg}$	$15,3 \pm 0,4^{bc}$	$34,4 \pm 0,8^{b}$	$48,0 \pm 0,8^{b}$
F7	$72,8 \pm 0,8^{g}$	$15,4 \pm 0,8^{b}$	$32,9 \pm 0,9^{c}$	$48,0 \pm 0,6^{b}$
F8	$73,2 \pm 0,8^{fg}$	$14,9 \pm 0,5^{bc}$	$33,6 \pm 0,9^{bc}$	$48,2 \pm 1,0^{b}$
C1	$89,9 \pm 0,4^{a}$	$-1,6 \pm 0,1^{g}$	$5,9 \pm 0,3^{i}$	$5,8 \pm 0,4^{i}$
C2	$77,1 \pm 0,5^{c}$	$10,4 \pm 0,4^{f}$	$25,3 \pm 1,0^{f}$	$34,0 \pm 0,5^{f}$
C3	$89,4 \pm 0,1^{a}$	$-1,9 \pm 0,1^{g}$	$9,1 \pm 0,5^{h}$	$8,6 \pm 0,5^{h}$
C4	$88,4 \pm 0,1^{b}$	$-2,4 \pm 0,1^{g}$	$16,1 \pm 1,3^{g}$	$18,8 \pm 0,9^{g}$

Fonte: Própria autoria.
F1: gelatina + 0,8% EEP + 0,15% OE cravo + 0,40% OE manjericão; F2: gelatina + 0,8% EEP + 0,30% OE cravo; F3: gelatina + 0,8% EEP + 0,30% OE cravo; F4: gelatina + 0,8% EEP + 0,225% OE cravo + 0,20% OE manjericão. F5: gelatina + 0,8% EEP + 0,075% OE cravo + 0,60% OE manjericão; F6: gelatina + 0,8% EEP + 0,80% OE manjericão, F7: gelatina + 0,8% EEP + 0,15% OE cravo + 0,40% OE manjericão, F8: gelatina + 0,8% EEP + 0,80% OE manjericão; C1: gelatina; C2: gelatina + 0,8% EEP; C3: gelatina + 0,30% OE cravo; C4: gelatina + 0,80% OE manjericão
a,b letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa para cada formulação de filme ativo

Similarmente os parâmetros a* e b*, a diferença de cor (ΔE*) dos filmes frente ao padrão (L*= 92,6; a*= -1,3; b*= 1,2) foi influenciada pela adição de extrato etanólico de própolis vermelha, seguida da concentração de óleo essencial de manjericão. Pois, as maiores diferenças foram encontradas nos tratamentos F5 e F6 com adição de 0,225 e 0,3% de OE de manjericão respectivamente. A menor diferença de cor em relação ao filme controle de gelatina (C1) foi reportada pelo filme controle com 0,3% de OE de cravo (C3).

A adição de diversos óleos essências em filmes biodegradáveis tem apresentado influência nos parâmetros cromáticos. Hafsa et al. (2016) desenvolveram filmes de quitosana com óleo essencial de eucaliptos em diferentes concentrações, reportando diminuição na luminosidade com o aumento da concentração, além de variações nos parâmetros a* e b* e aumento na diferença de cor. Outros trabalhos com diferentes óleos e macromoléculas tem reportado comportamentos similares nos parâmetros cromáticos (HOPKINS et al., 2015; HOQUE; BENJAKUL; PRODPRAN, 2011; TEIXEIRA et al., 2014).

Os valores de opacidade (Opa) e brilho (60°) dos filmes ativos e controles estão apresentados na tabela 25. Embora os valores de opacidade nos filmes ativos e controles tenham apresentados diferenças estatísticas ($p<0,05$), a variação entre eles não foi muito expressiva, sendo influenciada pela adição de óleo essencial de manjericão (C4), considerando os filmes muito transparentes. Em relação ao brilho, os menores valores nos filmes ativos foram apresentados pelos tratamentos com maior conteúdo de OE de manjericão (F6 e F8), e comparado com o filme controle de gelatina, todas as formulações apresentaram menores valores de brilho ($P<0,05$). Os valores oscilaram entre 125,8 (C1) e 96,3 (F6), sendo que, entre os tratamentos, os filmes com maior conteúdo de OE de cravo apresentaram os maiores valores (113,2 – 115,5).

Alexandre et al. (2016), avaliaram o brilho de filmes de gelatina com nanopartículas de montmorillonita e óleo essencial de gengibre, encontrando valores para o filme controle de 154 ± 3,3 e 122 ± 1,7 para o filme adicionado com o óleo essencial. Embora os valores de brilho sejam maiores que os reportados nesta tese, estes apresentam o mesmo comportamento quando é adicionado óleo essencial em diferentes concentrações.

Tabela 25 - Valores médios da opacidade (Opa) e brilho dos Filmes ativos

Tratamento	Opa	Brilho (60°)
F1	3,7 ± 0,1[cd]	97,4 ± 0,5[i]
F2	3,6 ± 0,1[d]	114,1 ± 0,2[d]
F3	3,6 ± 0,1[d]	113,2 ± 0,5[e]
F4	3,2 ± 0,1[ef]	115,5 ± 0,5[d]
F5	4,8 ± 0,1[b]	98,7 ± 0,8[h]
F6	3,2 ± 0,1[ef]	96,3 ± 0,4[j]
F7	3,6 ± 0,1[d]	99,8 ± 0,7[g]
F8	3,3 ± 0,1[e]	96,6 ± 0,8[ij]
C1	3,9 ± 0,1[c]	125,8 ± 0,6[a]
C2	2,8 ± 0,2[g]	109,6 ± 0,7[f]
C3	3,1 ± 0,1[f]	119,6 ± 1,2[c]
C4	5,1 ± 0,3[a]	121,1 ± 0,7[b]

Fonte: Própria autoria.
F1: gelatina + 0,8% EEP + 0,15% OE cravo + 0,40% OE manjericão; F2: gelatina + 0,8% EEP + 0,30% OE cravo; F3: gelatina + 0,8% EEP + 0,30% OE cravo; F4: gelatina + 0,8% EEP + 0,225% OE cravo + 0,20% OE manjericão. F5: gelatina + 0,8% EEP + 0,075% OE cravo + 0,60% OE manjericão; F6: gelatina + 0,8% EEP + 0,80% OE manjericão, F7: gelatina + 0,8% EEP + 0,15% OE cravo + 0,40% OE manjericão, F8: gelatina + 0,8% EEP + 0,80% OE manjericão; C1: gelatina; C2: gelatina + 0,8% EEP; C3: gelatina + 0,30% OE cravo; C4: gelatina + 0,80% OE manjericão
a,b letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa para cada formulação de filme ativo

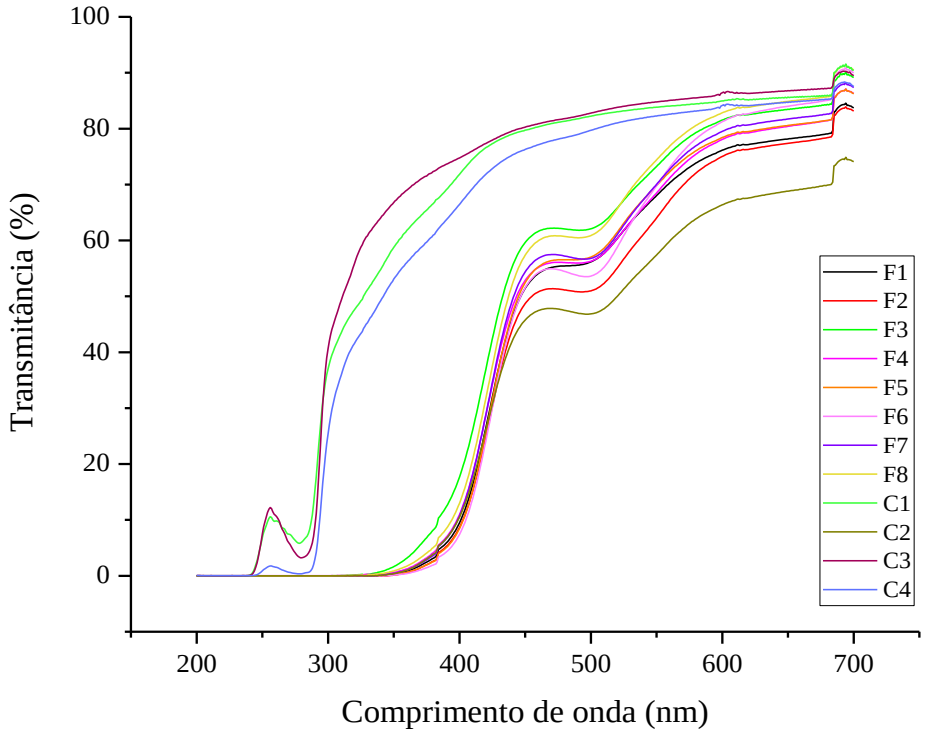
Em outros trabalhos, Bonilla et al. (2011) desenvolveram filmes de quitosana com óleo essencial de manjericão encontrando diminuição no brilho dos filmes, o qual foi explicado já que o brilho dos filmes está ligado à morfologia da sua superfície, e, em geral, quanto mais lisa a superfície, mais brilhante é o filme. Assim, os filmes compósitos são menos brilhantes do que os filmes de puros devido à ocorrência de descontinuidades na matriz do polímero. Estas descontinuidades aumentam a rugosidade da superfície do filme e diminuem a refletância especular.

5.3.6 Barreira a luz:

O efeito de barreia a luz na região UV-Vis dos filmes ativos e controles pode ser observado na figura 25. De maneira geral, o filme de gelatina controle (C1) e os filmes de gelatina controle com adição de óleo essencial de cravo (C3) e óleo essencial de manjericão (C4) mostram valores mais altos de transmitância, apresentando barreira até aproximadamente 300 nm. Mas, a adição de

extrato etanólico de própolis vermelha nos filmes à base de gelatina melhora as propriedades de barreira a luz, apresentando menores valores de transmitância, ampliando a barreira a luz até aproximadamente 450 nm. Embora a adição de EEP melhore as propriedades de barreira à luz dos filmes ativos, pode-se observar que, em relação ao filme controle de gelatina com EEP (C2), ao adicionar óleos essenciais em diferentes concentrações os filmes apresentam valores superiores de transmitância nos mesmos comprimentos de onda.

Figura 25 - Propriedades de barreira a luz ultravioleta e luz visível dos filmes ativos.



Fonte: Própria autoria.

Resultados similares em filmes de gelatina-quitosana com óleo essencial de orégano e gelatina adicionado com óleo essencial de bergamota e óleo essencial de erva-cidreira foram apresentados por Hosseini et al. (2015) e Ahmad et al. (2012). No intervalo de radiação UV de 200-280 nm, todos os filmes exibiram excelentes propriedades de barreira UV, provavelmente

devido ao elevado teor de aminoácidos aromáticos tais como acido glutâmico e triptofano na das proteínas que são capazes de absorver radiação. Além disso, compararam os resultados dos filmes ativos com filmes de polímeros convencionais, sendo que, a taxa de transmissão de luz a 280 nm dos filmes ativos foi notavelmente mais baixa que as exibidas por alguns filmes convencionais, isto é, 71,78-27,64% para polipropileno orientado (OPP) e polietileno de baixa densidade (LDPE), respectivamente. Estes resultados sugerem que os filmes adicionados com óleos essenciais podem retardar a oxidação lipídica causada pela luz UV nos sistemas alimentares.

Embora não tenham muitos trabalhos na literatura de filmes biodegradáveis com extrato etanólico de própolis vermelha, o aumento na proteção à luz UV/Visível pode estar relacionado à composição da própolis vermelha, especialmente aos compostos fenólicos como flavonoides e ácidos fenólicos, os quais possuem estruturas insaturadas responsáveis pela absorção da luz (BITENCOURT et al., 2014; GÓMEZ-ESTACA et al., 2009, 2015; HOQUE; BENJAKUL; PRODPRAN, 2011).

5.3.7 Permeabilidade ao vapor de água:

A permeabilidade ao vapor de água (PVA) de filmes depende tanto da difusividade como da solubilidade das moléculas de água na matriz polimérica (WANG et al., 2013). A adição de extrato etanólico de própolis vermelha como dos óleos essenciais teve um efeito de redução na permeabilidade ao vapor de agua dos filmes. Na tabela 26 estão apresentados os valores de PVA dos filmes ativos e controles ($p<0,05$), onde a maior PVA foi apresentada pelo filme controle (0,40 ± 0,01 g x mm/m^2 x h x kPa. Os menores valores foram obtidos nos tratamentos com maior conteúdo de OE de manjericão F6 e F8 com valores de 0,29 e 0,30 g x mm/m^2 x h x kPa respectivamente, com redução do 25% da PVA em relação ao filme controle (C1). Em termos tecnológicos, a PVA não foi alterada fortemente pelos diversos tratamentos, continuaram sendo filmes muito permeáveis ao vapor de água.

Tabela 26 - Valores médios de Permeabilidade ao vapor de água (PVA) dos Filmes ativos

Tratamento	PVA (g x mm/m^2 x h x kPa)
F1	0,32 ± 0,01 ^{de}
F2	0,39 ± 0,01 ^{ab}
F3	0,38 ± 0,02 ^{b}
F4	0,30 ± 0,02 ^{ef}
F5	0,34 ± 0,01 ^{cd}
F6	0,30 ± 0,01 ^{ef}
F7	0,35 ± 0,02 ^{c}
F8	0,29 ± 0,01 ^{fg}
C1	0,40 ± 0,01 ^{a}
C2	0,31 ± 0,02 ^{ef}
C3	0,27 ± 0,01 ^{g}
C4	0,30 ± 0,02 ^{ef}

Fonte: Própria autoria.
F1: gelatina + 0,8% EEP + 0,15% OE cravo + 0,40% OE manjericão; F2: gelatina + 0,8% EEP + 0,30% OE cravo; F3: gelatina + 0,8% EEP + 0,30% OE cravo; F4: gelatina + 0,8% EEP + 0,225% OE cravo + 0,20% OE manjericão. F5: gelatina + 0,8% EEP + 0,075% OE cravo + 0,60% OE manjericão; F6: gelatina + 0,8% EEP + 0,80% OE manjericão, F7: gelatina + 0,8% EEP + 0,15% OE cravo + 0,40% OE manjericão, F8: gelatina + 0,8% EEP + 0,80% OE manjericão; C1: gelatina; C2: gelatina + 0,8% EEP; C3: gelatina + 0,30% OE cravo; C4: gelatina + 0,80% OE manjericão
a,b letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa para cada formulação de filme ativo

Estes resultados podem ser explicados pelas ligações cruzadas resultantes das interações entre a gelatina e os compostos fenólicos presentes no extrato etanólico de própolis vermelha e os óleos essenciais (observada nos espectros infravermelho) que podem reduzir o volume livre na matriz polimérica, resultando em menos interações entre as moléculas de água nos filmes ativos (BITENCOURT et al., 2014).

Valores similares de PVA foram reportados por Siripatrawan; Vitchayakitti (2016), em filmes de quitosana adicionados com extrato etanólico de própolis. Este comportamento foi explicado pelo teor de compostos polifenólicos do EEP que podem ser capazes de encaixar-se na matriz da quitosana e estabelecer interações, tais como hidrogénio ou ligação covalente com os grupos reativos da quitosana, que limitam a disponibilidade de grupos de hidrogênio para formar ligação hidrofílica com água, levando a uma diminuição da afinidade de filmes de quitosana em direção à água e menor PVA.

O mesmo comportamento de redução da PVA em filmes de gelatina com extrato etanólico de própolis, filmes de gelatina reforçados com montmorillonita e adicionados com óleo essencial de gengibre e filmes de gelatina de peixe com óleo essencial de cravo e alho foram reportados por Bodini et al. (2013), Alexandre et al. (2016) e Teixeira et al. (2014), respetivamente.

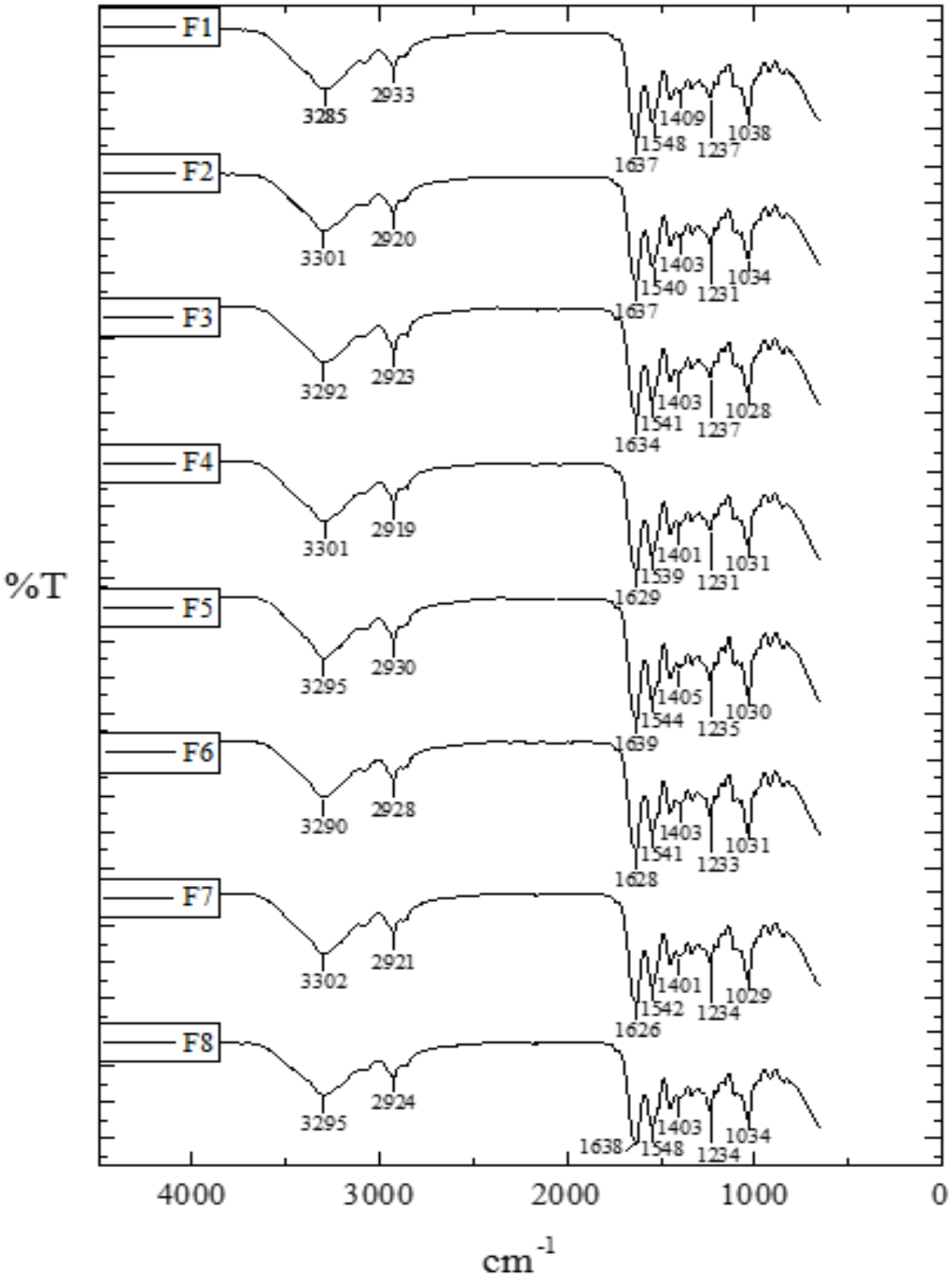
5.3.8 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR):

Os sinais característicos dos espectros infravermelhos das oito formulações e dos quatro controles dos filmes ativos na faixa de 4000 – 650 cm^{-1} estão apresentados na figura 21 e figura 22, respectivamente.

Foram identificados os sinais característicos de filmes de gelatina puros nos espectros infravermelhos, exibidos nas bandas que correspondem a Amida A (3290 cm^{-1}), Amida B (2926 cm^{-1}), Amida I (1631 cm^{-1}), Amida II (1542 cm^{-1}) e Amida III (1236 cm^{-1}) (ANDREUCCETTI et al., 2012; BERGO; SOBRAL, 2007; BITENCOURT et al., 2014; WU et al., 2013). Pequenos deslocamentos das bandas da Amida A, Amida B, Amida II e Amida III foram encontrados nos filmes com adição de extrato etanólico de própolis vermelha e óleos essenciais e cravo e manjericão. Estes deslocamentos foram atribuídos às interações entre a gelatina e os compostos fenólicos presentes no EEP e os OE (BITENCOURT et al., 2014; WU et al., 2013).

