UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ZOOTECNIA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS

RENATA BARBOSA BODINI

Desenvolvimento de materiais poliméricos bioativos à base de gelatina e própolis

Pirassununga
2011

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ZOOTECNIA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS

RENATA BARBOSA BODINI

Desenvolvimento de materiais poliméricos bioativos à base de gelatina e própolis
(versão corrigida)

Dissertação apresentada à Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para a obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Ciências da Engenharia de Alimentos.

Orientadora: Profa. Dra. Rosemary Aparecida de Carvalho

Pirassununga
2011

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

Serviço de Biblioteca e Informação da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da
Universidade de São Paulo

B667d	<p>Bodini, Renata Barbosa</p> <p>Desenvolvimento de materiais poliméricos bioativos à base de gelatina e própolis / Renata Barbosa Bodini. -- Pirassununga, 2011. 86 f.</p> <p>Dissertação (Mestrado) -- Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos - Universidade de São Paulo. Departamento de Engenharia de Alimentos.</p> <p>Área de Concentração: Ciências da Engenharia de Alimentos.</p> <p>Orientador: Profa. Dra. Rosemary Aparecida de Carvalho.</p> <p>1. Filme 2. Proteína 3. Bioativo 4. Sorbitol 5. Citrato de acetiltributíla 6. Caracterização. I. Título.</p>
-------	--

AGRADECIMENTOS

À Deus por sempre iluminar minha vida e pelas oportunidades a mim concedidas.

À Profa. Dra. Rosemary Aparecida de Carvalho pela orientação, ensinamentos transmitidos, dedicação e exigência, para que sempre o melhor fosse realizado.

À CAPES por conceder a bolsa de mestrado, que permitiu dedicação exclusiva a este trabalho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pelo fundamental auxílio financeiro a este projeto.

Ao Prof. Dr. Paulo José do Amaral Sobral pela disponibilidade de uso do Laboratório de Tecnologia de Alimentos, o que permitiu a realização deste trabalho.

À Profa. Dra. Carmen Sílvia Fávaro Trindade por permitir o uso da própolis como composto bioativo, disponibilizar o Laboratório de Produtos Funcionais, auxílio técnico na parte microbiológica e interesse neste trabalho.

À Profa. Dra. Eliana Setsuko Kamimura por permitir o uso do Laboratório de Bioprocessos nas análises microbiológicas.

À Ana Mônica Bittante pelas análises e ensinamentos transmitidos.

À Ednelí Monterrey Quintero por realizar as análises de cor.

Ao Guilherme Silva e ao Nilson Ferreira por gentilmente terem sempre me ajudado quando foi preciso.

Ao Marcelo Thomazini pela disponibilidade e gentileza constantes, pelo apoio técnico que tanto me ajudou, pelas conversas e incentivos.

Ao Felipe Correa e ao Felipe Carrion pela colaboração essencial no início deste trabalho.

À Tayrine Demarchi, Laura Reyes e Leandro Remédio pela importante e fundamental ajuda na caracterização dos filmes, e que tornaram possível a conclusão deste projeto.

A todos os colegas de trabalho pelas conversas, risadas, e momentos de descontração que tornam tudo muito mais suave e divertido.

À Seção de Pós-Graduação, e em especial à Layla Denófrío, que realiza seu trabalho com paciência e dedicação.

À Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos pela estrutura que permitiu a realização deste trabalho.

Muito Obrigada a todos vocês.

RESUMO

BODINI, R. B. **Desenvolvimento de materiais poliméricos bioativos à base de gelatina e própolis**. 2011. 86f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2011.