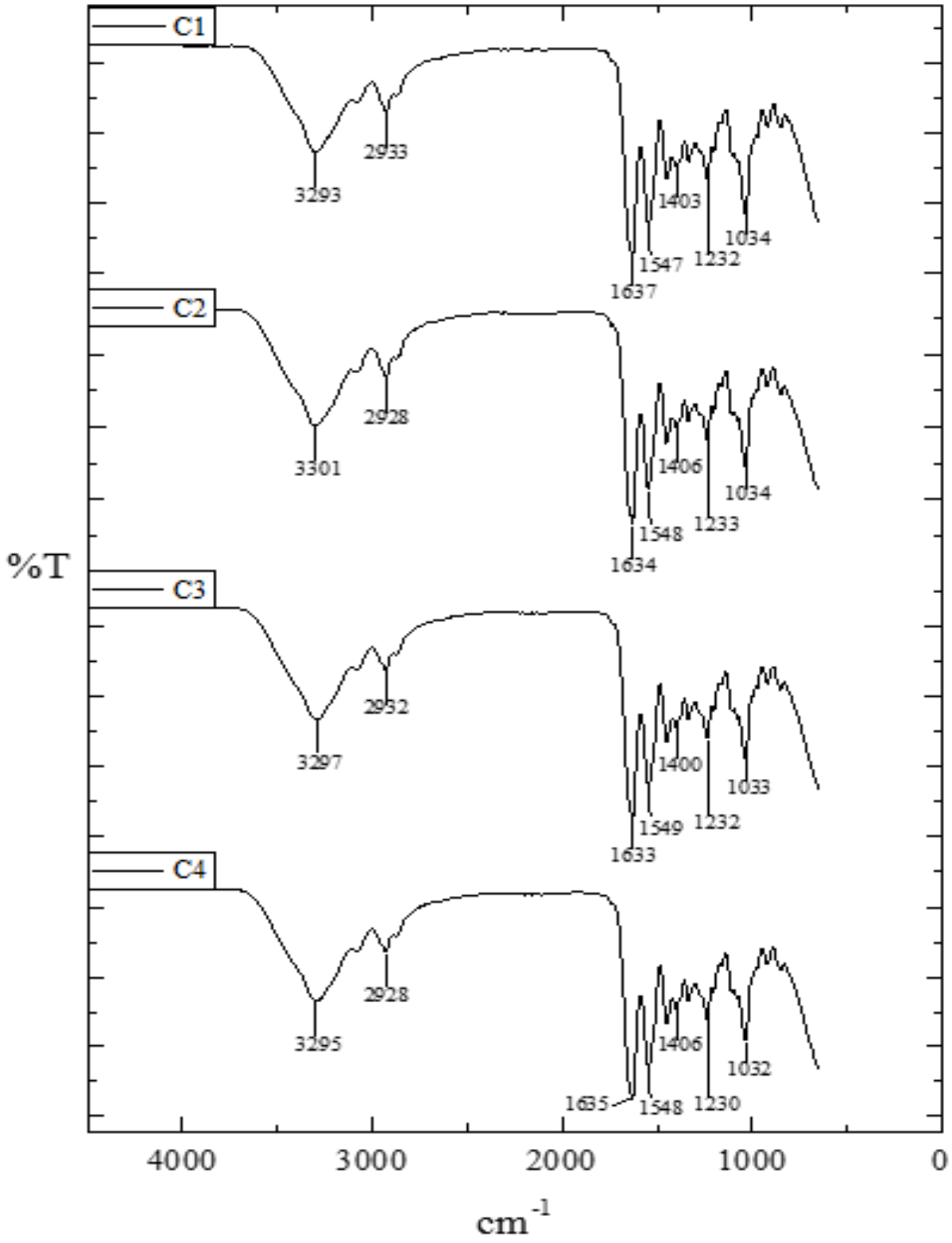
A banda de amida A (3290 cm^{-1}) representa a vibração de estiramento N-H, a amida B (2926 cm^{-1}) representa vibrações de estiramento assimétrico de =CH e $-NH_3$ de fragmentos peptídicos de moléculas de gelatina, a amida I (1631 cm^{-1}) representa a ligação C=O e a amida II (1542 cm^{-1}) representa a vibração de estiramento C-N e a deformação angular da ligação N-H (ANDREUCCETTI et al., 2012; BERGO; SOBRAL, 2007; BITENCOURT et al., 2014; BODINI et al., 2013; WU et al., 2013). Outras bandas encontradas nos espectros dos filmes ativos e controles, 1402 e 1336 cm^{-1} foram identificadas como vibrações de grupos $-CH_2$ de resíduos de ácido de prolina de moléculas de gelatina e as interações entre vibrações de estiramento assimétricas de grupos -OH do glicerol; a banda 1030 cm^{-1} foi relacionada com a presença de glicerol nos filmes (BERGO; SOBRAL, 2007).

Figura 26 - Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) dos Filmes ativos: F1, F2, F3, F4, F5, F6, F7 e F8.



Fonte: Própria autoria.

Figura 27 - Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) dos Filmes controle: C1, C2, C3 e C4.



Fonte: Própria autoria.

Ahmad et al. (2012) reportaram deslocamentos das bandas de amida I em filmes de gelatina de peixe adicionados com óleo essencial de bergamota e erva-cidreira em diferentes concentrações. Estas diferenças espectrais foram atribuídas a diferentes conformações e orientações das cadeias polipeptídicas em função da incorporação dos óleos essenciais. Os deslocamentos do pico de amida I para o número de onda mais baixo foram associadas com uma diminuição na ordem molecular devido à alteração conformacional. Além disso, os deslocamentos dos sinais espectrais foram associados à interação intermolecular formada durante o processo de secagem do filme.

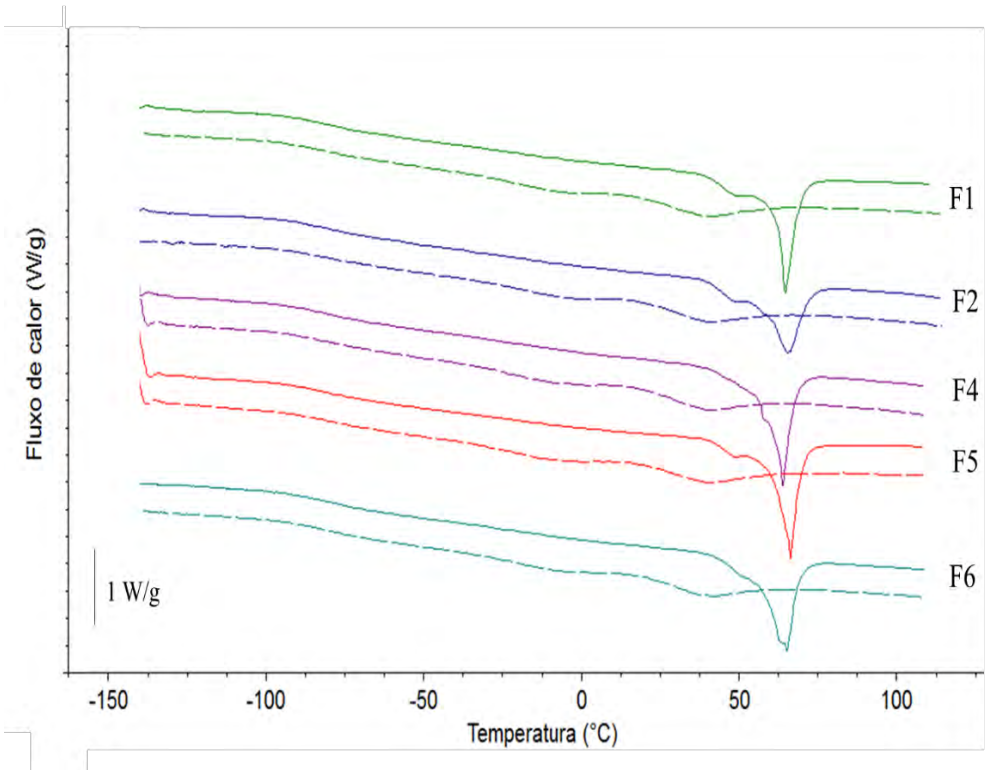
5.3.9 Calorimetria diferencial de varredura (DSC):

A transição vítrea de um polímero está associada a um relaxamento primário devido ao início dos movimentos moleculares segmentados das cadeias poliméricas, particularmente dos materiais amorfos ou em regiões amorfas. Esta transição é um fenômeno importante, que influência as propriedades dos materiais e potenciais aplicações (TONGNUANCHAN et al., 2016). Exemplos dos termogramas da primeira (linha continua) e segunda (linha tracejada) varredura nos filmes ativos e controles estão apresentados nas figuras 28 e 29, respectivamente, sendo que, as curvas obtidas foram semelhantes as obtidas por (SOBRAL et al., 2001).

Na primeira varredura de aquecimento (-150 a 150°C), as amostras exibiram uma temperatura de transição vítrea (T_{g1}), seguida de um pico endotérmico (T_m) que correspondeu à fusão dos cristais da macromolécula de gelatina; este comportamento é típico de materiais parcialmente cristalinos. Na segunda varredura foi observada somente a transição vítrea (T_{g2}), típico de um material amorfo.

Na Tabela 27, estão apresentados os valores da temperatura de transição de fusão (T_m), a entalpia de fusão (ΔH) e a temperatura de transição vítrea (T_g) da primeira e segunda varredura dos filmes ativos e controles. A adição dos óleos essenciais e extrato etanólico de própolis vermelha não modificou a temperatura de transição de fusão dos filmes ativos ($p>0,05$), apresentando-se um valor médio de T_m na primeira varredura de 69,1 °C. Embora não se apresentaram diferenças estatísticas para T_m, a maior temperatura foi reportada pelo filme controle com óleo essencial de manjericão (69,2 ± 3,0°C), seguido do tratamento com maior conteúdo do mesmo óleo (F6).

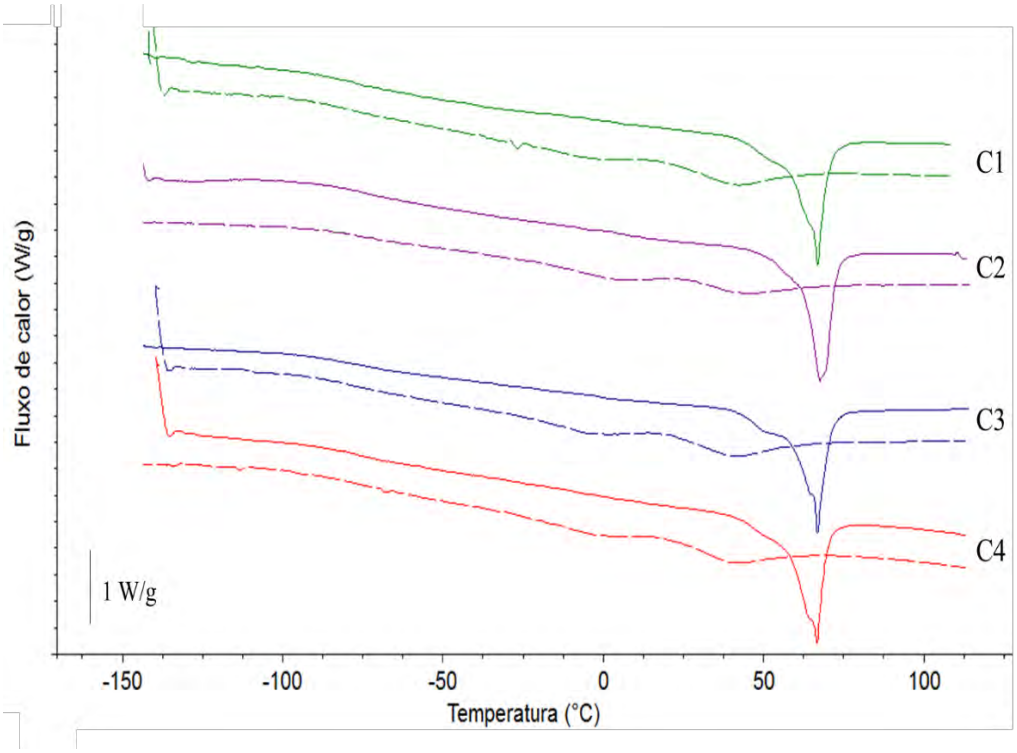
Figura 28 - Exemplos de termogramas dos filmes ativos F1(a), F2 (b), F4 (c), F5 (d) e F6 (e).



Fonte: Própria autoria.

A temperatura de transição vítrea na primeira varredura (T_{g1}) apresentou pequenas mudanças em relação ao filme controle ($p<0,05$). A mistura de óleos essenciais e extrato etanólico de própolis vermelha nos filmes de gelatina diminuiu discretamente a T_{g1}, desde 52,2 ± 3,8 °C para o controle C1 até 48,5 ± 3,8 °C para F8. A T_{g1} do filme controle de gelatina com extrato etanólico de própolis vermelha, não foi visível nos termogramas, aparentemente esta temperatura foi deslocada até a temperatura de transição de fusão (T_m). Não foi possível ver uma interação significativa entre o EEP e a gelatina nos espetros FTIR e os difratogramas que modificara a estrutura semi-cristalina da macromolécula.

Figura 29 - Exemplos de termogramas dos filmes ativos controle C1(a), C2 (b), C3 (c) e C4 (d).



Fonte: Própria autoria.

A energia necessária à fusão representada como entalpia de fusão (ΔH) foi modificada pela adição do extrato etanólico de própolis vermelha e óleos essenciais, sendo que, a mistura deles com a gelatina apresentou uma diminuição discreta no valor ($p<0,05$). As maiores entalpias foram reportadas para os controles C3 e C4 respectivamente, embora não apresentassem diferenças estatísticas com os outros controles C1 e C2. A menor entalpia foi apresentada pelo filme com 0,075% de OE de cravo e 0,6% de OE de manjericão F5 (22,4 ± 0,5 J/g) e as maiores pelos filmes controles C3 e C4 respectivamente.

Na segunda varredura de temperatura, os valores de T_{g2} dos filmes ativos e controles não apresentaram diferenças estatísticas ($p>0,05$). No entanto, o maior valor foi apresentado pelo filme com maior conteúdo de OE de manjericão F6 (34,9 ± 2,6 °C) e o menor pelo filme com 0,15% de óleo essencial de cravo e 0,4% de óleo essencial de manjericão F7 (32,4 ± 1,9 °C).

Tabela 27 - Resultados dos parâmetros obtidos das análises térmicas dos filmes ativos e os controles.

Tratamento	T_{g1} °C	T_m °C	ΔH J/g	T_{g2} °C
F1	49,9 ± 4,5^{ab}	67,8 ± 2,7^{a}	22,5 ± 0,4^{de}	33,2 ± 4,2^{a}
F2	50,8 ± 5,4^{ab}	68,2 ± 2,3^{a}	22,6 ± 1,2^{de}	35,2 ± 2,7^{a}
F3	50,5 ± 2,6^{ab}	69,0 ± 2,1^{a}	23,4 ± 0,6^{bcde}	32,4 ± 3,5^{a}
F4	52,9 ± 2,6^{ab}	67,5 ± 3,6^{a}	22,5 ± 0,8^{de}	34,0 ± 3,3^{a}
F5	50,2 ± 3,8^{ab}	68,4 ± 2,6^{a}	22,4 ± 0,5^{e}	33,0 ± 4,8^{a}
F6	51,3 ± 3,4^{ab}	69,0 ± 3,6^{a}	22,5 ± 0,5^{de}	34,9 ± 2,6^{a}
F7	52,0 ± 5,3^{ab}	68,1 ± 2,7^{a}	22,9 ± 0,7^{cde}	32,4 ± 1,9^{a}
F8	48,5 ± 3,8^{b}	65,8 ± 2,7^{a}	23,1 ± 0,4^{cde}	32,5 ± 1,9^{a}
C1	52,2 ± 3,8^{ab}	68,5 ± 1,6^{a}	24,0 ± 0,5^{abc}	32,8 ± 1,7^{a}
C2	-	66,8 ± 2,6^{a}	23,6 ± 0,5^{abcd}	33,5 ± 3,1^{a}
C3	56,1 ± 0,7^{a}	68,6 ± 2,2^{a}	24,6 ± 0,7^{a}	32,7 ± 2,5^{a}
C4	49,2 ± 2,6^{b}	69,2 ± 3,0^{a}	24,4 ± 0,9^{ab}	32,9 ± 4,1^{a}

Fonte: Própria autoria.
F1: gelatina + 0,8% EEP + 0,15% OE cravo + 0,40% OE manjericão; F2: gelatina + 0,8% EEP + 0,30% OE cravo; F3: gelatina + 0,8% EEP + 0,30% OE cravo; F4: gelatina + 0,8% EEP + 0,225% OE cravo + 0,20% OE manjericão. F5: gelatina + 0,8% EEP + 0,075% OE cravo + 0,60% OE manjericão; F6: gelatina + 0,8% EEP + 0,80% OE manjericão, F7: gelatina + 0,8% EEP + 0,15% OE cravo + 0,40% OE manjericão, F8: gelatina + 0,8% EEP + 0,80% OE manjericão; C1: gelatina; C2: gelatina + 0,8% EEP; C3: gelatina + 0,30% OE cravo; C4: gelatina + 0,80% OE manjericão
a,b letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa para cada formulação de filme ativo

Filmes de gelatina suína com diferentes concentrações de plastificante (sorbitol) apresentaram semelhanças na temperatura de transição de fusão (T_m) no filme com o maior conteúdo de plastificante (65g/100g gelatina) (SOBRAL et al., 2001). Vanin et al. (2005) avaliaram o efeito de diferentes plastificantes em filmes de gelatina, reportando valores de T_g na primeira varredura de 41,4 ± 6,5°C e entalpia ΔH de 23,5 ± 0,6 J/g com o plastificante glicerol (30g plastificante/100g gelatina).

Alexandre et al. (2016) estudaram filmes de gelatina reforçados com montmorillionita e adicionados com óleo essencial de gengibre, reportando valores de T_{g1} de 51,5 ± 3,9 °C e ΔH de 25,6 ± 0,5 J/g, valores semelhantes aos obtidos nesta tese. Tongnuanchan et al. (2016) reportaram T_g na primeira varredura de 49,77 °C para filmes de gelatina de peixe com óleo de palma e óleo essencial de manjericão usando lecitina de soja como emulsificante.

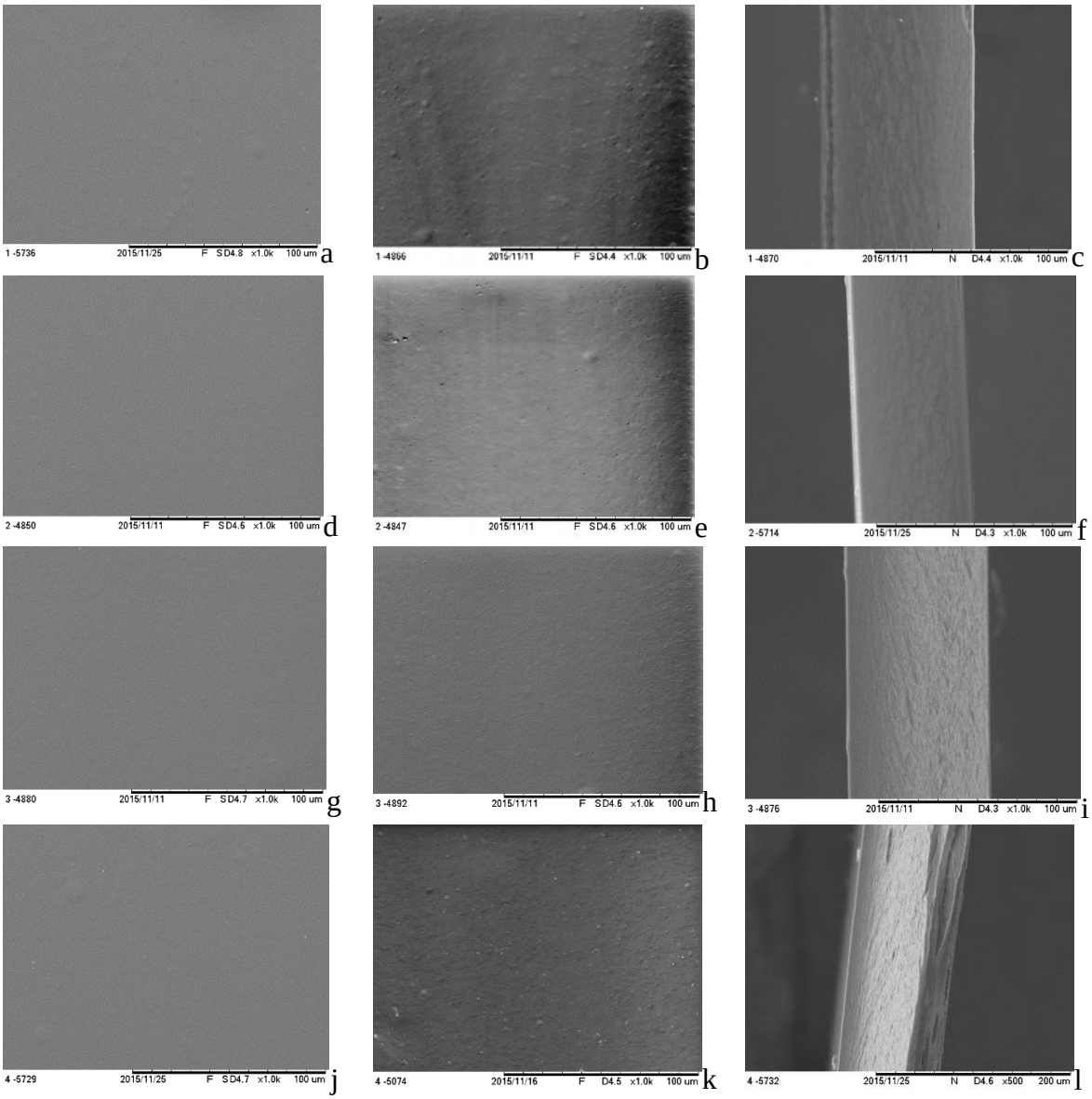
5.3.10 Microscopia eletrônica de varredura (SEM):

As micrografias dos filmes ativos (Figura 30, Figura 31) e controles (Figura 32) tanto na superfície como na parte transversal apresentaram heterogeneidade. Os filmes com maior concentração de OE de cravo (F2 e F3) apresentaram as superfícies mais homogêneas, observando-se pequenas estrias na parte transversal do filme.

Os filmes com misturas dos óleos essenciais de cravo e manjericão em diferentes proporções (F1, F4, F5 e F7) apresentaram rugosidade e heterogeneidade intermediaria tanto na superfície do filme como na seção transversal em relação aos outros tratamentos. A maior heterogenidade, formação de micro-poros e estrias foi apresentada nos filmes com maior conteúdo de óleo essencial de manjericão (F6 e F8), que pode ocorrido devido aos óleos essenciais e o extrato etanólico de própolis vermelha, que podem ter evaporado durante a secagem, levando à formação de micro-poros ao longo dos filmes.

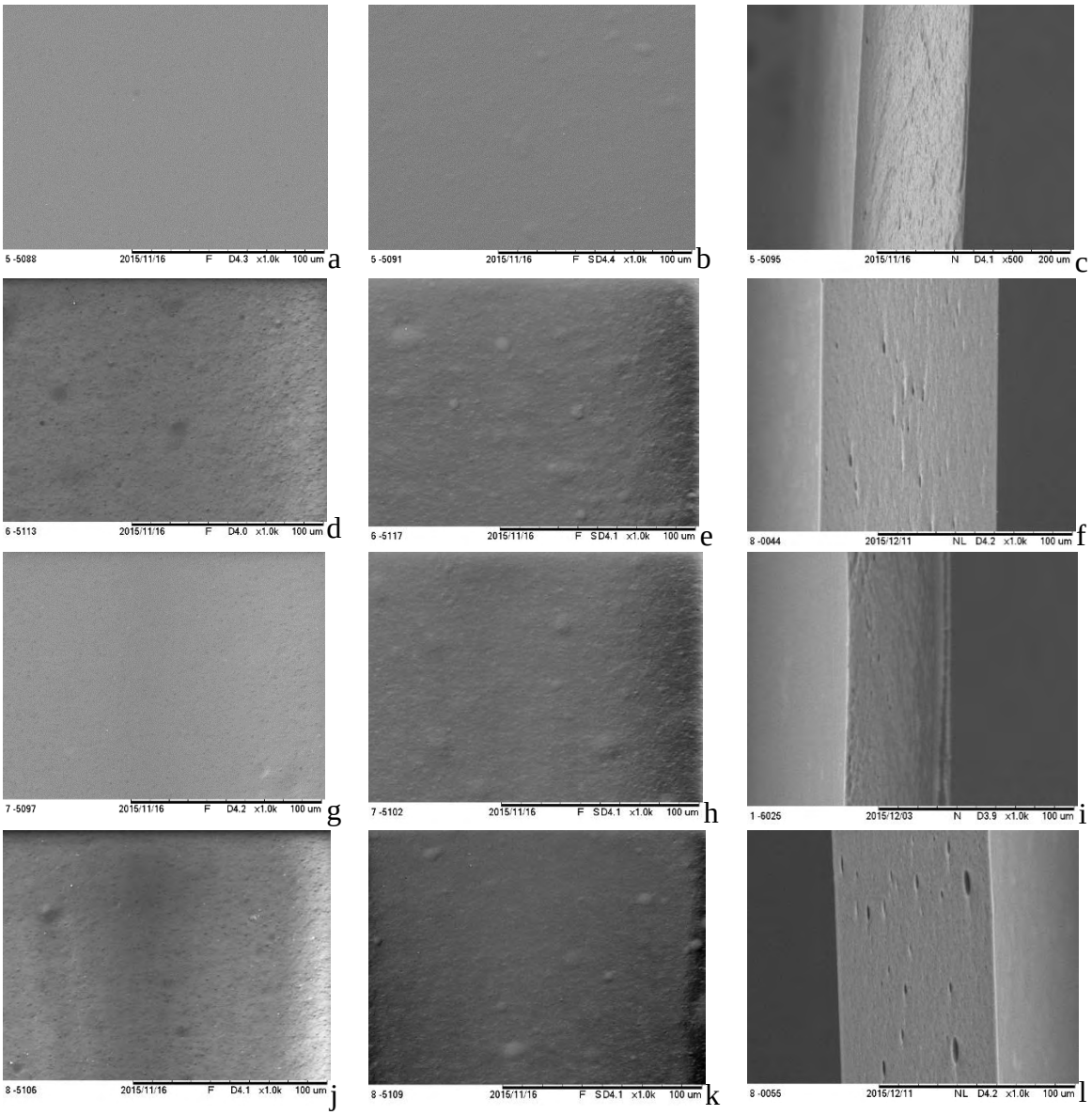
Em relação aos filmes controles, o filme de gelatina (C1) e o filme de gelatina com EEP (C2) apresentaram as superfícies, mas heterogêneas. As irregularidades podem ser atribuídas à adição da lecitina. O filme controle com óleo essencial de cravo, apresentou a menor heterogeneidade e aspecto menos rugoso entre todos os controles.

Figura 30 - Micrografias dos filmes ativos na superfície de secagem F1 (a), (b), F2 (d), (e), F3 (g), (h) e F4 (j), (k) e criofraturada F1 (c), F2 (f), F3 (i) e F4 (l).



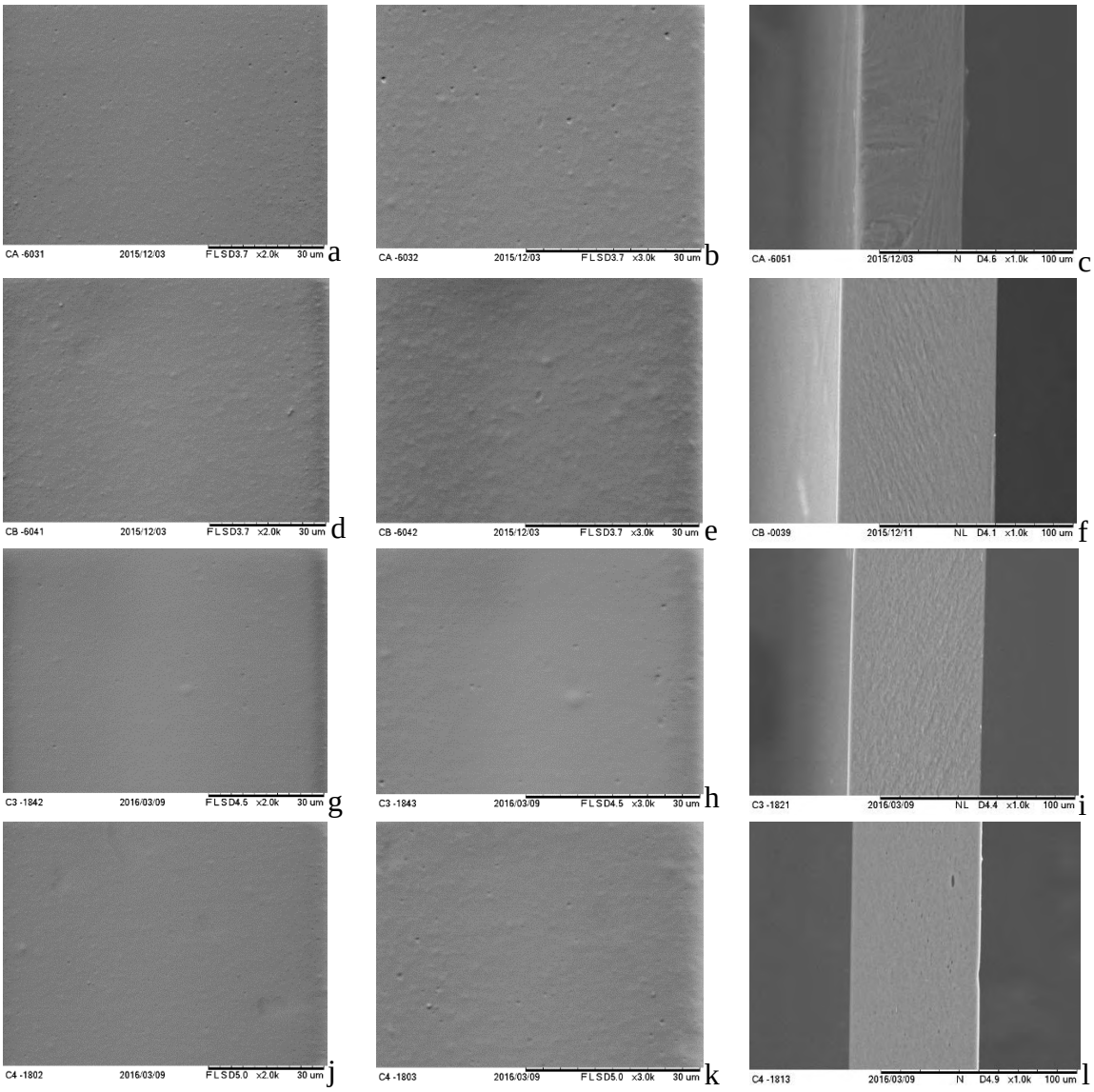
Fonte: Própria autoria.

Figura 31 - Micrografias dos filmes ativos na superfície de secagem F5 (a), (b), F6 (d), (e), F7 (g), (h) e F8 (j), (k) e criofraturada F5 (c), F6 (f), F7 (i) e F8 (l).



Fonte: Própria autoria.

Figura 32 - Micrografias dos filmes ativos controle na superfície de secagem C1 (a), (b), C2 (d), (e), C3 (g), (h) e C4 (j), (k) e criofraturada C1 (c), C2 (f), C3 (i) e C4 (l).



Fonte: Própria autoria.

Estruturas similares foram encontradas por Ahmad et al. (2012), onde, a adição de maiores concentrações de óleo essencial de bergamota ou óleo essencial de erva-cidreira em filmes a base de gelatina de peixe, aumentaram a formação de micro-poros na superfície e na parte transversal do filme, aumentando a rugosidade dos mesmos, comparada com o filme controle. Este comportamento foi relacionado com aumento da espessura dos filmes com o aumento da concentração dos óleos essenciais. Além disso, reportaram diferenças na porosidade do filme

adicionado com cada óleo essencial na mesma concentração, sendo que, o filme com óleo essencial de bergamota apresentou maior porosidade e com maior número de espaços no filme e, maior permeabilidade ao vapor de agua. Estes resultados apresentaram o mesmo comportamento que os reportados nesta tese.

Alexandre et al. (2016) reportaram o aumento da heterogeneidade em filmes de gelatina reforçados com montmorillionita adicionados com óleo essencial de gengibre em relação ao filme controle. Este comportamento provavelmente foi apresentado nos filmes porque as gotículas de óleo essencial foram instáveis no sistema de emulsão formando então estas estruturas. Resultados similares foram apresentados por Bitencourt et al. (2014); Bodini et al. (2013); Tongnuanchan; Benjakul; Prodpran, (2013); Tongnuanchan et al. (2016).

5.3.11 Microscopia de força atômica (AFM):

O resultado da rugosidade média (R_a) e rugosidade quadrática (R_q), expressas em nm, dos filmes ativos e controles estão apresentados na tabela 28. O maior efeito na rugosidade na superfície dos filmes foi atribuído a adição de óleo essencial de manjericão em altas concentrações (C4, 16 ± 0,7 nm). Embora, o filme controle de gelatina (C1) apresentou um valor intermédio de R_q em relação aos outros filmes, o qual pode ser atribuído a presencia da lecitina insolubilizada na solução. A adição de extrato etanólico de própolis vermelha e óleo essencial de cravo teve um efeito de redução da rugosidade superficial nas formulações avaliadas, sendo que, os menores valores foram apresentados pelo filme ativo com menor adição de óleo de manjericão (F4) e o filme ativo sem adição de óleo essencial de manjericão (F2). Os resultados da rugosidade dos filmes ativos estão relacionados com o brilho dos mesmos (Tabela 25), onde, a maiores valores de rugosidade, menor o brilho dos filmes. Exemplos das imagens da superfície dos filmes controles e filmes ativos obtidas por microscopia de força atômica são apresentadas nas figuras 33 e 34 respectivamente.

Trabalhos realizados por Atarés; Bonilla; Chiralt (2010) demostraram que a adição de óleo essencial de gengibre e óleo essencial de canela em filmes de caseinato de sódio em baixas concentrações leva a uma redução da rugosidade provavelmente devido ao estado líquido dos óleos que se estendem sobre a superfície da matriz proteica, reduzindo as suas irregularidades. Embora,

com o incremento da concentração de óleo na matriz aumentou a rugosidade na superfície do filme e diminui o brilho dos mesmos. Estes comportamentos são similares aos reportados nesta tese.

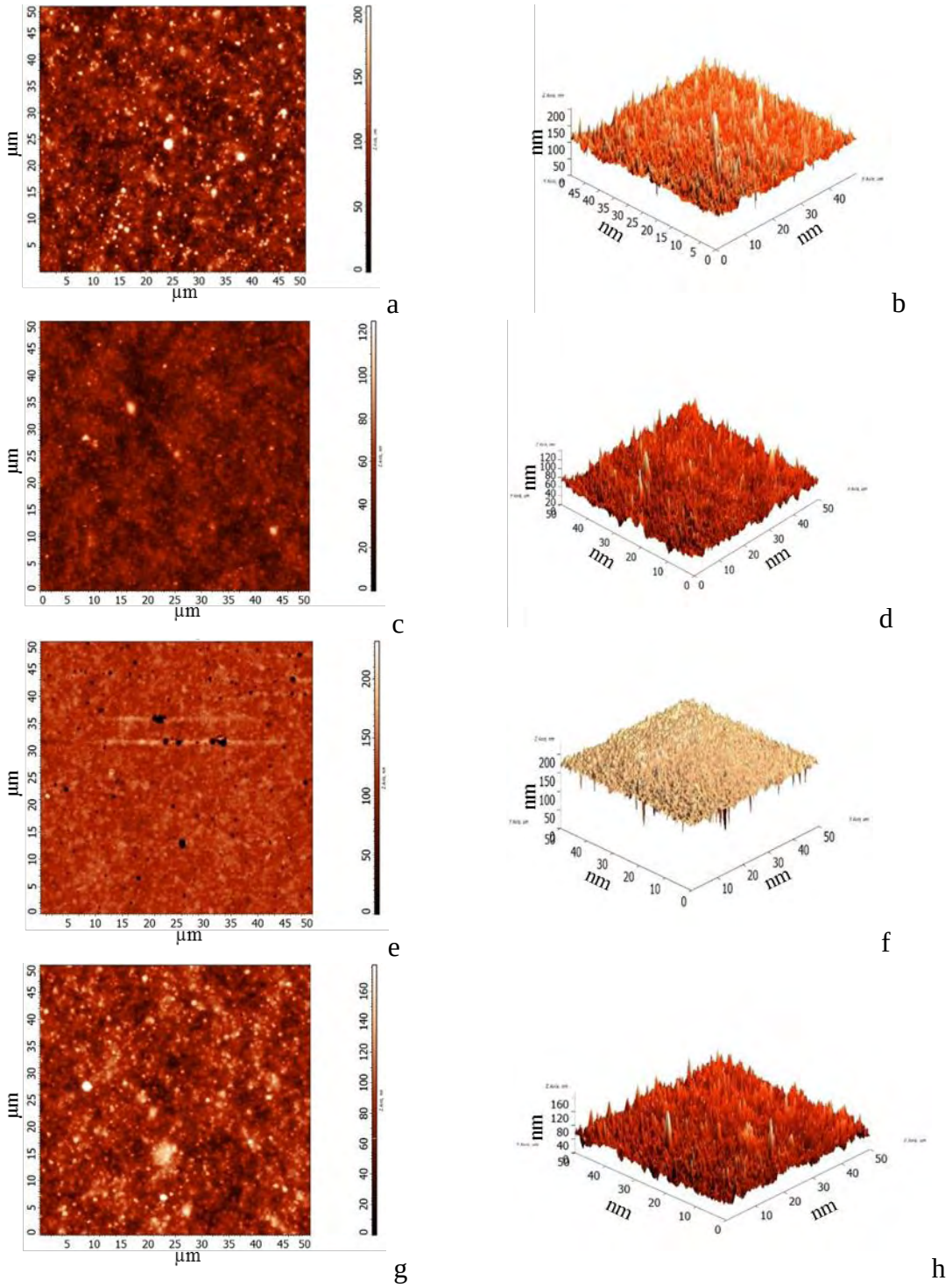
Tabela 28 - Exemplos de valores médios de Rugosidade R_a e R_q dos filmes ativos.

Tratamento	**Rq** (nm)	**Ra** (nm)
F1	$12 \pm 2{,}0^{b}$	$8 \pm 1{,}1^{bc}$
F2	$10 \pm 0{,}9^{d}$	$7 \pm 0{,}56^{de}$
F4	$8 \pm 0{,}5^{e}$	$6 \pm 0{,}2^{e}$
F5	$10 \pm 0{,}9^{cd}$	$8 \pm 0{,}9^{cd}$
F6	$11 \pm 1{,}3^{bc}$	$8 \pm 0{,}6^{bc}$
C1	$12 \pm 0{,}6^{b}$	$9 \pm 0{,}6^{b}$
C2	$10 \pm 0{,}6^{cd}$	$8 \pm 0{,}3^{cd}$
C3	$11 \pm 1{,}2^{bcd}$	$6 \pm 1{,}5^{e}$
C4	$16 \pm 0{,}7^{a}$	$12 \pm 0{,}6^{a}$

Fonte: Própria autoria
F1: gelatina + 0,8% EEP + 0,15% OE cravo + 0,40% OE manjericão; F2: gelatina + 0,8% EEP + 0,30% OE cravo; F4: gelatina + 0,8% EEP + 0,225% OE cravo + 0,20% OE manjericão. F5: gelatina + 0,8% EEP + 0,075% OE cravo + 0,60% OE manjericão; F6: gelatina + 0,8% EEP + 0,80% OE manjericão; C1: gelatina; C2: gelatina + 0,8% EEP; C3: gelatina + 0,30% OE cravo; C4: gelatina + 0,80% OE manjericão
a,b letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa para cada formulação de filme ativo

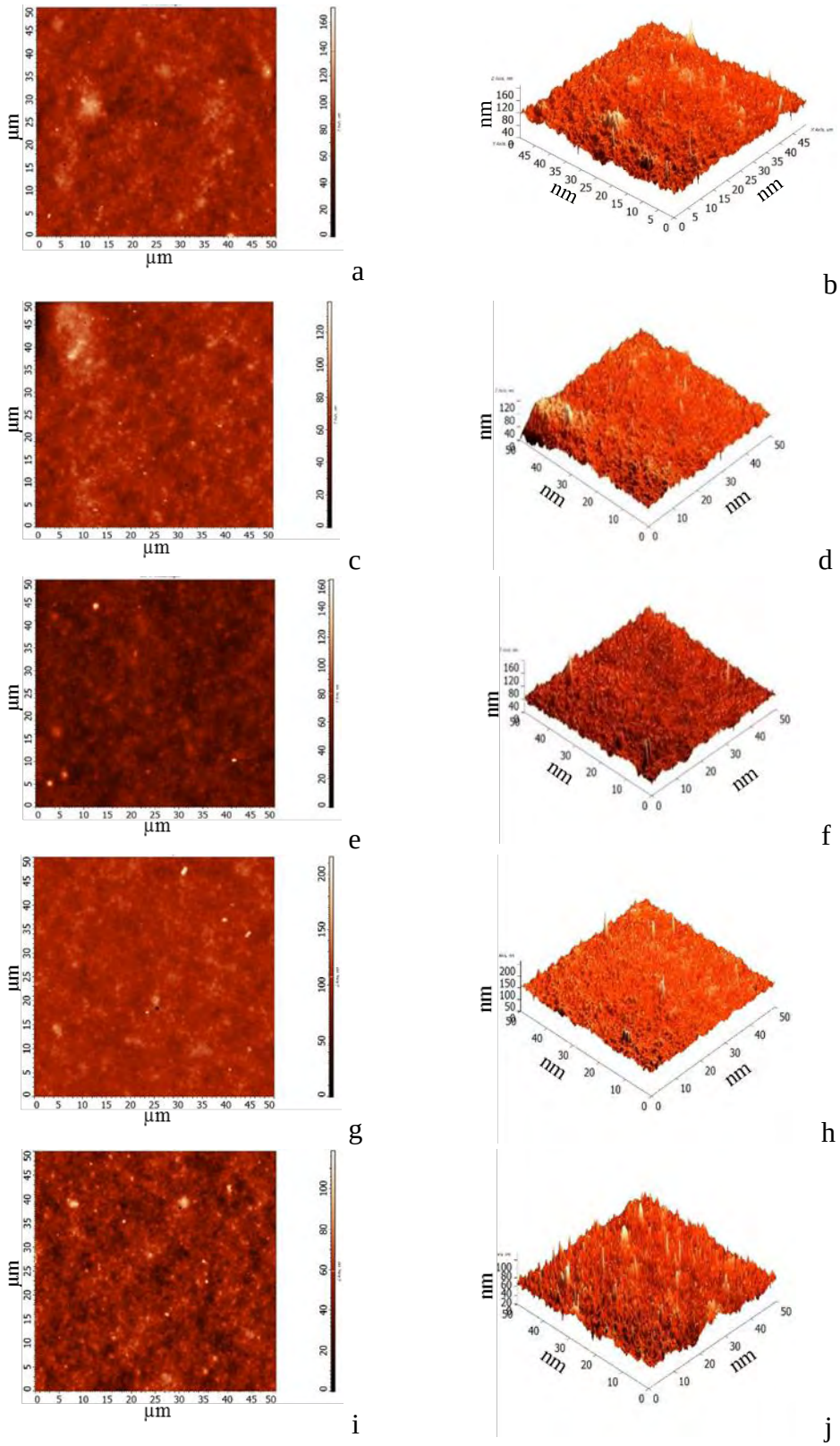
Alexandre et al. (2016) estudaram o efeito de óleo essencial de gengibre e nanopartículas de montmorillonita em filmes de gelatina, encontrando um incremento na rugosidade dos filmes devido à adição do óleo essencial, este comportamento foi atribuído à presença de gotas de óleo não emulsionadas que ficaram na superfície da matriz do filme. Atarés et al. (2010) adicionaram óleo essencial de canela e óleo essencial de gengibre a filmes de proteína isolada de soja, sendo que, a adição dos dois óleos na matriz reduz a rugosidade do filme, já que os óleos essenciais preencheram as irregularidades da superfície da matriz proteica após secagem, tornando o filme menos rugoso. Além disso, existiram diferenças em filmes com óleo essencial de canela e filmes com óleo essencial de gengibre, o óleo essencial de canela a diferentes concentrações, permaneceu um pouco mais integrado na matriz, caso contrário foi apresentado pelo óleo essencial de gengibre.