O interesse na aplicação de embalagens ativas para conservação de alimentos tem aumentado, bem como uma maior demanda por substâncias antimicrobianas naturais, devido à maior consciência dos consumidores quanto aos potenciais riscos à saúde ocasionados pelo consumo de compostos sintéticos. Entre os aditivos naturais, a própolis, por suas propriedades antibacteriana, antioxidante e antifúngica, tem despertado o interesse dos pesquisadores. Portanto, o objetivo deste trabalho foi investigar o efeito da adição do extrato etanólico de própolis (EEP) em filmes à base de gelatina plastificados com citrato de acetiltributílica (CA) ou sorbitol (S), nas propriedades funcionais (propriedades mecânicas, solubilidade, permeabilidade ao vapor de água, parâmetros de cor e opacidade) e a atividade antimicrobiana dos filmes contra *Staphylococcus aureus*. Para a produção do EEP, 30g de resina de própolis (tipo 12) foram misturadas com 100mL de álcool etílico 80%, e a solução foi mantida sob agitação mecânica (500rpm, 30minutos) a 50°C, e filtrada após 24horas sob refrigeração. Os filmes foram produzidos por *casting* com 2g de gelatina/100g de solução filmogênica, 30g de CA ou S/100g de gelatina, 35g de lecitina/100g de plastificante e o EEP nas concentrações de 0, 5, 40 ou 200g/100g de gelatina, e avaliados quanto às suas propriedades mecânicas (tração e perfuração), solubilidade em água (Sol), cor e opacidade, permeabilidade ao vapor de água (PVA), espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) e microscopia eletrônica de varredura, após acondicionamento (5 dias, UR = 58%, T = 25°C). A atividade antimicrobiana dos filmes contra *Staphylococcus aureus* foi analisada pelo método da difusão em ágar. A incorporação de EEP causou variação na tensão (T) dos filmes com CA (58,7 a 66,4MPa), mas afetou mais intensamente os filmes com S (31,7 a 50,4MPa). Quanto à elongação (%), os filmes (CA e S) também apresentaram variações. Na perfuração, verificou-se que a adição de EEP não afetou significativamente a força máxima para ambos os plastificantes. Para a solubilidade em água, o filme com CA apresentou aumento significativo (Sol = 18,6%) para 200% de EEP, contudo, os filmes com S praticamente não variaram. Quanto à cor, para ambos os plastificantes estudados (CA e S) o aumento da concentração de EEP promoveu alterações significativas de L*, a*, b*, ΔE^* e opacidade. As análises de PVA dos filmes (CA e S) mostraram que o aumento na concentração de EEP aumentou a

propriedade de barreira dos filmes. Segundo a análise de FTIR, os filmes aditivados não apresentaram mudanças estruturais em relação ao controle, o que sugere que o EEP encontra-se disperso na matriz. As micrografias mostraram que a adição de EEP causou alterações, principalmente, nos filmes plastificados com S. A atividade contra *S. aureus* foi observada para os filmes (CA e S) com 40 e 200% de EEP, com aumento significativo do diâmetro de inibição em função do aumento da concentração de EEP. Os filmes mantiveram sua atividade antimicrobiana durante 177 dias de armazenamento. Estes resultados demonstraram a capacidade antimicrobiana dos filmes de gelatina aditivados com própolis, bem como sua estabilidade em função do tempo.

Palavras-chave: filme, proteína, bioativo, sorbitol, citrato de acetiltributíla, caracterização.

ABSTRACT

BODINI, R. B. **Development of bioactive gelatin and propolis based polymeric materials.** 2011. 86f. M.Sc. Dissertation – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2011.

The interest in the use of active packaging for food conservation has increased, along with a higher demand for natural antimicrobial substances, due to higher consumer awareness of the potential health risks caused by synthetic compounds consumption. Among natural additives, propolis, has awakened the interest of the researchers for its antibacterial, antioxidant and antifungal properties. Thus, the aim of this work was to investigate the effect of the addition of an ethanolic propolis extract (EPE) to gelatin-based films plasticized with acetyltributyl citrate (AC) or sorbitol (S), on the functional properties (mechanical properties, solubility, water vapor permeability, color parameters and opacity) and the antimicrobial activity of the films against *Staphylococcus aureus*. For the EPE production, 30g of the propolis resin (type 12) were mixed with 100mL ethyl alcohol (80%), and the solution was maintained under mechanical stirring (500rpm, 30minutes) at 50°C, and filtered after 24hours under refrigeration. The films were produced by casting, using 2g of gelatin/100g of film forming solution, 30g of AC or S/100 g of gelatin, 35g of lecithin/100g of plasticizer and EPE in the concentrations of 0, 5, 40 or 200g/100g of gelatin, and evaluated for their mechanical properties (traction and puncture tests), water solubility (Sol), color and opacity, water vapor permeability (WVP), Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) and scanning electron microscopy, after storage (5 days, relative humidity = 58%, temperature = 25°C). The antimicrobial activity of the films against *Staphylococcus aureus* was analyzed by agar diffusion method. The EPE addition caused variation of the tensile strength (T) of the films with AC (58.7 a 66.4MPa), but affected more intensely the films with S (31.7 a 50.4MPa). The films (AC and S) also presented variations for the elongation (%). For the puncture force, the addition did not affect significantly the maximum force for any of the plasticizers. For the water solubility, the films with AC presented significant increase (Sol = 18,6%) for 200% of EPE, however the films with S did not vary. For both plasticizers studied (AC and S), the increase of EPE concentration promoted significant changes of the color parameters, L*, a*, b*, ΔE^* and opacity. The WVP analysis of the films (AC and S) showed that the increase of the EPE concentration increased the barrier property of the films. According to FTIR analysis, the EPE addition in the films did not present structural changes