Figura 33 - Micrografias de AFM dos filmes ativos (Controles): C1 (a,b), C2 (c,d), C3 (e,f) e C4 (g,h).



Fonte: Própria autoria.

Figura 34 - Micrografias de AFM dos filmes ativos: F1 (a,b), F2 (c,d), F4 (e,f), F5 (g,h) e F6 (i,j).



Fonte: Própria autoria.

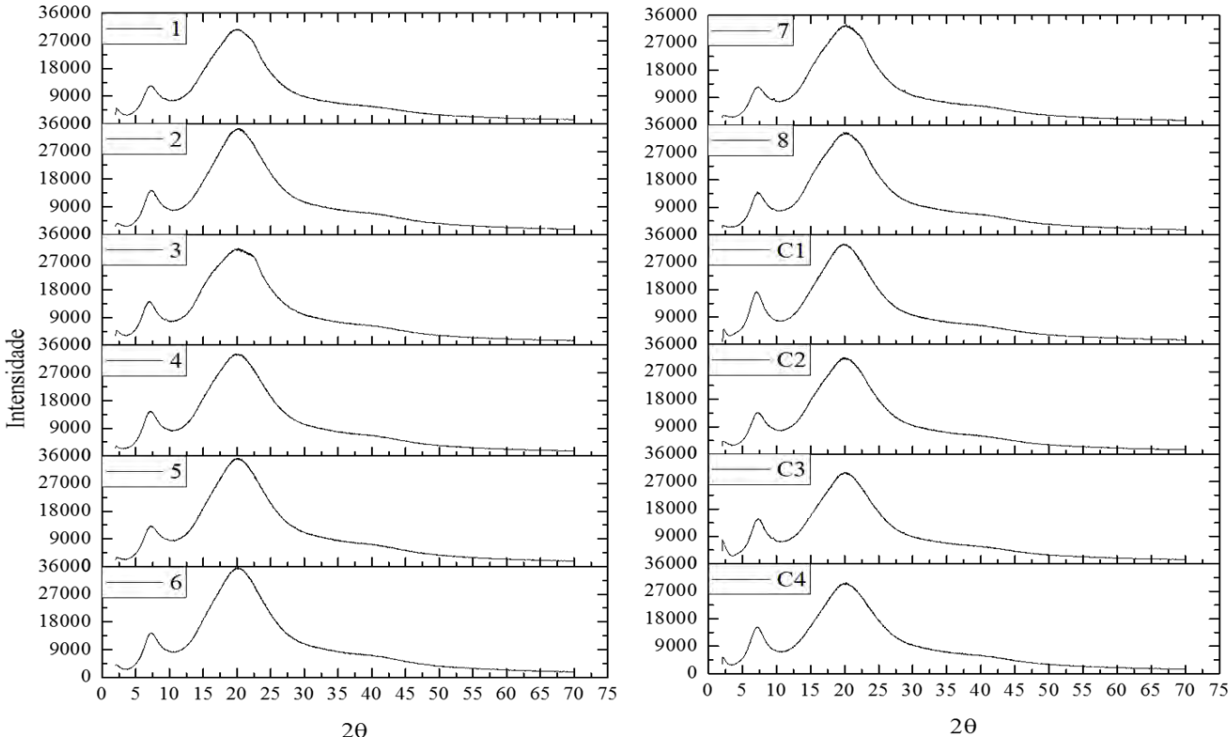
5.3.12 Cristalinidade:

Os difratogramas dos filmes ativos de gelatina adicionados com extrato de própolis vermelha e óleo essencial de cravo e manjericão e dos filmes controles estão apresentados na figura 35. Leves variações foram apresentadas nos filmes ativos, mas em geral, os perfis foram semelhantes ao filme de gelatina controle, observando-se dois picos característicos destes materiais. Um pico de difração em 2Θ = 7°, atribuído às estruturas cristalinas da triple hélice de gelatina e outro pico a 2Θ = 20°, características de uma fase amorfa (ALEXANDRE et al., 2016; PEREDA et al., 2011). Em geral, a adição de extrato etanólico de própolis vermelha e de óleos essências provocou leves modificações na estrutura da matriz de gelatina, o qual pode ser correlacionado com os espetros FTIR.

Resultados similares aos reportados nesta tese foram obtidos por Alexandre et al. (2016), em filmes de gelatina reforçados com montmorillonita com adição de óleo essencial de gengibre em diferentes concentrações. Os difratogramas apresentaram pequenas mudanças com a adição do óleo, mas, em geral, os perfis foram semelhantes ao filme controle de gelatina, exibindo um pico de difração em 2Θ = 7°, atribuído às estruturas cristalinas da triple hélice de gelatina e outro pico a 2Θ = 20°, características de uma fase amorfa.

Outros estudos feitos em filmes de gelatina com diferentes concentrações de glicerol reportaram que todos os difratogramas apresentaram um caráter amorfo, indicando não haver tendência à recristalização, provavelmente devido à alta estabilidade nos filmes, ou, possivelmente, devido ao aumento da umidade nos filmes, evitando qualquer tendência a formar regiões semi-cristalinas (BERGO; SOBRAL, 2007).

Figura 35 - Difratogramas dos filmes ativos e os controles C1, C2, C3 e C4.

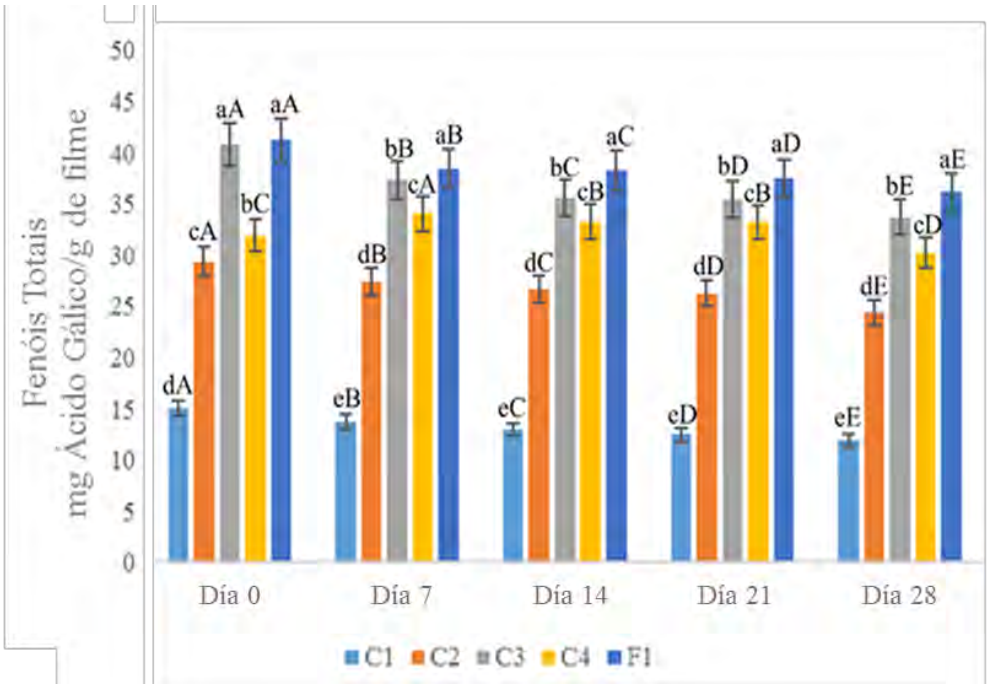


Fonte: Própria autoria.

5.4 Avaliação do efeito do tempo de armazenamento na estabilidade da atividade antioxidante e atividade antimicrobiana da matriz polimérica.

Foi avaliada a estabilidade dos filmes controle C1, C2, C3 e C4 e do filme ativo F1 (0,15% OE cravo + 0,4% OE manjericão) a ± 4 °C e 58% UR com avalições durante 28 dias. O filme F1 foi escolhido por apresentar a melhor capacidade antioxidante e atividade antimicrobiana de todos os tratamentos avaliados. Em relação ao conteúdo de fenóis totais (Figura 36), foram apresentadas diferenças estatísticas ($p<0,05$) entre os filmes em cada dia de avaliação (a,b) e cada filme ao longo do tempo (A,B). No dia 0, os filmes C3 e F1 apresentaram os maiores valores ($p>0,05$), seguido do filme C4 e C2 ($p<0,05$). Todos os filmes apresentaram diminuição ($p<0,05$) ao longo dos 28 dias de avaliação, sendo que o F1 apresentou o maior teor de fenóis ao fim da avaliação (36,14 ± 0,14 mgAG/g de filme), com um decrescimento do 12,3%. A maior estabilidade foi apresentada pelo filme C4 (5,2%).

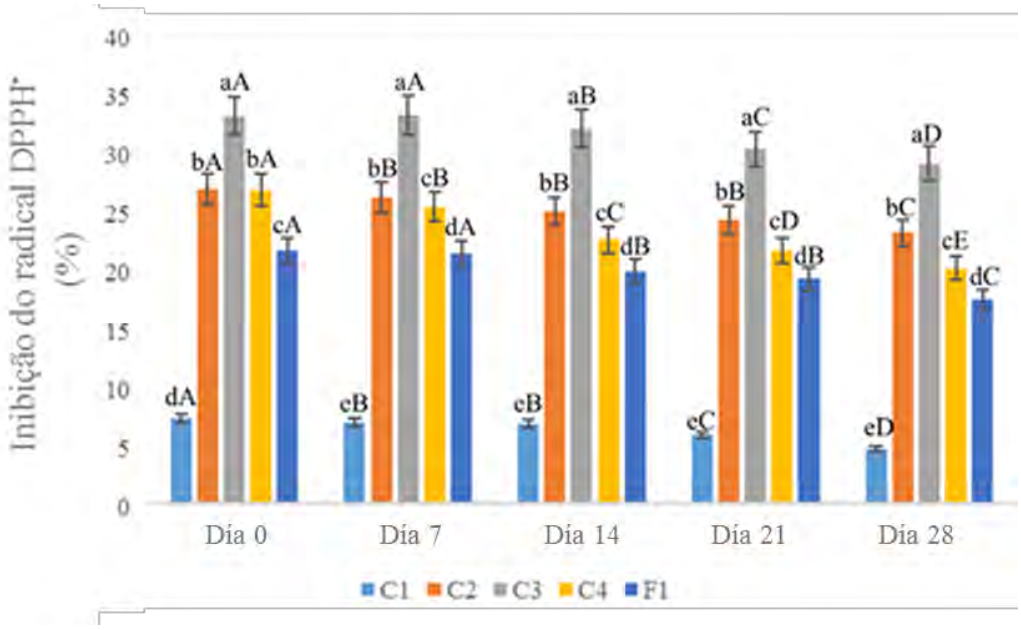
Figura 36 - Resultados do conteúdo de fenóis totais do filme ativo F1 e os controles C1, C2, C3 e C4 ao longo do tempo (28 dias).



Fonte: Própria autoria.
F1: gelatina + 0,8% EEP + 0,15% OE cravo + 0,40% OE manjericão; C1: gelatina; C2: gelatina + 0,8% EEP; C3: gelatina + 0,30% OE cravo; C4: gelatina + 0,80% OE manjericão
A,B letras maiúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença significativa do tratamento ao longo do tempo
a,b letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa para cada formulação de filme ativo

A atividade sequestrante dos filmes em relação ao radical DDPH$^{\bullet}$ (Figura 37) apresentaram diferenças estatísticas ($p<0,05$) entre os tratamentos e ao longo do tempo. O filme controle C3 apresentou a maior inibição durante o tempo de armazenamento, com um decrescimento de 12,3%, sendo que entre o dia 0 e o dia 7 não apresentou diferenças estatísticas ($p>0,05$). O filme controle com EEP (C2), teve uma leve diminuição entre o dia 0 e 7 ($p<0,05$), mantendo-se estável entre o dia 7 e 21 ($p>0,05$), apresentando um decrescimento de 14% durante os 28 dias de avaliação. O filme F1 apresentou a menor inibição em relação aos filmes com composto ativo, sendo que, entre o dia 0 e 7 não apresentou diferenças estatísticas ($P>0,05$), com um leve decrescimento o dia 14 e 21 ($p>0,05$) e uma diminuição total de 20% de inibição.

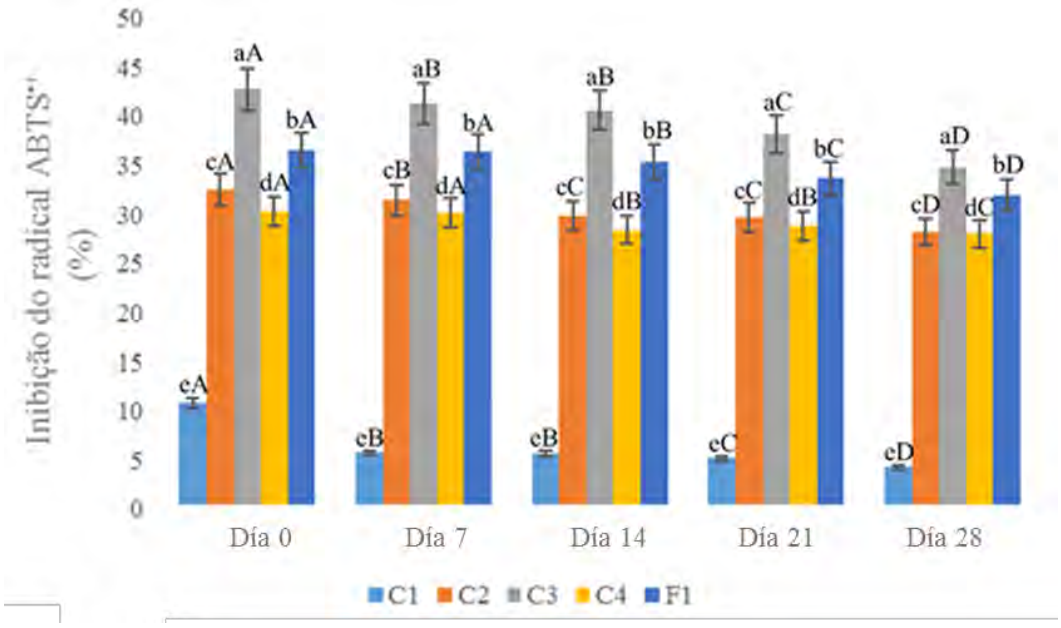
Figura 37 - Resultados de inibição do radical DPPH• do filme ativo F1 e os controles C1, C2, C3 e C4 ao longo do tempo (28 dias).



Fonte: Própria autoria.
F1: gelatina + 0,8% EEP + 0,15% OE cravo + 0,40% OE manjericão; C1: gelatina; C2: gelatina + 0,8% EEP; C3: gelatina + 0,30% OE cravo; C4: gelatina + 0,80% OE manjericão
A,B letras maiúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença significativa do tratamento ao longo do tempo
a,b letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa para cada formulação de filme ativo

Um comportamento similar entre o radical DDPH• e ABTS•+ foi observado ao longo do tempo. A inibição do radical ABTS•+ dos filmes controle C1, C2, C3 e C4 e o filme F1 está apresentado na figura 38. O filme C3 apresentou a maior atividade durante os 28 dias de avaliação, exibindo no dia 0 uma inibição de 42,4 ± 0,4% e no dia 28 de 34.43 ± 0.28%, com uma diminuição total de inibição de 18,7%. A filme F1 exibiu a segunda melhor capacidade sequestrante, com uma inibição inicial de 36,1 ± 0,5%, com uma diminuição da atividade de 12,5% durante o armazenamento. Os filmes C2 e C4 apresentaram uma atividade sequestrante do radical ABTS semelhante durante todo o tempo de armazenamento, embora apresentaram diferenças estatísticas ($p<0,05$).

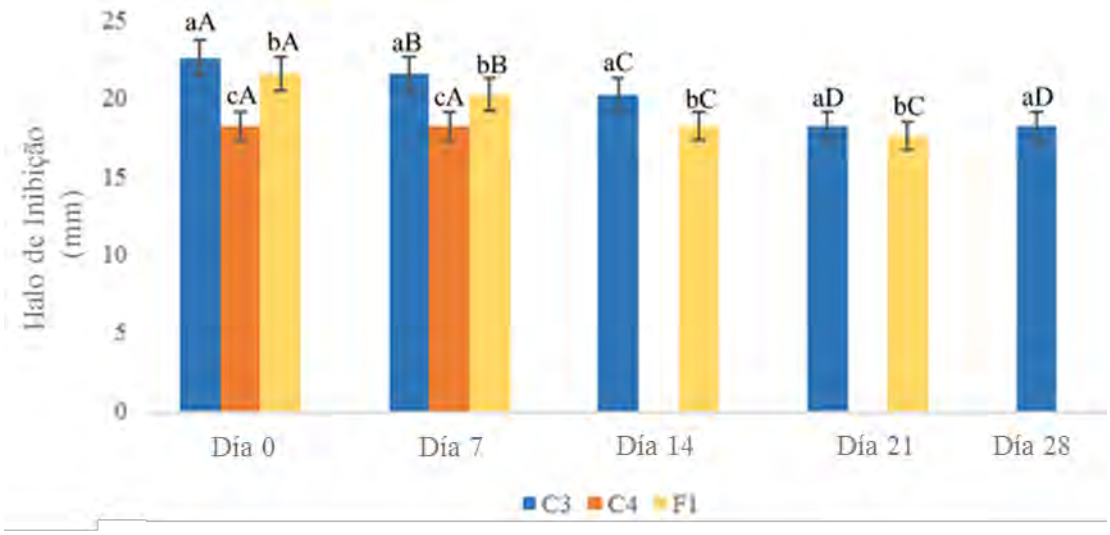
Figura 38 - Resultados de inibição do radical ABTS$^{\bullet+}$ do filme ativo F1 e os controles C1, C2, C3 e C4 ao longo do tempo (28 dias).



Fonte: Própria autoria.
F1: gelatina + 0,8% EEP + 0,15% OE cravo + 0,40% OE manjericão; C1: gelatina; C2: gelatina + 0,8% EEP; C3: gelatina + 0,30% OE cravo; C4: gelatina + 0,80% OE manjericão
A,B letras maiúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença significativa do tratamento ao longo do tempo
a,b letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa para cada formulação de filme ativo

A atividade antimicrobiana dos filmes ao longo de 4 semanas foi avaliada frente às bactérias *S. enteritidis* e *S. aureus.* As análises da atividade antimicrobiana frente à bactéria *S. enteritidis* estão apresentadas na figura 39. Os filmes C1 e C3 não apresentaram atividade frente a *S. enteritidis*, como foi reportado na seção 5.3.3. Os filmes C3 apresentou atividade ao longo dos 28 dias de avaliação, já para o F1 a atividade foi reportada até o dia 21 de avaliação, nos últimos 14 dias de armazenamento não foram encontradas diferenças estadísticas para cada filme ($p>0,05$); embora no início da avaliação, o filme C4 apresentou atividade antimicrobiana, no dia 14 da avaliação não foi reportado halo de inibição frente ao microrganismo.

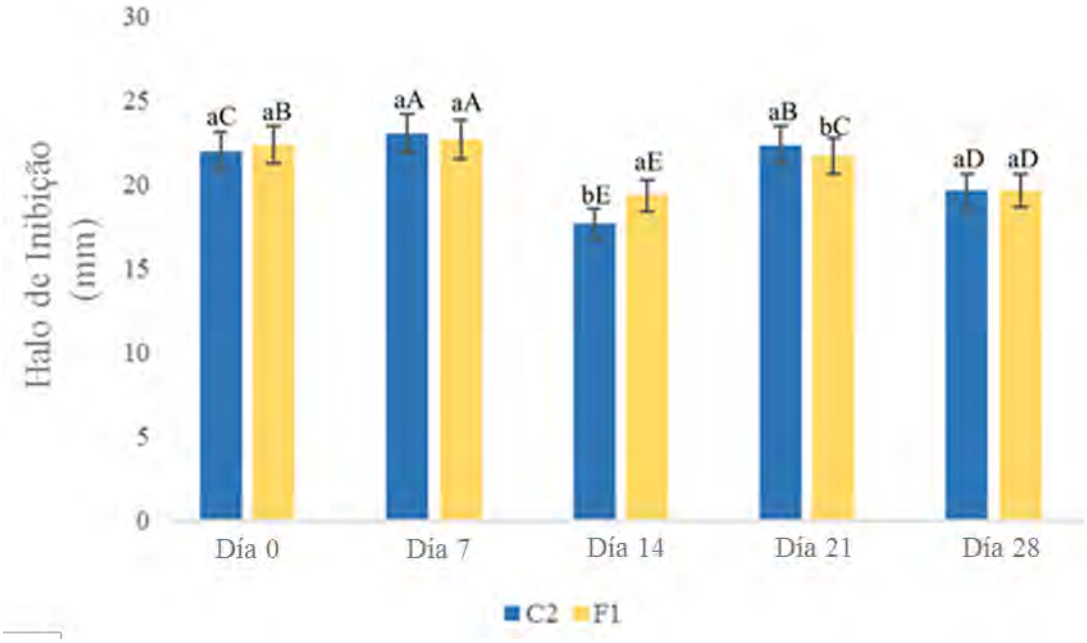
Figura 39 - Resultados atividade antimicrobiana do filme ativo F1 e os controles C3 e C4 frente a *Salmonella enteritidis* ao longo do tempo (28 dias).



Fonte: Própria autoria.
F1: gelatina + 0,8% EEP + 0,15% OE cravo + 0,40% OE manjericão; C1: gelatina; C2: gelatina + 0,8% EEP; C3: gelatina + 0,30% OE cravo; C4: gelatina + 0,80% OE manjericão
A,B letras maiúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença significativa do tratamento ao longo do tempo
a,b letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa para cada formulação de filme ativo

Os resultados da atividade antimicrobiana dos filmes contra *S. aureus* estão apresentados na figura 40. Somente os filmes com adição de extrato etanólico de própolis vermelha (C2 e F1) apresentaram atividade frente essa bactéria. Nos primeiros 14 dias de avaliação não houve diferenças estatísticas entre os filmes ($p>0,05$). No dia 14, os filmes apresentaram uma diminuição da atividade ($p<0,05$) de 23% para C2 e 15% para F1. Entre os dias 14 e 21 se percebe um amento da atividade antimicrobiana em relação ao dia 14. Nos últimos 7 dias de avaliação não se apresentaram diferenças estadísticas entre os filmes, reportando uma redução da inibição total de 10,5% e 11,7% para C2 e F1 respectivamente.

Figura 40 - Resultados atividade antimicrobiana do filme ativo F1 e os controles C1, C2, C3 e C4 frente a *Staphylococcus aureus* ao longo do tempo (28 dias).



Fonte: Própria autoria.
F1: gelatina + 0,8% EEP + 0,15% OE cravo + 0,40% OE manjericão; C1: gelatina; C2: gelatina + 0,8% EEP; C3: gelatina + 0,30% OE cravo; C4: gelatina + 0,80% OE manjericão
A,B letras maiúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença significativa do tratamento ao longo do tempo
a,b letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa para cada formulação de filme ativo

Poucos trabalhos têm avaliado a estabilidade de filmes ativos ao longo do tempo. Bodini et al. (2013) desenvolveram filmes de gelatina adicionados com diferentes concentrações de extrato etanólico de própolis verde e foram armazenados por 177 dias entre 22-25 °C e 50-58% UR. Em relação ao teor de fenóis totais, nas concentrações mais altas do EEP (40 e 200 g de EPE / 100 g de gelatina), embora houvesse algumas variações no período analisado, a matriz polimérica foi capaz de preservar polifenóis durante o armazenamento. Da mesma forma, os filmes com maiores concentrações de EEP mantiveram sua atividade antimicrobiana frente a *S. aureus* durante o período de estudo, indicando a relação entre o teor e estabilidade de polifenóis nos filmes. Estes resultados ajudam a definir a vida útil dos filmes como também o seu possível uso prático.

Chang-Bravo; López-Córdoba; Martino (2014) avaliaram a estabilidade de filmes de carragena e amido de milho adicionados com extrato etanólico de própolis ou extrato de erva-mate a 75% UR e 23°C durante 6 meses, e observaram que os filmes com extrato de erva-mate não mostraram alterações significativas no teor polifenóis ao longo do armazenamento; contudo, a

atividade de inibição do radical DPPH$^{\bullet}$ aumentou cerca de 50%. Os filmes de própolis mostraram um forte aumento no teor de polifenóis e na atividade antioxidante após o armazenamento. Esse comportamento pode ser atribuído a possíveis modificações no perfil qualitativo dos compostos fenólicos presentes nos extratos, devido à forte tendência dos polifenóis a sofrer reações de polimerização, pelo que os oligômeros resultantes possuem áreas maiores disponíveis para deslocamento de carga e, portanto, aumentam a atividade antioxidante.

5.5 Aplicação dos filmes ativos em carne bovina moída (Contrafilé) em forma de hambúrguer.

Foram elaborados hambúrgueres de carne bovina moída (30 g) e recobertos os dois lados com os filmes controle C2 (gelatina + 0,8% EEP), C3 (gelatina + 0,3% OE cravo) e C4 (gelatina + 0,8% OE manjericão) e o filme ativo F1 (gelatina + 0,8% EEE + 0,15% OE cravo + 0,4% OE manjericão), deixando uma amostra controle (sem filme), dispostos em placas de petri e acondicionados em exibidor a 4 ± 2 °C. Foram feitas avaliações dos parâmetros cromáticos, índice de peróxidos e analise microbiológico (*S. aureus*, coliformes totais, aeróbios mesofilos) no dia 0, 3, 7 e 10 da avaliação.

5.5.1 Parâmetros cromáticos na superfície do produto:

Foram avaliadas as mudanças nos parâmetros cromáticos L*, a* e b* dos hambúrgueres de carne bovina moída. Todos os tratamentos provocaram diferenças estatísticas ao longo do tempo de avaliação ($p<0,05$) para o parâmetro L*. A luminancia (L*) da amostra controle aumentou ao longo do tempo, passando de 37,5 a 41,2, embora os tratamentos apresentaram diminuição neste parâmetro ($p<0,05$), sendo mais evidente no filme controle com adição de extrato etanólico de própolis vermelha. O tratamento F1 teve a menor mudança da luminancia ao longo dos 10 dias de acondicionamento (Tabela 29).

Tabela 29 - Valores médios dos parâmetros cromáticos L*, a* e b* na superfície da carne bovina moída (Contrafilé) em forma de hambúrguer recoberta com o filme ativo F1, os controles C2, C3 e C4 durante 10 dias de armazenagem

Parâmetro	Dia	Tratamento				
		Controle	C2	C3	C4	F1
L*	0	$37,5^{D}$	$37,5^{A}$	$37,5^{B}$	$37,5^{B}$	$37,5^{B}$
	3	$39,5^{dB}$	$37,3^{eB}$	$45,2^{bA}$	$44,8^{cA}$	$45,2^{aA}$
	7	$38,5^{aC}$	$28,8^{eC}$	$34,3^{cC}$	$33,1^{dC}$	$35,5^{bD}$
	10	$41,2^{aA}$	$28,1^{eD}$	$34,1^{cD}$	$31,3^{dD}$	$37,0^{bC}$
a*	0	$18,6^{A}$	$18,6^{A}$	$18,6^{A}$	$18,6^{A}$	$18,6^{A}$
	3	$15,8^{aB}$	$14,4^{bB}$	$13,4^{cB}$	$12,0^{dB}$	$10,3^{eB}$
	7	$14,5^{aC}$	$8,3^{dD}$	$13,1^{bC}$	$8,6^{cD}$	$6,9^{eD}$
	10	$13,3^{aD}$	$9,4^{eC}$	$8,2^{dD}$	$11,5^{bC}$	$9,4^{cC}$
b*	0	$15,8^{A}$	$15,8^{A}$	$15,8^{A}$	$15,8^{A}$	$15,8^{A}$
	3	$15,5^{aB}$	$11,2^{eB}$	$14,6^{bB}$	$13,9^{cB}$	$13,3^{dB}$
	7	$14,4^{aC}$	$8,7^{eC}$	$12,2^{bC}$	$11,9^{cC}$	$9,4^{dC}$
	10	$14,1^{aD}$	$6,5^{eD}$	$10,9^{cD}$	$11,6^{bD}$	$9,2^{dD}$

Fonte: Própria autoria
F1: gelatina + 0,8% EEP + 0,15% OE cravo + 0,40% OE manjericão; C2: gelatina + 0,8% EEP; C3: gelatina + 0,30% OE cravo; C4: gelatina + 0,80% OE manjericão
A,B letras maiúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença significativa do tratamento ao longo do tempo
a,b letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa para cada formulação de filme ativo

O parâmetro a* (vermelho - verde) apresentou diminuição em todos os tratamentos ($p<0,05$), com menor mudança no controle (sem filme), variando de 18,6 a 13,3, seguido do filme controle com adição de óleo essencial de manjericão (Tabela 29). Ao sétimo dia de avaliação houve um decrescimento importante do parâmetro nos hambúrgueres acondicionados com os tratamentos C2, C4 e F1, com um leve aumento no dia 10. Os filmes com incorporação de extrato etanólico de própolis vermelha apresentaram decrescimento no parâmetro sem apresentar diferenças estatísticas ($p>0,05$) no dia 10 de avaliação. O menor valor ao final do acondicionamento foi apresentado pelo filme controle com adição de óleo essencial de cravo (8,2).

Em relação ao parâmetro b* (amarelo – azul), para o hambúrguer controle (sem filme) foi apresentado o mesmo comportamento que no parâmetro a*, com uma redução entre 15,8 e 14,1

(Tabela 29). Em todos os tratamentos se apresentou uma diminuição do parâmetro ao longo dos 10 dias de avaliação, sendo que, o maior decrescimento foi apresentado pelos tratamentos com adição de extrato etanólico de própolis vermelha.

Aplicação de filme de quitosana com óleo essencial de cravo em salsichas de porco demostraram um leve incremento no parâmetro L* das salsichas para o controle, filme de quitosana e filme de quitosana com óleo essencial. Estes resultados estão relacionados com o incremento dos valores de índice de peróxidos e TBARS reportados. Embora apresentando diferenças estatísticas, o valor de L* não foi significativamente alterado durante até 20 dias de armazenamento. Além disso, todos os tratamentos apresentaram uma diminuição nos valores dos parâmetros a* e b*, que poderia estar associada a alterações oxidativas relacionadas com aumentos de IP (LEKJING, 2016).

Hambúrgueres de carne bovina foram acondicionados em soluções de quitosana, extrato de alecrim e/ou α tocoferol e congeladas a -18°C por 180 dias, observando as mudanças de cor na superfície do produto. Observou-se uma tendência decrescente em relação aos valores a* (indicativos de cor vermelha), croma (intensidade de cor) e b* (cor amarela), atribuídos à oxidação gradual da mioglobina e acumulação de metamioglobina com o tempo (GEORGANTELIS et al., 2007a). O mesmo comportamento decrescente nos parâmetros a* e b* foi obtido nos hambúrgueres de carne bovina apresentados nesta tese.

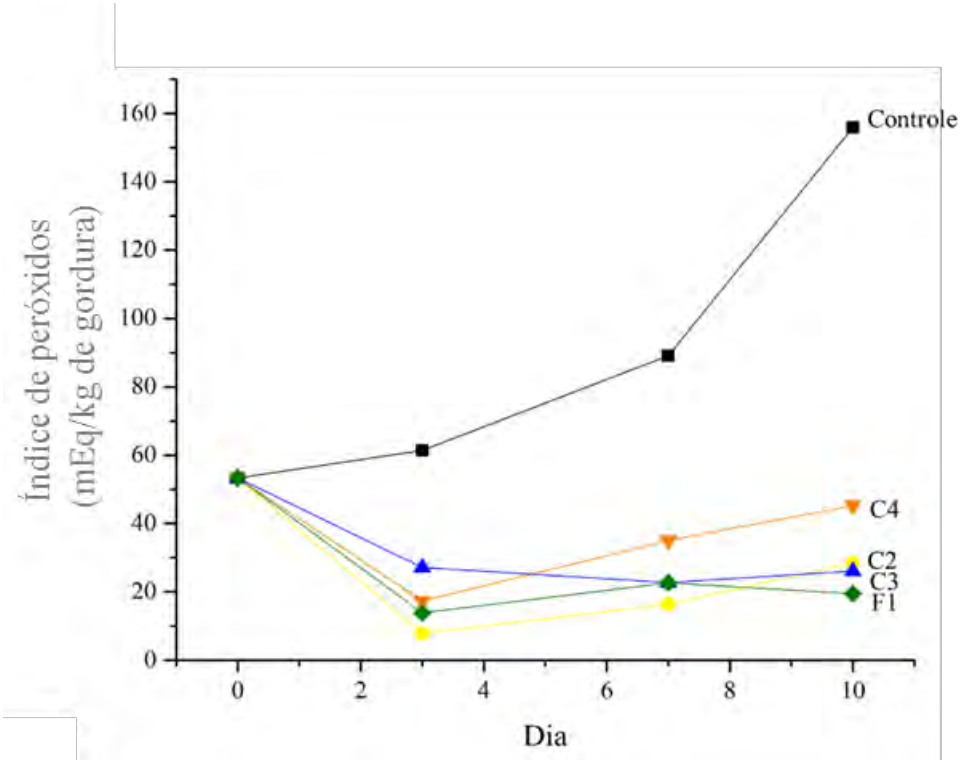
5.5.2 Determinação do índice de peróxidos (IP):

A oxidação lipídica do produto embalado pode ser vista como um índice para a qualidade dos alimentos. O índice de peróxidos é empregado para avaliar os produtos primários de oxidação lipídica de produtos, refletindo o progresso oxidativo dos alimentos que contêm lipídeos (LI et al., 2015).

Todos os filmes apresentaram proteção contra oxidação lipídica dos hambúrgueres de carne moída bovina (Figura 41). Durante o armazenamento a 4 ± 2°C, os valores de índice de peróxidos (IP) do hambúrguer controle (sem filme) apresentou um incremento entre 53 a 156 mEq/kg de lipídeo. Todos os tratamentos apresentaram uma diminuição do IP no dia 3 em relação ao controle, após foi apresentado um incremento nos valores para os hambúrgueres acondicionados nos tratamentos C2, C4 e F1 até o dia 10 de acondicionamento, sendo inferiores aos reportados pelo

controle. Por outra parte, para o hambúrguer protegido com o tratamento C3 foi observado o menor IP no dia 7 de acondicionamento. Em geral, ao dia 10, o tratamento F1 apresentou a melhor proteção com um valor de IP de 19 mEq/kg de lipídeo.

Figura 41 - Resultados do índice de peróxidos (IP) da carne bovina moída (Contrafilé) em forma de hambúrguer recoberta com o filme ativo F1, os controles C2, C3 e C4 durante 10 dias de armazenagem.



Fonte: Própria autoria.
F1: gelatina + 0,8% EEP + 0,15% OE cravo + 0,40% OE manjericão; C2: gelatina + 0,8% EEP; C3: gelatina + 0,30% OE cravo; C4: gelatina + 0,80% OE manjericão
A,B letras maiúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença significativa do tratamento ao longo do tempo
a,b letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa para cada formulação de filme ativo

Lekjing (2016) avaliou a oxidação lipídica de salsichas de porco por 25 dias a 4 °C recobertas com filmes de quitosana e óleo essencial de cravo; no dia 0 apresentaram valores de IP inferiores aos reportados nesta tese (1,57 a 2,18 meq/kg de lipídeo), com redução dos valores no dia 5 nas amostras com filmes de quitosana e óleo essencial. Após 25 dias de avaliação, o filme com óleo essencial de cravo apresentou o maior poder antioxidante nas salsichas de porco.

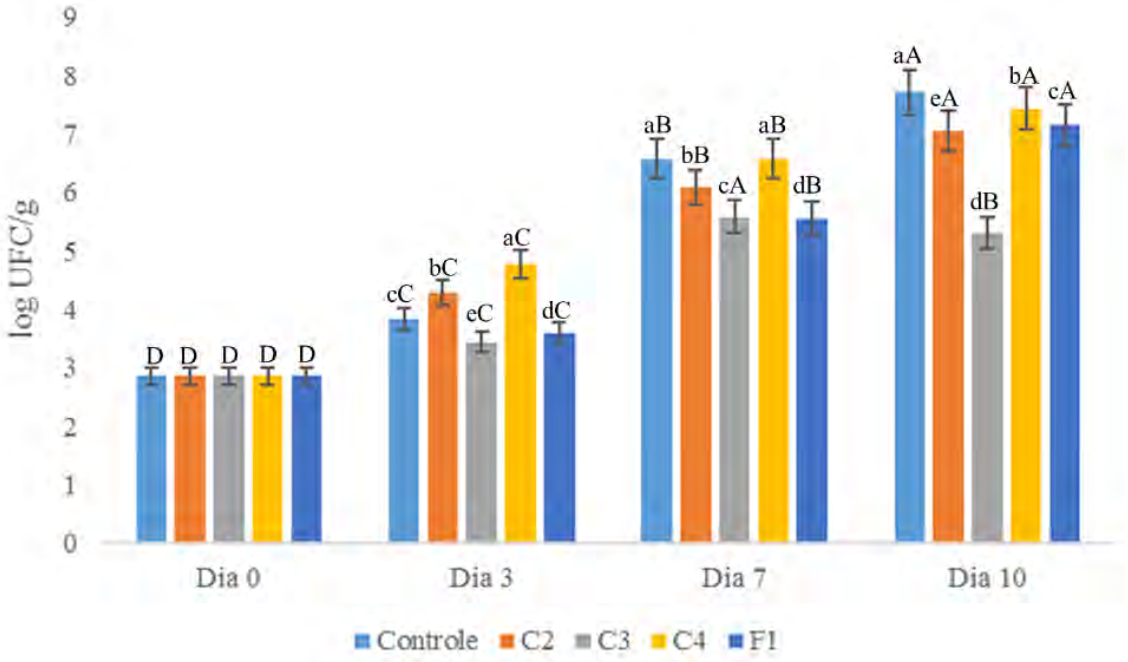
Avaliação da qualidade de camarões conservados com soluções filmogênicas de gelatina adicionadas com óleo essencial de folha de laranja foi feita por Alparslan et al. (2016). As amostras foram armazenadas por 14 dias, sendo que, após o dia 6, a amostra controle e amostra com filme de gelatina apresentaram um incremento significativo do IP. O filme de gelatina com óleo essencial de laranja manteve os baixos valores de IP com um leve crescimento durante os 14 dias. O efeito protetor principal é provavelmente devido ao uso da gelatina como uma barreira do oxigênio e o efeito antioxidante do óleo essencial da folha de laranja.

Estudos realizados por Georgantelis et al. (2007a,b) em hambúrgueres de carne bovina e salsichas de porco, respectivamente, acondicionadas em solução de quitosana, extrato de alecrim e/ou α tocoferol, demostraram que o uso de produtos com atividade antioxidante comprovada como extratos vegetais, retardaram a oxidação lipídica de produtos cárneos, sendo mais efetiva em combinação, neste caso com polissacarídeo que adicionados diretamente no alimento.

5.5.3 Análise microbiológica:

Foi avaliada a atividade antimicrobiana dos filmes controle C2, C3 e C4 e do filme ativo F1 frente coliformes totais, *S. aureus* e aeróbios mesofilos em carne bovina moída acondicionada a 4 ± 2 °C. Os resultados da atividade antimicrobiana dos filmes contra coliformes totais estão apresentados na figura 42. No dia 3, somente os filmes C3 e F1 apresentaram valores inferiores aos reportados pelo controle (sem filme); para o dia 7, houve um incremento significativo na contagem nos hambúrgueres, sendo maior para o controle e o C4 ($p>0,05$), os demais tratamentos apresentaram valores inferiores ($p<0,05$). Ao final do acondicionamento (Dia 10), o filme controle C3 (gelatina + 0,3% OE cravo) apresentou a maior eficácia antimicrobiana.

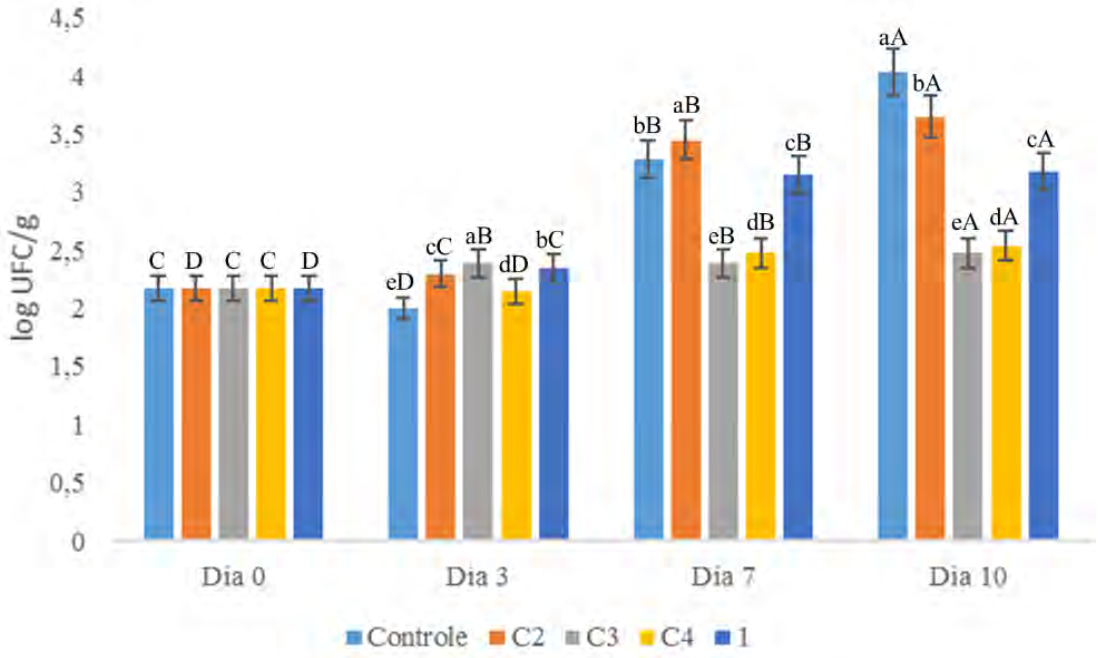
Figura 42 - Efeito do filme ativo F1 e os Controles C2, C3 e C4 em carne bovina moída (Contrafilé) em forma de hambúrguer acondicionada a 4 ± 2 °C contra coliformes totais.



Fonte: Própria autoria.
F1: gelatina + 0,8% EEP + 0,15% OE cravo + 0,40% OE manjericão; C2: gelatina + 0,8% EEP; C3: gelatina + 0,30% OE cravo; C4: gelatina + 0,80% OE manjericão
A,B letras maiúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença significativa do tratamento ao longo do tempo
a,b letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa para cada formulação de filme ativo

Em relação à atividade frente a *S. aureus* (Figura 43), do dia 0 ao dia 3 houve um leve incremento na contagem, sendo a menor apresentada pelo controle (sem filme). No dia 7 os filmes C3 e C4 apresentaram a maior atividade antimicrobiana, sendo que entre o dia 3 e 7 não houve diferenças estatísticas para o C3. Ao final do acondicionamento, houve um incremento para o controle (sem filme) entre 2,17 a 4,03 log UFC/g, sendo que a maior atividade foi apresentada pelo filme C3 (2,48 log UFC/g) seguido do filme C4 (2,54 log UFC/g).