compared to the control, suggesting that the EPE was disperse in the protein matrix. The micrographs showed that the EPE addition caused changes mainly in films plasticized with S. The activity against *S. aureus* was observed for the films containing 40 and 200% of EPE, with significant increase of inhibition diameter with increase of EPE concentration. The films kept their antimicrobial activities during 177 days of storage. These results demonstrated the antimicrobial capacity of gelatin-based films added of propolis, and their stability in time.

Keywords: film, protein, bioactive, sorbitol, acetyltributyl citrate, characterization.

Lista de Figuras

- Figura 1** - Extrato etanólico de própolis utilizado na produção de filmes à base de gelatina plastificados com citrato de acetiltributíla e sorbitol..... 30
- Figura 2** - Diagrama CIELab para os parâmetros de cor L^* , a^* e b^* 30
- Figura 3** - Filmes à base de gelatina plastificados com citrato de acetiltributíla (CA) ou sorbitol (S) com diferentes concentrações de extrato etanólico de própolis (C_{EEP}): (a) CA, $C_{EEP} = 0\text{g}/100\text{g}$ de gelatina; (b) CA, $C_{EEP} = 5\text{g}/100\text{g}$ de gelatina; (c) CA, $C_{EEP} = 40\text{g}/100\text{g}$ de gelatina; (d) CA, $C_{EEP} = 200\text{g}/100\text{g}$ de gelatina; (e) S, $C_{EEP} = 0\text{g}/100\text{g}$ de gelatina; (f) S, $C_{EEP} = 5\text{g}/100\text{g}$ de gelatina; (g) S, $C_{EEP} = 40\text{g}/100\text{g}$ de gelatina e (h) S, $C_{EEP} = 200\text{g}/100\text{g}$ de gelatina. 37
- Figura 4** - Espectros de infravermelho de filmes à base de gelatina plastificados com citrato de acetiltributíla e diferentes concentrações de extrato etanólico de própolis (C_{EEP}). 40
- Figura 5** - Espectros de infravermelho de filmes à base de gelatina plastificados com sorbitol e diferentes concentrações de extrato etanólico de própolis (C_{EEP}). 41
- Figura 6** - Imagens fotográficas obtidas por microscopia eletrônica de varredura dos filmes plastificados com citrato de acetiltributíla e com diferentes concentrações de extrato etanólico de própolis (C_{EEP}): (a) $C_{EEP} = 0\text{g}/100\text{g}$ de gelatina; imagem da superfície (6.000x); (b) $C_{EEP} = 0\text{g}/100\text{g}$ de gelatina; imagem da fratura (6.000x); (c) $C_{EEP} = 5\text{g}/100\text{g}$ de gelatina; imagem da superfície (6.000x); (d) $C_{EEP} = 5\text{g}/100\text{g}$ de gelatina; imagem da fratura (6.000x); (e) $C_{EEP} = 40\text{g}/100\text{g}$ de gelatina; imagem da superfície (6.000x); (f) $C_{EEP} = 40\text{g}/100\text{g}$ de gelatina; imagem da fratura (6.000x); (g) $C_{EEP} = 200\text{g}/100\text{g}$ de gelatina; imagem da superfície (6.000x); (h) $C_{EEP} = 200\text{g}/100\text{g}$ de gelatina; imagem da fratura (6.000x). 42
- Figura 7** - Imagens fotográficas obtidas por microscopia eletrônica de varredura dos filmes plastificados com sorbitol e com diferentes concentrações de extrato etanólico de própolis (C_{EEP}): (a) $C_{EEP} = 0\text{g}/100\text{g}$ de gelatina; imagem da superfície (6.000x); (b) $C_{EEP} = 0\text{g}/100\text{g}$ de gelatina; imagem da fratura (6.000x); (c) $C_{EEP} = 5\text{g}/100\text{g}$ de gelatina; imagem da superfície (6.000x); (d) $C_{EEP} = 5\text{g}/100\text{g}$ de gelatina; imagem da fratura (6.000x); (e) $C_{EEP} = 40\text{g}/100\text{g}$ de gelatina; imagem da superfície (6.000x); (f) $C_{EEP} = 40\text{g}/100\text{g}$ de gelatina; imagem da fratura (6.000x); (g) $C_{EEP} = 200\text{g}/100\text{g}$ de gelatina; imagem da superfície (6.000x); (h) $C_{EEP} = 200\text{g}/100\text{g}$ de gelatina; imagem da fratura (6.000x)..... 44