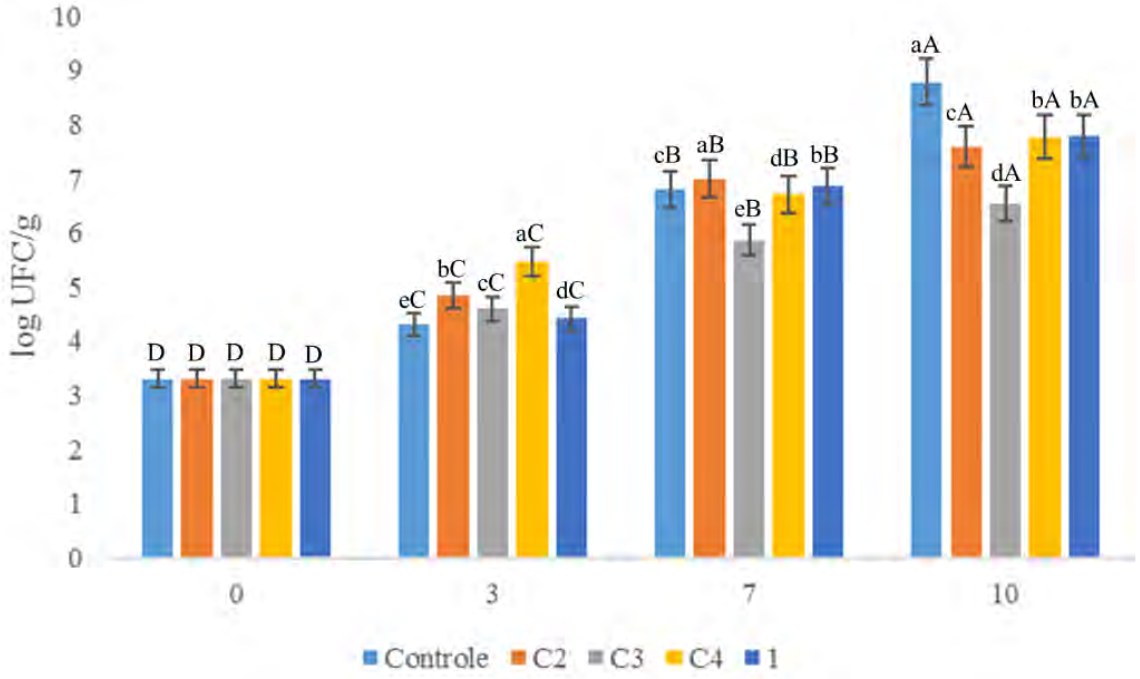
Figura 43 - Efeito do filme ativo F1 e os Controles C2, C3 e C4 em carne bovina moída (Contrafilé) em forma de hambúrguer acondicionada a 4 ± 2 °C contra *S. aureus*.



Fonte: Própria autoria.
F1: gelatina + 0,8% EEP + 0,15% OE cravo + 0,40% OE manjericão; C2: gelatina + 0,8% EEP; C3: gelatina + 0,30% OE cravo; C4: gelatina + 0,80% OE manjericão
A,B letras maiúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença significativa do tratamento ao longo do tempo
a,b letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa para cada formulação de filme ativo

A menor atividade antimicrobiana dos filmes como embalagem de carne moída foi apresentada para aeróbios mesofilos (Figura 44). Onde, ao dia 3 de acondicionamento houve um incremento na contagem, sendo maior para todos os tratamentos em relação ao controle (sem filme). No dia 7, a maior atividade foi para o filme C3 (5,87 log UFC/g); o F1 apresentou uma leve diminuição na contagem em relação ao controle. Ao final da avaliação (dia 10), a maior atividade foi apresentada pelo tratamento C3 (6,54 log UFC/g), seguido do C2. Os tratamentos C4 e F1 não apresentaram diferenças estatísticas ($p>0,05$). O controle teve uma contagem final de 8,78 log UFC/g.

Figura 44 - Efeito do filme ativo F1 e os Controles C2, C3 e C4 em carne bovina moída (Contrafilé) em forma de hambúrguer acondicionada a 4 ± 2 °C contra aeróbios mesófilos.



Fonte: Própria autoria.
F1: gelatina + 0,8% EEP + 0,15% OE cravo + 0,40% OE manjericão; C2: gelatina + 0,8% EEP; C3: gelatina + 0,30% OE cravo; C4: gelatina + 0,80% OE manjericão
A,B letras maiúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença significativa do tratamento ao longo do tempo
a,b letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa para cada formulação de filme ativo

Fernández-Pan,; Carrión-Granda e Maté (2014) recobriram files de frango com soluções filmogênicas de isolado proteico de soro de leite com diferentes concentrações de óleo essencial de orégano ou óleo essencial de cravo. Esses autores observaram que a atividade antimicrobiana das soluções frente a diversos microrganismos foi influenciada pelo tipo e concentração de óleo essencial incorporado, sensibilidade ao microrganismo e tempo de armazenamento da amostra. Em geral a solução contendo óleo essencial de orégano mostrou uma maior atividade antimicrobiana frente a aeróbios mesófilos e enterobactérias que as soluções com óleo essencial de cravo, apresentando diminuição da contagem bacteriana no dia 3 de tratamento para as soluções com maiores conteúdos de óleo essencial.

Outros estudos com diferentes macromoléculas e óleos essências como proteção de produtos cárneos têm sido desenvolvidos. Gómez-Estaca et al. (2010) revestiram files de peixe

com filmes de gelatina e quitosana adicionados com óleo essencial de cravo por 11 dias a 2 ± 1 °C. Foi avaliada a atividade antimicrobiana dos filmes frente a 6 microrganismos, encontrando que os filmes de gelatina-quitosana e óleo essencial de cravo reduz drasticamente o crescimento de microrganismos, principalmente em bactérias gram-negativas, e especialmente enterobactérias, enquanto as bactérias acido láticas, permaneceram praticamente constantes durante grande parte do período de armazenamento. Consequentemente, os filmes que incorporam óleo essencial de cravo asseguraram uma vida útil prolongada para os peixes congelados.

Muppalla et al. (2014) avaliaram a atividade antimicrobiana de filmes de celulose e poli (vinil álcool) com óleo essencial de cravo em carne de frango moída frente as bactérias *S. aureus* e *B. cereus* durante 16 dias. A alta concentração do óleo essencial no filme (3%) eliminou completamente a bactéria *S. aureus* ao sétimo dia de armazenamento. Filmes de poli (ácido lático) adicionados com óleo essencial de orégano foram usados para preservar truta arco-íris durante 16 dias. Foi avaliada a contagem total viável, contagem psicrotrófica, bactérias ácido-lácticas e enterobacterias. A aplicação dos filmes com óleo essencial de orégano na truta arco-íris atrasou o crescimento de microrganismos; sendo maior a atividade frente as bactérias ácido-lácticas e enterobacterias; esta atividade permaneceu durante todo o período estudado e contribuiu para estender a vida de prateleira da truta refrigerada (JAVIDI; HOSSEINI; REZAEI, 2016).

6 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos dos diferentes tratamentos e solventes para a extração da própolis vermelha permitem concluir que o tratamento a 25 °C por 48 horas usando etanol ao 96% produziu um extrato com maior teor de fenóis totais e flavonoides, proporcionando maior potencial antimicrobiano e antioxidante do EEP. Além disso, dos três óleos considerados inicialmente, só foram adicionados no filme de gelatina o óleo essencial de cravo e óleo essencial de manjericão, por apresentarem atividade antimicrobiana e capacidade antioxidante maior que o óleo essencial de hortelã.

A adição de EEP e óleos essenciais na matriz de gelatina proporcionou um aumento no conteúdo de fenóis totais em relação aos filmes controles, embora com uma atividade sequestrante do radical $DPPH^{\bullet}$ e $ABTS^{\bullet+}$ inferior ao filme controle com óleo essencial de cravo.

A espessura dos filmes e as propriedades mecânicas, foram alteradas com a adição de óleos essenciais em diferentes proporções. A solubilidade e permeabilidade ao vapor de agua dos filmes diminuiu com a adição de EEP e óleos essenciais. Outros parâmetros como propriedades térmicas, cristalinidade e as análises espectrofotométricas de infravermelho com transformada de Fourier apresentaram discretas modificações com a adição dos compostos ativos.

A adição do extrato etanólico de própolis vermelha influenciou diretamente as propriedades óticas e barreira à luz UV/visível, conferindo uma coloração vermelha nos filmes, aumentando a proteção contra a luz, sugerindo uma melhor proteção contra a oxidação lipídica.

A estabilidade dos filmes controles e o filme ativo F1 (0,15% OE cravo + 0,4% OE manjericão) em relação ao teor de fenóis, capacidade antioxidante e atividade antimicrobiana frente a *S. aureus* e S. *enteritidis* diminuiu ao longo das 4 semanas de avaliação, sendo que o controle C3 e o filme ativo F1 apresentaram o comportamento mais estável.

Em relação à atividade microbiológica dos filmes em hambúrgueres de carne bovina moída, no geral, não foram tão eficazes contra todas as bactérias estudadas durante o armazenamento a 4 ± 2 °C. Os filmes C2 e C3 protegeram a carne moída somente contra *Staphylococcus aureus*. Além disso, foi observado uma diminuição no índice de peróxidos ao longo dos 10 dias de avaliação comparados com o controle, sendo que, a maior proteção lipídica foi apresentada pelo filme F1,

seguido do controle C3 e C2, o que indica que além do teor de fenóis presentes no EEP, a coloração vermelha protegeu o hambúrguer da oxidação lipídica.

Dessa forma, pode-se concluir que a adição de extrato etanólico de própolis vermelha e óleos essenciais melhorou algumas propriedades físicas, além de conferir atividade antimicrobiana (*S. aureus*) e antioxidante aos filmes de gelatina que podem ser aplicados na conservação de alimentos de baixa ou intermediária umidade e susceptíveis à oxidação lipídica.

REFERÊNCIAS

AGUILAR-MÉNDEZ, M. A. et al. Gelatine–starch films: physicochemical properties and their application in extending the post-harvest shelf life of avocado (*Persea americana*). **Journal of the Science of Food and Agriculture**, West Sussex, United Kingdom, v. 88, n. 2, p. 185–193, Jan. 2008.

AHMAD, M. et al. Physico-mechanical and antimicrobial properties of gelatin film from the skin of unicorn leatherjacket incorporated with essential oils. **Food Hydrocolloids**, Amsterdam, Netherlands, v. 28, n. 1, p. 189–199, Jul. 2012.

AHN, J.-H. et al. Antioxidant effect of natural plant extracts on the microencapsulated high oleic sunflower oil. **Journal of Food Engineering**, London, United Kingdom, v. 84, n. 2, p. 327–334, Jan. 2008.

ALBOOFETILEH, M. et al. Antimicrobial activity of alginate/clay nanocomposite films enriched with essential oils against three common foodborne pathogens. **Food Control**, Oxford, United Kingdom, v. 36, n. 1, p. 1–7, Fev. 2014.

ALENCAR, S. M. et al. Chemical composition and biological activity of a new type of Brazilian propolis: red propolis. **Journal of Ethnopharmacology**, Shannon, Clare Ireland, v. 113, n. 2, p. 278-283, Set. 2007.

ALEXANDRE, E. M. C. et al. Gelatin-based films reinforced with montmorillonite and activated with nanoemulsion of ginger essential oil for food packaging applications. **Food Packaging and Shelf Life**, Amsterdam, Netherlands, v. 10, p. 87–96, Dez. 2016.

ALPARSLAN, Y. et al. Quality assessment of shrimps preserved with orange leaf essential oil incorporated gelatin. **LWT - Food Science and Technology**, London, United Kingdom, v. 72, p. 457–466, Out. 2016.

ANDREUCCETTI, C. et al. Functional properties of gelatin-based films containing Yucca schidigera extract produced via casting, extrusion and blown extrusion processes: A preliminary study. **Journal of Food Engineering**, London, United Kingdom, v. 113, n. 1, p. 33–40, Nov. 2012.

ANKER, M. et al. Improved water vapor barrier of whey protein films by addition of an acetylated monoglyceride. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, Amsterdam, Netherlands, v. 3, n. 1, p. 81–92, Abr. 2002.

APPENDINI, P.; HOTCHKISS, J. H. Review of antimicrobial food packaging. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, Amsterdam, Netherlands, v. 3, n. 2, p. 113–126, Jun. 2002.

ASSIS, O.; PESSOA, J. Preparation of thin films of chitosan for use as edible coatings to inhibit fungal growth on sliced fruits. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, Brasil, v. 7, n. 1, p. 17–22, 2004.

AMERICAN SOCIETY TESTING AND MATERIALS - ASTM. **Standard test methods for tensile properties of thin plastic sheeting**. Standar designation: D882 Philadelphia, United States, 1985. Annual books of American standards testing methods.

_____. **Standard test methods for water transmision of materials**. Standard designation.

Philadelphia, United States, 1995. **Anual book of ASTM standards.**

ATARÉS, L. et al. Characterization of SPI-based edible films incorporated with cinnamon or ginger essential oils. **Journal of Food Engineering**, London, United Kingdom, v. 99, n. 3, p. 384–391, Ago. 2010.

ATARÉS, L.; BONILLA, J.; CHIRALT, A. Characterization of sodium caseinate-based edible films incorporated with cinnamon or ginger essential oils. **Journal of Food Engineering**, London, United Kingdom, v. 100, n. 4, p. 678–687, Out. 2010.

ATARÉS, L.; CHIRALT, A. Essential oils as additives in biodegradable films and coatings for active food packaging. **Trends in Food Science & Technology**, Oxford, United Kingdom, v. 48, p. 51–62, Fev. 2016.

BAJPAI, V. K.; BAEK, K.-H.; KANG, S. C. Control of Salmonella in foods by using essential oils: A review. **Food Research International**, Oxford, United Kingdom, v. 45, n. 2, p. 722–734, Mar. 2012.

BAKKALI, F. et al. Biological effects of essential oils--a review. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, United Kingdom, v. 46, n. 2, p. 446–475, Fev. 2008.

BANKOVA, V. et al. Chemical composition of European propolis: expected and unexpected results. **Zeitschrift für Naturforschung. C, Journal of Biosciences**, Berlin, Germany, v. 57, n. 5-6, p. 530–533, 2002.

BANKOVA, V.; MARCUCCI, M. C. Standardization of propolis: present status and perspectives. **Bee World**, Oxfordshire, United Kingdom, v. 81, n. 4, p. 182–188, 2000.

BERGO, P.; SOBRAL, P. J. A. Effects of plasticizer on physical properties of pigskin gelatin films. **Food Hydrocolloids**, Amsterdam, Netherlands, v. 21, n. 8, p. 1285–1289, Dez. 2007.

BISPO JUNIOR, W. et al. Atividade antimicrobiana de frações da própolis vermelha de Alagoas, Brasil. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, Londrina, Brasil, v. 33, n. 1, p. 3–10, Jul. 2012.

BITENCOURT, C. M. et al. Gelatin-based films additivated with curcuma ethanol extract: Antioxidant activity and physical properties of films. **Food Hydrocolloids**, Amsterdam, Netherlands, v. 40, p. 145–152, Out. 2014.

BODINI, R. **Desenvolvimento de materiais poliméricos bioativos à base de gelatina e própolis**. 2011. 88 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2011.

BODINI, R. B. et al. Properties of gelatin-based films with added ethanol–propolis extract. **LWT - Food Science and Technology**, London, United Kingdom, v. 51, n. 1, p. 104–110, Abr. 2013.

BONILLA, J. et al. Edible films and coatings to prevent the detrimental effect of oxygen on food quality : Possibilities and limitations. **Journal of Food Engineering**, London, United Kingdom, v. 110, n. 2, p. 208–213, 2012.

BONILLA, J. et al. Physicochemical properties of chitosan-essential oils filmforming dispersions. Effect of homogenization treatments. **Procedia Food Science**, Amsterdam, Netherlands, v. 1, n. Icef 11, p. 44–49, 2011a.

BONILLA, J. et al. Physical properties of chitosan-basil essential oil edible films as affected by oil content and homogenization conditions. **Procedia Food Science**, Amsterdam, Netherlands, v. 1, p. 50–56, 2011b.

BOSQUEZ-MOLINA, E. et al. Inhibitory effect of essential oils against *Colletotrichum gloeosporioides* and *Rhizopus stolonifer* in stored papaya fruit and their possible application in coatings. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, Netherlands v. 57, n. 2, p. 132–137, Ago. 2010.

BÓSQUEZ-MOLINA, E.; BAUTISTA-BAÑOS, S.; MORALES-LÓPEZ, J. Aceites esenciales: bioconservadores con alto potencial en la industria alimentaria. **Industria Alimentaria**, Mexico City, Mexico, v. 31, n. 1, p. 12–24, 2009.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT - Food Science and Technology**, London, United Kingdom, v. 28, n. 1, p. 25–30, Jan. 1995.

BRENES, A.; ROURA, E. Essential oils in poultry nutrition: Main effects and modes of action. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, Netherlands, v. 158, n. 1-2, p. 1–14, Jun. 2010.

BURDOCK, G. A. Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (*propolis*). **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, United Kingdom, v. 36, n. 4, p. 347–363, Abr. 1998.

BURT, S. A. et al. Carvacrol induces heat shock protein 60 and inhibits synthesis of flagellin in *Escherichia coli* O157:H7. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, United States, v. 73, n. 14, p. 4484–4490, Jul. 2007.

CABRAL, I. S. R. et al. Composição fenólica, atividade antibacteriana e antioxidante da própolis vermelha brasileira. **Química Nova**, São Paulo, Brasil, v. 32, n. 6, p. 1523–1527, 2009.

CABRAL, I. S. R. et al. The correlation between the phenolic composition and biological activities of two varieties of Brazilian propolis (G6 and G12). **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, São Paulo, Brasil, v. 48, n. 3, p. 557–564, Set. 2012.

CAGRI, A.; USTUNOL, Z.; RYSER, E. T. Antimicrobial edible films and coatings. **Journal of Food Protection**, Des Moines, United States, v. 67, n. 4, p. 833–848, abr. 2004.

CALO, J. R. et al. Essential oils as antimicrobials in food systems– a review. **Food Control**, Oxford, United Kingdom, v. 54, n. 1, p. 111–119, Jan. 2015.

CARVALHO, R. A.; GROSSO, C. R. F. Characterization of gelatin based films modified white transglutaminase, glyoxal and formaldehyde. **Food Hydrocolloids**, Amsterdam, Netherlands, v. 18, n. 5, p. 717–726, 2004.

CASQUETE, R. et al. Antimicrobial activity of ethanolic extract of propolis in "*Alheira*", a fermented meat sausage. **Cogent Food & Agriculture**, Abingdon, United Kingdom, v. 2, n. 1, p. 1-7, Jan. 2016.

CHALOVA, V. I.; CRANDALL, P. G.; RICKE, S. C. Microbial inhibitory and radical scavenging activities of cold-pressed terpeneless Valencia orange (*Citrus sinensis*) oil in different dispersing agents. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, Chichester, United

Kingdom, v. 90, n. 5, p. 870–876, Abr. 2010.

CHANDRA, H.; FAROOQ, A. Lipoxygenase inhibitory, antioxidant and antimicrobial activities of selected essential oils. **Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research**, Indore, India, v. 7, n. 4, p. 79-83, 2014.

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**, Amsterdam, Netherlands, v. 85, p. 11–19, Dez. 2014.

CLAUS, R. et al. Antiapoptotic effects of propolis extract and propol on human macrophages exposed to minimally modified low density lipoprotein. **Arzneimittel-Forschung**, Stuttgart, Germany, v. 50, n. 4, p. 373–379, Abr. 2000.

CORONADO, M. F. J. **Caracterização de filmes nanocompósitos biodegradáveis a base de gelatina produzidos com um aplicador automático de filmes**. 2012. 159 f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Zootecnica e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2012.

CORREA, S. J. P. **Utilização de filmes a base de pectina contendo extrato de própolis vermelha para recobrimento de sementes de girassol**. 2011. 80 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Tiradentes, Aracajú, 2011.

CORREA, T. R. A. et al. Nanofilmes de zeínas com própolis analisados por microscopia de força atômica. **Embrapa Instrumentação**, Campinas, Brasil, v. 1, n. 1, p. 104–106, 2009.

CORTÉS-ROJAS, D. F.; DE SOUZA, C. R. F.; OLIVEIRA, W. P. Clove (*Syzygium aromaticum*): a precious spice. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, Beijing, China, v. 4, n. 2, p. 90–96, Fev. 2014.

CUEVA, C. et al. Antimicrobial activity of phenolic acids against commensal, probiotic and pathogenic bacteria. **Research in Microbiology**, Issy les Moulineaux, France, v. 161, n. 5, p. 372–382, Jun. 2010.

CUNHA, I. B. S. et al. Factors that influence the yield and composition of Brazilian propolis extracts. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, São Paulo, Brasil, v. 15, n. 6, p. 964–970, Dez. 2004.

DADALIOGLU, I.; EVRENDILEK, G. A. Chemical compositions and antibacterial effects of essential oils of Turkish oregano (*Origanum minutiflorum*), bay laurel (*Laurus nobilis*), Spanish lavender (*Lavandula stoechas* L.), and fennel (*Foeniculum vulgare*) on common foodborne pathogens. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, United States, v. 52, n. 26, p. 8255–8260, Dez. 2004.

DAFERERA, D. J.; ZIOGAS, B. N.; POLISSIOU, M. G. GC-MS analysis of essential oils from some Greek aromatic plants and their fungitoxicity on Penicillium digitatum. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, United States, v. 48, n. 6, p. 2576–2581, Jul. 2000.

DAUGSCH, A. et al. Brazilian red propolis--chemical composition and botanical origin. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine : eCAM**, New York, United States, v. 5, n. 4, p. 435–441, Dez. 2008.

DE FUNARI, C. S.; DE OLIVEIRA FERRO, V.; MATHOR, M. B. Analysis of propolis from Baccharis dracunculifolia DC. (*Compositae*) and its effects on mouse fibroblasts. **Journal of Ethnopharmacology**, Shannon, Clare Ireland, v. 111, n. 2, p. 206–212, Maio. 2007.

DEBEAUFORT, F.; QUEZADA-GALLO, J. A; VOILLEY, A. Edible films and coatings: tomorrow's packagings: a review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, New York, United States, v. 38, n. 4, p. 299–313, Maio. 1998.

DELGADO ACEVES, M. DE L.; ANDRADE ORTEGA, J. Á.; RAMÍREZ BARRAGÁN, C. A. Caracterización fisicoquímica de propóleos colectados en el Bosque La Primavera Zapopan, Jalisco. **Revista Mexicana de Ciencias Forestales**, Mexico City, Mexico, v. 6, n. 28, p. 74–87, 2015.

DIAS, T. P. et al. Effect of the addition of soy lecithin and Yucca schidigera extract on the properties of gelatin and glycerol based biodegradable films. **Polímeros**, São Carlos, Brasil, v. 23, n. 3, p. 339–345, 2013.

DIESTRA, E. A. D. et al. Concentración mínima bactericida "in vitro" del extracto etanólico de propóleos de Chepen (Perú) sobre Listeria monocytogenes. **REBIOL**, Trujillo, Perú, v. 28, n. 2, p. 1-5, Jul. 2008.

DORMAN, H. J.; DEANS, S. G. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. **Journal of Applied Microbiology**, Chichester, United Kingdom, v. 88, n. 2, p. 308–316, Fev. 2000.

DRAPAK, S. I. et al. X-ray diffraction investigation of the structure of propolis films. **Physics of the Solid State**, Moscow, Russian Federation, v. 48, n. 8, p. 1602–1604, Ago. 2006a.

DRAPAK, S. I. et al. Structural and optical characterization of the propolis films. **Applied Surface Science**, Amsterdam, Netherlands, v. 253, n. 1, p. 279–282, Out. 2006b.

DRAPAK, S. I.; DRAPAK, I. T.; KOVALYUK, Z. D. Optical and electrical properties of propolis films. **Technical Physics**, Moscow, Russian Federation, v. 49, n. 11, p. 1529–1530, Nov. 2004.

DU, W.-X. et al. Antibacterial activity against *E. coli* O157:H7, physical properties, and storage stability of novel carvacrol-containing edible tomato films. **Journal of Food Science**, Hoboken, United States, v. 73, n. 7, p. M378–M383, Set. 2008.

DUARTE, M. C. T. et al. Anti-Candida activity of Brazilian medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, Shannon, Clare Ireland, v. 97, n. 2, p. 305–311, Fev. 2005.

DURANGO, A. M. et al. Filmes e revestimentos comestíveis na conservação de produtos alimentícios. **Revista CERES**, Viçosa, Brasil, v. 52, n. 300, p. 221–244, 2005.

ELGAYYAR, M. et al. Antimicrobial activity of essential oils from plants against selected pathogenic and saprophytic microorganisms. **Journal of Food Protection**, Des Moines, United States, v. 64, n. 7, p. 1019–1024, Jul. 2001.

FARRÉ, R.; FRASQUET, I.; SÁNCHEZ, A. Propolis and human health. **Ars Pharmaceutica**, Granada, Spain, v. 45, n. 1, p. 21–43, 2004.

FATHI, E.; SEFIDKON, F. Influence of drying and extraction methods on yield and chemical

composition of the essential oil of *Eucalyptus sargentii*. **Journal of Agricultural Science and Technology**, Iran, Republic of Islamic, v. 14, n. 5, p. 1035–1042, 2012.

FERNÁNDEZ-PAN, I.; CARRIÓN-GRANDA, X.; MATÉ, J. I. Antimicrobial efficiency of edible coatings on the preservation of chicken breast fillets. **Food Control**, Kidlington, United Kingdom, v. 36, n. 1, p. 69–75, Fev. 2014.

FRIEDLY, E. C. et al. In vitro antilisterial effects of citrus oil fractions in combination with organic acids. **Journal of Food Science**, Hoboken, United States, v. 74, n. 2, p. M67–M72, Mar. 2009.

FROZZA, C. O. D. S. et al. Chemical characterization, antioxidant and cytotoxic activities of Brazilian red propolis. **Food and Chemical Toxicology**, Kidlington, United Kingdom, v. 52, p. 137–142, Fev. 2013.

FU, Y. et al. Antimicrobial activity of clove and rosemary essential oils alone and in combination. **Phytotherapy Research : PTR**, Chichester, United Kingdom v. 21, n. 10, p. 989–994, Out. 2007.

FUNARI, C. S.; FERRO, V. O. Análise de própolis. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, Brasil, v. 26, n. 1, p. 171–178, Mar. 2006.

GALLO, J. Q. et al. Lipid hydrophobicity , physical state and distribution effects on the properties of emulsion-based edible films. **Journal of Membrane Science**, Amsterdam, Netherlands, v. 180, n. 1, p. 37–46, 2000.

GARCÍA-GARCÍA, R. .; PALOU-GARCÍA, E. Mecanismos de acción antimicrobiana de timol y carvacrol sobre microorganismos de interés en alimentos. **Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos**, Puebla, Mexico, v. 2, n. 2, p. 41–51, 2008.

GENNADIOS, A. et al. Mechanical and barrier properties of egg albumen films. **Journal of Food Science**, Hoboken, United States, v. 61, n. 3, p. 585–589, Maio. 1996.

GEORGANTELIS, D. et al. Effect of rosemary extract, chitosan and α-tocopherol on lipid oxidation and colour stability during frozen storage of beef burgers. **Meat Science**, Amsterdam, Netherlands, v. 75, n. 2, p. 256–264, Fev. 2007a.

GEORGANTELIS, D. et al. Effect of rosemary extract, chitosan and α-tocopherol on microbiological parameters and lipid oxidation of fresh pork sausages stored at 4°C. **Meat Science**, Amsterdam, Netherlands, v. 76, n. 1, p. 172–181, Maio. 2007b.

GHASEMLOU, M. et al. Physical, mechanical and barrier properties of corn starch films incorporated with plant essential oils. **Carbohydrate polymers**, Kidlington, United Kingdom, v. 98, n. 1, p. 1117–1126, Out. 2013.

GÓMEZ-ESTACA, J. et al. Antioxidant properties of tuna-skin and bovine-hide gelatin films induced by the addition of oregano and rosemary extracts. **Food Chemistry**, Amsterdam, Netherlands, v. 112, n. 1, p. 18–25, Jan. 2009.

GÓMEZ-ESTACA, J. et al. Biodegradable gelatin-chitosan films incorporated with essential oils as antimicrobial agents for fish preservation. **Food Microbiology**, London, United Kingdom, v. 27, n. 7, p. 889–896, Out. 2010.

GÓMEZ-ESTACA, J. et al. Development, properties, and stability of antioxidant shrimp muscle protein films incorporating carotenoid-containing extracts from food by-products. **LWT - Food Science and Technology**, London, United Kingdom, v. 64, n. 1, p. 189–196, Nov. 2015.

GONTARD, N.; GUILBERT, S.; CUQ, J.-L. Edible wheat gluten films: influence of the main process variables on film properties using response surface methodology. **Journal of Food Science**, Hoboken, United States, v. 57, n. 1, p. 190–195, Jan. 1992.

GONZÁLEZ-RIVERA, J. et al. Coaxial microwave assisted hydrodistillation of essential oils from five different herbs (lavender, rosemary, sage, fennel seeds and clove buds): chemical composition and thermal analysis. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, Amsterdam, Netherlands, v. 33, p. 308–318, Fev. 2016.

GOÑI, P. et al. Antimicrobial activity in the vapour phase of a combination of cinnamon and clove essential oils. **Food Chemistry**, Amsterdam, Netherlands, v. 116, n. 4, p. 982–989, Out. 2009.

GOY, R. C.; BERNARDES FILHO, R. Estudos de inibição do crescimento bacteriano pela ação de filmes de quitosana e própolis.pdf. **Embrapa Instrumentação**, Campinas, Brasil, v. 1, n. 1, p. 109–111, 2013.

GÜLÇIN, İ.; ELMASTAŞ, M.; ABOUL-ENEIN, H. Y. Antioxidant activity of clove oil – A powerful antioxidant source. **Arabian Journal of Chemistry**, Amsterdam, Netherlands, v. 5, n. 4, p. 489–499, Out. 2012.

GUO, M. et al. Antimicrobial films and coatings for inactivation of Listeria innocua on ready-to-eat deli turkey meat. **Food Control**, Kidlington, United Kingdom, v. 40, p. 64–70, Jun. 2014.

GUTIERREZ, J.; BARRY-RYAN, C.; BOURKE, P. The antimicrobial efficacy of plant essential oil combinations and interactions with food ingredients. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, Netherlands, v. 124, n. 1, p. 91–97, Maio. 2008.

GYAWALI, R.; IBRAHIM, S. A. Natural products as antimicrobial agents. **Food Control**, Kidlington, United Kingdom, v. 46, p. 412–429, Dez. 2014.

HAFSA, J. et al. Physical, antioxidant and antimicrobial properties of chitosan films containing Eucalyptus globulus essential oil. **LWT - Food Science and Technology**, London, United Kingdom, v. 68, p. 356–364, Maio. 2016.

HAN, J. Antimicrobial Food Packaging. **Food Technology**, Chicago, United States, v. 54, p. 56–65, 2000.

HEINZE, W. et al. Effects of ethanol extracts of propolis against common bacteria, fungi and viruses of veterinary importance. **Tierarztliche Umschau**, Konstanz, Germany, v. 53, n. 6, p. 321–326, 1998.

HERNÁNDEZ, S. A.; ZACCONI, F. C. M. Aceite de almendras dulces: extracción, caracterización y aplicación. **Química Nova**, São Paulo, Brasil,v. 32, n. 5, p. 1342–1345, 2009.

HINNEBURG, I.; DAMIEN DORMAN, H. J.; HILTUNEN, R. Antioxidant activities of extracts from selected culinary herbs and spices. **Food Chemistry**, Amsterdam, Netherlands, v. 97, n. 1, p. 122–129, Jul. 2006.

HOLLEY, R. A.; PATEL, D. Improvement in shelf-life and safety of perishable foods by plant essential oils and smoke antimicrobials. **Food Microbiology**, v. 22, n. 4, p. 273–292, Ago. 2005.

HOPKINS, E. J. et al. Effects of flaxseed oil concentration on the performance of a soy protein isolate-based emulsion-type film. **Food Research International**, Kidlington, United Kingdom, v. 67, p. 418–425, Jan. 2015.

HOQUE, M. S.; BENJAKUL, S.; PRODPRAN, T. Properties of film from cuttlefish (*Sepia pharaonis*) skin gelatin incorporated with cinnamon, clove and star anise extracts. **Food Hydrocolloids**, Amsterdam, Netherlands, v. 25, n. 5, p. 1085–1097, Jul. 2011.

HOSSEINI, S. F. et al. Bio-based composite edible films containing *Origanum vulgare* L. essential oil. **Industrial Crops and Products**, Amsterdam, Netherlands, v. 67, p. 403–413, Maio. 2015.

HU, J.; DINH, S. Q.; JOYCE, D. C. S. Carvone effects on Botrytis cinerea and harvested waxflower (*Chamelaucium*). **New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science**, Singapore, Singapore, v. 37, n. 1, p. 79–83, Mar. 2009.

HUSSAIN, A. I. et al. Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of basil (*Ocimum basilicum*) essential oils depends on seasonal variations. **Food Chemistry**, Amsterdam, Netherlands, v. 108, n. 3, p. 986–995, Jun. 2008.

IRAM, N. A. **Esquema A de norma IRAM 15935**, Buenos Aires, Argentina, 2000.

ISLA, M. . et al. Antioxidant activity of Argentine propolis extracts. **Journal of Ethnopharmacology**, Shannon, Clare Ireland, v. 76, n. 2, p. 165–170, Jul. 2001.

ISLA, M. I. et al. Some chemical composition and biological activity of northern Argentine propolis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, United States, v. 53, n. 4, p. 1166–1172, Fev. 2005.

JAVANMARD, M. Effect of whey protein edoble film packaging on the qualiyi and moisture uptake of dried peanuts, **Journal of Food Process Engineering**, Hoboken, United States, v. 31, n. 4, p. 503–516, Ago. 2008.

JAVIDI, Z.; HOSSEINI, S. F.; REZAEI, M. Development of flexible bactericidal films based on poly(lactic acid) and essential oil and its effectiveness to reduce microbial growth of refrigerated rainbow trout. **LWT - Food Science and Technology**, London, United Kingdom, v. 72, p. 251–260, Out. 2016.

JIROVETZ, L. et al. Chemical Composition and Antioxidant Properties of Clove Leaf Essential Oil. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, United States, v. 54, n. 17, p. 6303–6307, Ago. 2006.

KAVIARASAN, S. et al. In vitro studies on antiradical and antioxidant activities of fenugreek (*Trigonella foenum graecum*) seeds. **Food Chemistry**, Amsterdam, Netherlands, v. 103, n. 1, p. 31–37, Jan. 2007.

KRISTO, E.; BILIADERIS, C. G.; ZAMPRAKA, A. Water vapour barrier and tensile properties of composite caseinate-pullulan films: Biopolymer composition effects and impact of beeswax lamination. **Food Chemistry**, Amsterdam, Netherlands, v. 101, n. 2, p. 753–764, Jan. 2007.

KUJUMGIEV, A. et al. Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin. **Journal of Ethnopharmacology**, Shannon, Clare Ireland, v. 64, n. 3, p. 235–240, Mar. 1999.

KUMAR, P. et al. Efficacy of *Mentha×piperita* and *Mentha citrata* essential oils against housefly, *Musca domestica* L. **Industrial Crops and Products**, Amsterdam, Netherlands, v. 39, p. 106–112, Set. 2012.

KUMAZAWA, S.; HAMASAKA, T.; NAKAYAMA, T. Antioxidant activity of propolis of various geographic origins. **Food Chemistry**, Amsterdam, Netherlands, v. 84, n. 3, p. 329–339, Fev. 2004.

LACERDA, R. C. C. **Avaliação da composição química e atividade antioxidante da própolis orgânica de *Apis mellifera* visando à preservação ambiental de ecossistema envolvido**. 2012. 110 f. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura ¨Luiz de Queiroz¨, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2012.

LEE, J. H.; LEE, J.; SONG, K. BIN. Development of a chicken feet protein film containing essential oils. **Food Hydrocolloids**, Amsterdam, Netherlands, v. 46, p. 208–215, Abr. 2015.

LEKJING, S. A chitosan-based coating with or without clove oil extends the shelf life of cooked pork sausages in refrigerated storage. **Meat Science**, Amsterdam, Netherlands, v. 111, p. 192–197, 2016.

LI, X. et al. Fabrication of gelatin–laponite composite films: effect of the concentration of laponite on physical properties and the freshness of meat during storage. **Food Hydrocolloids**, Amsterdam, Netherlands, v. 44, p. 390–398, Fev. 2015.

LI, Y.; KONG, D.; WU, H. Analysis and evaluation of essential oil components of cinnamon barks using GC–MS and FTIR spectroscopy. **Industrial Crops and Products**, Amsterdam, Netherlands, v. 41, p. 269–278, Jan. 2013.

LOTTI, C. et al. Inhibition of Saccharomyces cerevisiae Pdr5p by a natural compound extracted from Brazilian Red Propolis. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, João Pessoa, Brasil, v. 21, n. 5, p. 901–907, Out. 2011.

LU, L.-C.; CHEN, Y.-W.; CHOU, C.-C. Antibacterial activity of propolis against *Staphylococcus aureus*. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, Netherlands, v. 102, n. 2, p. 213–220, Jul. 2005.

LUSTOSA, S. R. **Padronizacão de extrato de própolis e avaliação de atividade antimicrobiana**. 2007. 86 f. Dissertação (Mestrado) - Departamento de Ciências Farmaceúticas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2007.

LV, J. et al. Phenolic composition and nutraceutical properties of organic and conventional cinnamon and peppermint. **Food Chemistry**, Amsterdam, Netherlands, v. 132, n. 3, p. 1442–1450, Jun. 2012.

MAHDAVIKIA, F.; SAHARKHIZ, M. J. Phytotoxic activity of essential oil and water extract of peppermint (*Mentha×piperita* L. CV. Mitcham). **Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants**, Amsterdam, Netherlands, v. 2, n. 4, p. 146–153, Dez. 2015.

MARCUCCI, M. C. et al. Phenolic compounds from Brazilian propolis with pharmacological activities. **Journal of Ethnopharmacology**, Shannon, Clare Ireland, v. 74, n. 2, p. 105–112, Fev. 2001.

MASCHERONI, E. et al. Diffusivity of propolis compounds in Polylactic acid polymer for the development of anti-microbial packaging films. **Journal of Food Engineering**, London, United Kingdom, v. 98, n. 3, p. 294–301, Jun. 2010.

MATAN, N. Antimicrobial activity of edible film incorporated with essential oils to preserve dried fish (*Decapterus maruadsi*). **International Food Research Journal**, Selangor, Malaysia, v. 19, n. 4, p. 1733–1738, 2012.

MICKIENĖ, R.; RAGAŽINSKIENĖ, O.; BAKUTIS, B. Antimicrobial activity of *Mentha arvensis* L. and *Zingiber officinale* R. essential oils. **Biologija**, v. 57, n. 2, Jul. 2011.

MIGUEL, M. G. et al. Phenols, flavonoids and antioxidant activity of aqueous and methanolic extracts of propolis (*Apis mellifera* L.) from Algarve, South Portugal. **Food Science and Technology**, Reading, United Kingdom, v. 34, n. 1, p. 16–23, Mar. 2014.

MILIAUSKAS, G.; VENSKUTONIS, P. R.; VAN BEEK, T. A. Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts. **Food Chemistry**, Amsterdam, Netherlands, v. 85, n. 2, p. 231–237, Abr. 2004.

MIN, S.; KROCHTA, J. M. Inhibition of penicillium commune by edible whey protein films incorporating lactoferrin, lacto-ferrin hydrolysate, and lactoperoxidase systems. **Journal of Food Science**, Hoboken, United States, v. 70, n. 2, p. M87–M94, Mar. 2005.

MIRZOEVA, O. K.; GRISHANIN, R. N.; CALDER, P. C. Antimicrobial action of propolis and some of its components: the effects on growth, membrane potential and motility of bacteria. **Microbiological Research**, Muenchen, Germany, v. 152, n. 3, p. 239–246, set. 1997.

MOHDALY, A. A. A. et al. Phenolic extract from propolis and bee pollen: composition, antioxidant and antibacterial activities. **Journal of Food Biochemistry**, Hoboken, United States, v. 39, n. 5, p. 538–547, Out. 2015.

MORADI, M. et al. Characterization of antioxidant chitosan film incorporated with Zataria multiflora Boiss essential oil and grape seed extract. **LWT - Food Science and Technology**, London, United Kingdom, v. 46, n. 2, p. 477–484, Maio. 2012.

MORENO, M. I. N. et al. Comparison of the free radical-scavenging activity of propolis from several regions of Argentina. **Journal of Ethnopharmacology**, Shannon, Clare Ireland, v. 71, n. 1-2, p. 109–114, Jul. 2000.

MUPPALLA, S. R. et al. Carboxymethyl cellulose–polyvinyl alcohol films with clove oil for active packaging of ground chicken meat. **Food Packaging and Shelf Life**, Amsterdam, Netherlands, v. 2, n. 2, p. 51–58, Dez. 2014.

MYTLE, N. et al. Antimicrobial activity of clove (*Syzgium aromaticum*) oil in inhibiting *Listeria monocytogenes* on chicken frankfurters. **Food Control**, Kidlington, United Kingdom, v. 17, n. 2, p. 102–107, Fev. 2006.

NAZZARO, F. et al. Effect of essential oils on pathogenic bacteria. **Pharmaceuticals**, Basel,

Switzerland, v. 6, n. 12, p. 1451–1474, Nov. 2013.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS - NCCLS. **Methods for determining bacterial activity of antimicrobial agents**. Wayne, United States, 1999.

NEGI, P. S. Plant extracts for the control of bacterial growth: efficacy, stability and safety issues for food application. **International journal of food microbiology**, Amsterdam, Netherlands, v. 156, n. 1, p. 7–17, Maio. 2012.

NEVEU, V. et al. Phenol-Explorer: an online comprehensive database on polyphenol contents in foods. **Database: the Journal of Biological Databases and Curation**, Oxford, United Kingdom, v. 2010, p. bap024,J. 2010.

NOVAK, J. et al. Essential oil composition of Vitex agnus-castus - comparison of accessions and different plant organs. **Flavour and Fragrance Journal**, Chichester, United Kingdom, v. 20, n. 2, p. 186–192, Mar. 2005.

NOWAKOWSKA, Z.; KĘDZIA, B.; SCHROEDER, G. Synthesis, physicochemical properties and antimicrobial evaluation of new (E)-chalcones. **European Journal of Medicinal Chemistry**, Issy les Moulineaux, France, v. 43, n. 4, p. 707–713, Abr. 2008.

NUNES, L. C. C. et al. Variabilidade sazonal dos constituintes da própolis vermelha e bioatividade em *Artermia salina*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, João Pessoa, Brasil, v. 19, n. 2b, p. 524–529, Jun. 2009.