Figura 8 - Atividade antimicrobiana dos filmes plastificados com citrato de acetiltributíla contra *S. aureus*: (a) $C_{EEP} = 0\text{g}/100\text{g}$ de gelatina e (b) $C_{EEP} = 5\text{g}/100\text{g}$ de gelatina.....46

Figura 9 - Atividade antimicrobiana dos filmes plastificados com sorbitol contra *S. aureus*: a) $C_{EEP} = 0\text{g}/100\text{g}$ de gelatina e (b) $C_{EEP} = 5\text{g}/100\text{g}$ de gelatina46

Figura 10 - Diâmetro de inibição microbiana (mm) contra *S. aureus* versus tempo de armazenamento (dias) dos filmes plastificados com citrato de acetiltributíla para diferentes concentrações de extrato etanólico de própolis (C_{EEP}). (Letras minúsculas diferentes, para cada concentração de EEP, indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre o tempo de armazenamento. Diferença entre as médias obtidas através do teste Duncan, utilizando-se o programa computacional SAS).....50

Figura 11 - Diâmetro de inibição microbiana (mm) contra *S. aureus* versus tempo de armazenamento (dias) dos filmes plastificados com sorbitol para diferentes concentrações de extrato etanólico de própolis (C_{EEP}). (Letras minúsculas diferentes, para cada concentração de EEP, indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre o tempo de armazenamento. Diferença entre as médias obtidas através do teste Duncan, utilizando-se o programa computacional SAS.)51

Figura 12 - Atividade antimicrobiana dos filmes plastificados com citrato de acetiltributíla e aditivados com 40g EEP/100g de gelatina contra *S. aureus* em função do tempo de armazenamento: (a) 0 dias, (b) 14 dias, (c) 28 dias, (d) 56 dias, (e) 84 dias, (f) 112 dias, (g) 134 dias, (h) 156 dias e (i) 177 dias.....52

Figura 13 - Atividade antimicrobiana dos filmes plastificados com citrato de acetiltributíla e aditivados com 200g EEP/100g de gelatina contra *S. aureus* em função do tempo de armazenamento: (a) 0 dias, (b) 14 dias, (c) 28 dias, (d) 56 dias, (e) 84 dias, (f) 112 dias, (g) 134 dias, (h) 156 dias e (i) 177 dias.....53

Figura 14 - Atividade antimicrobiana dos filmes plastificados com sorbitol e aditivados com 40g EEP/100g gelatina contra *S. aureus* em função do tempo de armazenamento: (a) 0 dias, (b) 14 dias, (c) 28 dias, (d) 56 dias, (e) 84 dias, (f) 112 dias, (g) 134 dias, (h) 156 dias e (i) 177 dias.....54

Figura 15 - Atividade antimicrobiana dos filmes plastificados com sorbitol e aditivados com 200g EEP/100g gelatina contra *S. aureus* em função do tempo de armazenamento: (a) 0 dias,

(b) 14 dias, (c) 28 dias, (d) 56 dias, (e) 84 dias, (f) 112 dias, (g) 134 dias, (h) 156 dias e (i) 177 dias.....55