OLAWORE, N. O. et al. Chemical composition of the leaf and fruit essential oils of *Murraya paniculata* (L.) Jack. (Syn.*Murraya exotica* Linn.). **Flavour and Fragrance Journal**, Chichester, United Kingdom, v. 20, n. 1, p. 54–56, Jan. 2005.

OLDONI, T. L. C. et al. Isolation and analysis of bioactive isoflavonoids and chalcone from a new type of Brazilian propolis. **Separation and Purification Technology**, Kidlington, United Kingdom, v. 77, n. 2, p. 208–213, Fev. 2011.

OLIVEIRA, K. A. DE M. et al. Atividade antimicrobiana e quantificação de Flavonoides e Fenóis totais em diferentes extratos de Própolis. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, Londrina, Brasil, v. 33, n. 2, p. 211–222, mar. 2013.

OLIVEIRA, R. N. et al. FTIR analysis and quantification of phenols and flavonoids of five commercially available plants extracts used in wound healing. **Matéria (Rio de Janeiro)**, Rio de Janeiro, Brasil, v. 21, n. 3, p. 767–779, Set. 2016.

OMIDBEYGI, M. et al. Antifungal activity of thyme, summer savory and clove essential oils against *Aspergillus flavus* in liquid medium and tomato paste. **Food Control**, Kidlington, United Kingdom, v. 18, n. 12, p. 1518–1523, Dez. 2007.

OOSTERHAVEN, K.; POOLMAN, B.; SMID, E. . S-carvone as a natural potato sprout inhibiting, fungistatic and bacteristactic compound. **Industrial Crops and Products**, Amsterdam, Netherlands, v. 4, n. 1, p. 23–31, 1995.

OPALCHENOVA, G.; OBRESHKOVA, D. Comparative studies on the activity of basil an essential oil from *Ocimum basilicum* L. against multidrug resistant clinical isolates of the genera

Staphylococcus, *Enterococcus* and *Pseudomonas* by using different test methods. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, Netherlands, v. 54, n. 1, p. 105–110, Jul. 2003.

OUSSALAH, M. et al. Antimicrobial and antioxidant effects of milk protein-based film containing essential oils for the preservation of whole beef muscle. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, United States, v. 52, n. 18, p. 5598–5605, set. 2004.

OUSSALAH, M. et al. Antimicrobial effects of alginate-based film containing essential oils for the preservation of whole beef muscle. **Journal of Food Protection**, Des Moines, United States, v. 69, n. 10, p. 2364–2369, Out. 2006.

OUSSALAH, M. et al. Inhibitory effects of selected plant essential oils on the growth of four pathogenic bacteria: *E. coli* O157:H7, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*. **Food Control**, Kidlington, United Kingdom, v. 18, n. 5, p. 414–420, Maio. 2007.

PALOMINO, L. R. G. **Caracterización fisicoquímica e evaluación de la actividad antioxidante de propóleos de Antioquia**. 2009. 143 f. Dissertação (Mestrado). Faculdade Ciencias, Universidad Nacional de Colombia Sede Medellin, Medellin, Colombia. 2009.

PALOMINO, L. R. G. et al. Caracterización fisicoquímica y actividad antimicrobiana del Propóleos en el Municipio de La Unión (Antioquia, Colombia). **Revista Facultad Nacional de Agronomía**, Medellín, Colombia, v. 63, n. 1, p. 5373–5383, 2010.

PARK, H. J. et al. Processes and applications for edible coating and film materials from agropolymers. In:_____. **Innovations in food packaging.** 2nd ed. Leatherhead, United Kingdom, 2014. Cha. 10, p. 257–275.

PARK, J. H. et al. Immunomodulatory effect of caffeic acid phenethyl ester in Balb/c mice. **International Immunopharmacology**, London, United Kingdom, v. 4, n. 3, p. 429–436, Mar. 2004.

PARK, S. I.; ZHAO, Y. Incorporation of a high concentration of mineral or vitamin into chitosan-based films. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, United States, v. 52, n. 7, p. 1933–1939, Abr. 2004.

PARK, Y. K. et al. Estudo da preparação dos extratos de própoilis e suas aplicações. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, Brasil, v. 18, n. 3, p. 313–318, ago. 1998.

PARK, Y. K.; ALENCAR, S. M.; AGUIAR, C. L. Botanical origin and chemical composition of Brazilian propolis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, United States, v. 50, n. 9, p. 2502–2506, Abr. 2002.

PASTOR, C. et al. Physical and antifungal properties of hydroxypropylmethylcellulose based films containing propolis as affected by moisture content. **Carbohydrate Polymers**, Kidlington, United Kingdom, v. 82, n. 4, p. 1174–1183, Nov. 2010.

PEREDA, M. et al. Chitosan-gelatin composites and bi-layer films with potential antimicrobial activity. **Food Hydrocolloids**, Amsterdam, Netherlands, v. 25, n. 5, p. 1372–1381, Jul. 2011.

PEREIRA, A. DE A. et al. Caracterização química e efeito inibitório de óleos essenciais sobre o crescimento de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras,

Brasil, v. 32, n. 3, p. 887–893, Jun. 2008.

POLITEO, O.; JUKIC, M.; MILOS, M. Chemical composition and antioxidant capacity of free volatile aglycones from basil (*Ocimum basilicum* L.) compared with its essential oil. **Food Chemistry**, Amsterdam, Netherlands, v. 101, n. 1, p. 379–385, Jan. 2007.

POPOVA, M. et al. Validated methods for the quantification of biologically active constituents of poplar-type propolis. **Phytochemical analysis: PCA**, Chichester, United Kingdom, v. 15, n. 4, p. 235–240, 2004.

POPOVA, M. et al. Antibacterial activity of Turkish propolis and its qualitative and quantitative chemical composition. **Phytomedicine: International Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology**, Muenchen, Germany, v. 12, n. 3, p. 221-228, Mar. 2005.

POPOVA, M. P. et al. Chemical characteristics of poplar type propolis of different geographic origin. **Apidologie**, Paris, France, v. 38, n. 3, p. 306–306, Jun. 2007.

PRABUSEENIVASAN, S.; JAYAKUMAR, M.; IGNACIMUTHU, S. In vitro antibacterial activity of some plant essential oils. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, London, United Kingdom, v. 6, n. 1, p. 39, Dez. 2006.

PRAKASH, B. et al. Plant essential oils as food preservatives to control moulds, mycotoxin contamination and oxidative deterioration of agri-food commodities – potentials and challenges. **Food Control**, Kidlington, United Kingdom, v. 47, p. 381–391, Jan. 2015.

QUEZADA, J. et al. Application of edible coatings to improve shelf-life of mexican guava. **Acta Horticulturae**, Leuven, Belgium, v. 599, p. 589–594, 2003.

QUINTAVALLA, S.; VICINI, L. Antimicrobial food packaging in meat industry. **Meat Science**, Amsterdam, Netherlands, v. 62, n. 3, p. 373–380, nov. 2002.

RAHMAN, M. M.; GRAY, A. I. Antimicrobial constituents from the stem bark of *Feronia limonia*. **Phytochemistry**, Kidlington, United Kingdom, v. 59, n. 1, p. 73–77, Jan. 2002.

RAMOS-GARCÍA, M. DE L.; BAUTISTA-BAÑOS, S.; BARRERA-NECHA, L. L. Compuestos Antimicrobianos Adicionados en Recubrimientos Comestibles para Uso en Productos Hortofrutícolas. **Revista Mexicana de Fitopatologia**, Sonora, Mexico, v. 28, n. 1, p. 44–57, 2010.

RANA, I. S.; RANA, A. S.; RAJAK, R. C. Evaluation of antifungal activity in essential oil of the *Syzygium aromaticum* (L.) by extraction, purification and analysis of its main component eugenol. **Brazilian Journal of Microbiology**, Rio de Janeiro, Brasil, v. 42, n. 4, p. 1269–1277, Out. 2011.

RE, R. et al. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology and Medicine**, Philadelphia, United States, v. 26, n. 9-10, p. 1231–1237, Maio. 1999.

RIGHI, A. A. et al. Brazilian red propolis: unreported substances, antioxidant and antimicrobial activities. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, Chichester, United Kingdom, v. 91, n. 13, p. 2363–2370, Out. 2011.

ROJAS, M. **Recubrimientos comestibles y sustancias de origen natural en manzana fresca**

cortada: Una nueva estrategia de conservación. 2006. 333f. Tese (Doutorado) - Departament de Tecnologia d'Aliments, Universidad de Lleida, Lleida, España, 2006.

ROJAS-GRAÜ, M. A. et al. Mechanical, barrier, and antimicrobial properties of apple puree edible films containing plant essential oils. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, United States, v. 54, n. 24, p. 9262–9267, Nov. 2006.

ROJAS-GRAÜ, M. A. et al. Apple puree-alginate edible coating as carrier of antimicrobial agents to prolong shelf-life of fresh-cut apples. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, Netherlands, v. 45, n. 2, p. 254–264, Ago. 2007.

ROJAS-GRAÜ, M. A.; SOLIVA-FORTUNY, R.; MARTÍN-BELLOSO, O. Edible coatings to incorporate active ingredients to fresh-cut fruits: a review. **Trends in Food Science & Technology**, Kidlington, United Kingdom, v. 20, n. 10, p. 438–447, Out. 2009.

RONQUILLO, E. **Evaluación del potencial antimicrobiano de películas comestibles con aceites esenciales in vitro e in situ**. 2007. 46 f. Dissertação (Mestrado) - Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa, Iztapalapa, Mexico, 2007.

SALAMANCA, G. G. **Origen naturaleza propiedades fisicoquímicas y valor terapeútico del própóleo.** Ibagué, Colombia: Universidad del Tolima, 2013.

SALAMANCA, G. G.; CORREA, I. L. C.; PRINCIPAL, J. Perfil de flavonoides e índices de oxidación de algunos propóleos colombianos. **Zootecnia Tropical**, Maracay, Venezuela ,v. 25, n. 2, p. 95–102, 2007.

SALATINO, A. et al. Propolis research and the chemistry of plant products. **Natural Product Reports**, Cambridge, United Kingdom, v. 28, n. 5, p. 925–936, Maio. 2011.

SALGADO, P. R. et al. Sunflower protein films incorporated with clove essential oil have potential application for the preservation of fish patties. **Food Hydrocolloids**, Amsterdam, Netherlands, v. 33, n. 1, p. 74–84, ago. 2013.

SÁNCHEZ ALDANA, D. et al. Antibacterial activity of pectic-based edible films incorporated with Mexican lime essential oil. **Food Control**, Kidlington, United Kingdom, v. 50, p. 907–912, Abr. 2015.

SARKAR, N.; CHAUDHURI, B. B. An efficient differential box-counting approach to compute fractal dimension of image. **IEEE Transactions on Systems, Man, and Cybernetics**, Piscataway, United States, v. 24, n. 1, p. 115–120, 1994.

SASIDHARAN, S. et al. Antimicrobial activities of *Psophocarpus tetragonolobus* (L.) DC extracts. **Foodborne Pathogens and Disease**, New Rochelle, United States, v. 5, n. 3, p. 303–309, jun. 2008.

SEYDIM, A. C.; SARIKUS, G. Antimicrobial activity of whey protein based edible films incorporated with oregano, rosemary and garlic essential oils. **Food Research International**, Kidlington, United Kingdom, v. 39, n. 5, p. 639–644, Jun. 2006.

SFORCIN, J. M. et al. Seasonal effect on Brazilian propolis antibacterial activity. **Journal of Ethnopharmacology**, Shannon, Clare Ireland, v. 73, n. 1-2, p. 243–249, Nov. 2000.

SHAN, B. et al. Antioxidant capacity of 26 spice extracts and characterization of their phenolic

constituents. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, United States, v. 53, n. 20, p. 7749–7759, Out. 2005.

SILVA, B. B. et al. Chemical composition and botanical origin of red propolis, a new type of brazilian propolis. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine: eCAM**, New York, United States, v. 5, n. 3, p. 313–316, Set. 2008.

SILVEIRA, S. M. DA et al. Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils from selected herbs cultivated in the South of Brazil against food spoilage and foodborne pathogens. **Ciência Rural**, Santa Maria, Brasil, v. 42, n. 7, p. 1300–1306, Jul. 2012.

SINGH, R.; SHUSHNI, M. A. M.; BELKHEIR, A. Antibacterial and antioxidant activities of *Mentha piperita* L. **Arabian Journal of Chemistry**, Amsterdam, Netherlands, v. 8, n. 3, p. 322–328, Maio. 2015.

SINGLETON, V. .; ROSSI JR, J. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**, Davis, United States, v. 16, n. 3, p. 144–158, 1965.

SIRIPATRAWAN, U.; VITCHAYAKITTI, W. Improving functional properties of chitosan fi lms as active food packaging by incorporating with propolis. **Food Hydrocolloids**, Amsterdam, Netherlands, v. 61, p. 695–702, 2016.

SKANDAMIS, P. N.; NYCHAS, G. J. Effect of oregano essential oil on microbiological and physico-chemical attributes of minced meat stored in air and modified atmospheres. **Journal of Applied Microbiology**, Chichester, United Kingdom, v. 91, n. 6, p. 1011–1022, Dez. 2001.

SOBRAL, P. J. A. Influência da espessura sobre certas propriedades de biofilmes à base de proteínas miofibrilares. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasilia, Brasil, v. 35, n. 6, p. 1251–1259, 2000.

SOBRAL, P. J. A. et al. Mechanical, water vapor barrier and thermal properties of gelatin based edible films. **Food Hydrocolloids**, Amsterdam, Netherlands, v. 15, n. 4, p. 423–432, Jul. 2001.

SOBRAL, P. J. A.; HABITANTE, A. M. Q. B. Phase transitions of pigskin gelatin. **Food Hydrocolloids**, Amsterdam, Netherlands, v. 15, n. 4, p. 377–382, Jul. 2001.

SOBRAL, P. J. A. et al. Phase transitions in biodegradable films based on blends of gelatin and poly (vinyl alcohol). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, Brasil, v. 31, n. 2, p. 372–379, Jun. 2011.

SOUZA, S. J. et al. Propriedades Antioxidantes e antimicrobianas de filmes de amido contendo extrato de própolis. **Anais do Congresso Brasileiro de Engenharia Química em Iniciação Científica - Cobeq IC 2015**, Campinas, Brasil, p. 1800-1805, 2015.

TABART, J. et al. Comparative antioxidant capacities of phenolic compounds measured by various tests. **Food Chemistry**, Amsterdam, Netherlands, v. 113, n. 4, p. 1226–1233, Abr. 2009.

TAJKARIMI, M. M.; IBRAHIM, S. A.; CLIVER, D. O. Antimicrobial herb and spice compounds in food. **Food Control**, Kidlington, United Kingdom, v. 21, n. 9, p. 1199–1218, set. 2010.

TAPIA, M. S. et al. Alginate- and gellan-based edible films for probiotic coatings on fresh-cut

fruits. **Journal of Food Science**, Hoboken, United States, v. 72, n. 4, p. E190–E196, Maio. 2007.

TEIXEIRA, B. et al. Chemical composition and antibacterial and antioxidant properties of commercial essential oils. **Industrial Crops and Products**, Amsterdam, Netherlands, v. 43, p. 587–595, Maio. 2013.

TEIXEIRA, B. et al. Characterization of fish protein films incorporated with essential oils of clove, garlic and origanum: Physical, antioxidant and antibacterial properties. **LWT - Food Science and Technology**, London, United Kingdom, v. 59, n. 1, p. 533–539, Nov. 2014.

TELIS, V. R. N.; SOBRAL, P. J. A. Glass transitions and state diagram for freeze-dried pineapple. **LWT - Food Science and Technology**, London, United Kingdom, v. 34, n. 4, p. 199–205, Jun. 2001.

THARANATHAN, R. . Biodegradable films and composite coatings: past, present and future. **Trends in Food Science & Technology**, Kidlington, United Kingdom, v. 14, n. 3, p. 71–78, Mar. 2003.

THEIS, N.; LERDAU, M. The evolution of function in plant secondary metabolites. **International Journal of Plant Sciences**, Chicago, United States, v. 164, n. S3, p. S93–S102, Maio. 2003.

THOMAZINE, M.; CARVALHO, R. A.; SOBRAL, P. J. A. physical properties of gelatin films plasticized by blends of glycerol and sorbitol. **Journal of Food Science**, Hoboken, United States, v. 70, n. 3, p. E172–E176, Maio. 2006.

TIVERON, A. P. **Atividade antioxidante e composição fenólica de legumes e verduras consumidos no Brasil**. 2010. 103 f. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura ¨Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.

TOLOZA, L.; CAÑIZARES, E. Obtención , caracterización y evaluación de la actividad antimicrobiana de extractos de propóleos de Campeche. **Ars Pharmaceutica**, Granada, Spain, v. 43, n. 1-2, p. 187–204, 2002.

TONGNUANCHAN, P. et al. Mechanical, thermal and heat sealing properties of fish skin gelatin film containing palm oil and basil essential oil with different surfactants. **Food Hydrocolloids**, Amsterdam, Netherlands, v. 56, p. 93–107, Maio. 2016.

TONGNUANCHAN, P.; BENJAKUL, S.; PRODPRAN, T. Physico-chemical properties, morphology and antioxidant activity of film from fish skin gelatin incorporated with root essential oils. **Journal of Food Engineering**, London, United Kingdom, v. 117, n. 3, p. 350–360, Ago. 2013.

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

TOSI, E. A. et al. Food preservative based on propolis: Bacteriostatic activity of propolis polyphenols and flavonoids upon *Escherichia coli*. **Food Chemistry**, Amsterdam, Netherlands, v. 104, n. 3, p. 1025–1029, Jan. 2007.

TRUSHEVA, B. et al. Bioactive constituents of brazilian red propolis. **Evidence-based**

Complementary and Alternative Medicine : eCAM, New York, United States, v. 3, n.2, p. 249-54, Jun. 2006.

TYAGI, A. K.; MALIK, A. Antimicrobial potential and chemical composition of Mentha piperita oil in liquid and vapour phase against food spoiling microorganisms. **Food Control**, Kidlington, United Kingdom, v. 22, n. 11, p. 1707–1714, Nov. 2011.

UZEL, A. et al. Chemical compositions and antimicrobial activities of four different Anatolian propolis samples. **Microbiological Research**, Muenchen, Germany, v. 160, n. 2, p. 189–195, Abr. 2005.

VANIN, F. M. et al. Effects of plasticizers and their concentrations on thermal and functional properties of gelatin-based films. **Food Hydrocolloids**, Amsterdam, Netherlands, v. 19, n. 5, p. 899–907, Set. 2005.

VARGAS, M.; ALBORS, A.; CHIRALT, A. Application of chitosan-sunflower oil edible films to pork meat hamburgers. **Procedia Food Science**, Amsterdam, Netherlands, v. 1, p. 39–43, 2011.

VERMEIREN, L. et al. Developments in the active packaging of foods. **Trends in Food Science & Technology**, Kidlington, United Kingdom, v. 10, n. 3, p. 77–86, Mar. 1999.

VICENTINI, N. M. et al. Prediction of Cassava Starch Edible Film Properties by Chemometric Analysis of Infrared Spectra. **Spectroscopy Letters**, New York, United States, v. 38, n. 6, p. 749–767, Nov. 2005.

VILLALOBOS, R. et al. Gloss and transparency of hydroxypropyl methylcellulose films containing surfactants as affected by their microstructure. **Food Hydrocolloids**, Amsterdam, Netherlands, v. 19, n. 1, p. 53–61, Jan. 2005.

WA, V. et al. Bioactive Glass-Green and red propolis association: antimicrobial activity against oral pathogen bacteria. **Natural Products Chemistry & Research**, Los Angeles, United States, v. 2, n. 6, p. 1-5, 2014.

WILSON, C. L. et al. Rapid evaluation of plant extracts and essential oils for antifungal activity against *Botrytis cinerea*. **Plant Disease**, St. Paul, United States, v. 81, n. 2, p. 204–210, Fev. 1997.

WOISKY, R. G.; SALATINO, A. Analysis of propolis: some parameters and procedures for chemical quality control. **Journal of Apicultural Research**, Abingdon, United Kingdom, v. 37, n. 2, p. 99–105, 1998.

WU, J. et al. Preparation, properties and antioxidant activity of an active film from silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) skin gelatin incorporated with green tea extract. **Food Hydrocolloids**, Amsterdam, Netherlands, v. 32, n. 1, p. 42–51, Jul. 2013.

WU, Y.-W. et al. Volatility-dependent 2D IR correlation analysis of traditional Chinese medicine “Red Flower Oil” preparation from different manufacturers. **Journal of Molecular Structure**, Amsterdam, Netherlands, v. 882, n. 1-3, p. 107–115, Jun. 2008a.

WU, Y.-W. et al. Rapid discrimination of extracts of Chinese propolis and poplar buds by FT-IR and 2D IR correlation spectroscopy. **Journal of Molecular Structure**, Amsterdam, Netherlands,

v. 883-884, p. 48–54, Jul. 2008b.

YANG, H.-Y. et al. Inhibitory effect of propolis extract on the growth of *Listeria monocytogenes* and the mutagenicity of 4-nitroquinoline-N-oxide. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, Chichester, United Kingdom, v. 86, n. 6, p. 937–943, Abr. 2006.

ZHU, X.; ZHANG, H.; LO, R. Phenolic compounds from the leaf extract of artichoke (*Cynara scolymus* L.) and their antimicrobial activities. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, United States, v. 52, n. 24, p. 7272–7278, Dez. 2004.

ZINOVIADOU, K. G.; KOUTSOUMANIS, K. P.; BILIADERIS, C. G. Physico-chemical properties of whey protein isolate films containing oregano oil and their antimicrobial action against spoilage flora of fresh beef. **Meat Science**, Amsterdam, Netherlands, v. 82, n. 3, p. 338–345, Jul. 2009.