Figura 16 - Diâmetro de inibição microbiana (mm) contra *S. aureus* versus tempo de armazenamento (dias) do extrato etanólico de própolis. (Letras minúsculas diferentes, para cada concentração de EEP, indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre o tempo de armazenamento. Diferença entre as médias obtidas através do teste Duncan, utilizando-se o programa computacioal SAS).....59

Figura 17 - Atividade antimicrobiana do extrato etanólico de própolise contra *S. aureus* em função do tempo de armazenamento: a) 0 b) 14 c) 28 d) 56 e) 84 f) 112 g)134 h) 156 i) 177 dias.....60

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Concentração de polifenóis ($C_{\text{Polifenóis}}$) e parâmetros de cor (L^* , a^* e b^*) do extrato etanólico de própolis (EEP).....	29
Tabela 2 - Tensão na ruptura (T), alongação (E) e módulo elástico (ME) dos filmes plastificados com citrato de acetiltributíla (CA) e sorbitol (S) em função da concentração de extrato etanólico de própolis (C_{EEP}).	31
Tabela 3 - Força máxima (F) e deformação (D) dos filmes plastificados com citrato de acetiltributíla (CA) e sorbitol (S) em função da concentração de extrato etanólico de própolis (C_{EEP}).	34
Tabela 4 - Solubilidade (Sol) e umidade (U) dos filmes plastificados com citrato de acetiltributíla (CA) e sorbitol (S) em função da concentração de extrato etanólico de própolis (C_{EEP}).	35
Tabela 5 - Luninosidade (L^*), croma a^* (a^*), croma b^* (b^*), diferença total de cor (ΔE^*) e opacidade dos filmes à base de gelatina plastificados com citrato de acetiltributíla (CA) e sorbitol (S) em função da concentração de extrato etanólico de própolis (C_{EEP}).	36
Tabela 6 - Permeabilidade ao vapor de água (PVA) dos filmes plastificados com citrato de acetiltributíla (CA) e sorbitol (S) em função de diferentes concentrações de extrato etanólico de própolis (C_{EEP}).	39
Tabela 7 - Concentração de polifenóis ($C_{\text{Polifenóis}}$) e diâmetro de inibição microbiana ($D_{\text{Inibição}}$) para os filmes plastificados com citrato de acetiltributíla (CA) e sorbitol (S) em função da concentração de extrato etanólico de própolis (C_{EEP}).	45
Tabela 8 - Concentração de polifenóis ($C_{\text{Polifenóis}}$) para os filmes plastificados com citrato de acetiltributíla (CA) com diferentes concentrações de extrato etanólico de própolis (C_{EEP}) em função do tempo de armazenamento.	48
Tabela 9 - Concentração de polifenóis ($C_{\text{Polifenóis}}$) para os filmes plastificados com sorbitol com diferentes concentrações de extrato etanólico de própolis (C_{EEP}) em função do tempo de armazenamento.	49

Tabela 10 - Efeito do tempo de armazenamento (t) nos parâmetros de cor (L^* , a^* e b^*), diferença total de cor (ΔE^*) e opacidade dos filmes à base de gelatina plastificados com citrato de acetiltributíla e aditivados com diferentes concentrações de extrato etanólico de própolis (C_{EEP}).....56

Tabela 11 - Efeito do tempo de armazenamento (t) nos parâmetros de cor (L^* , a^* e b^*), diferença total de cor (ΔE^*) e opacidade dos filmes à base de gelatina plastificados com sorbitol e aditivados com diferentes concentrações de extrato etanólico de própolis (C_{EEP})...57

Tabela 12 - Concentração de polifenóis ($C_{polifenóis}$) do extrato etanólico de própolis em função do tempo de armazenamento (t).58

Tabela 13 - Efeito do tempo de armazenamento (t) nos parâmetros de cor (L^* , a^* e b^*) do extrato etanólico de própolis..... 60

Sumário

RESUMO.....	iv
ABSTRACT	vi
Lista de Figuras	viii
Lista de Tabelas	xi
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1. Própolis	3
2.1.1. Variabilidade de composição química e atividade antimicrobiana	4
2.1.2. Composição e variabilidade da própolis brasileira.....	7
2.1.3. Atividade antioxidante	9
2.1.4. Aplicações	10
2.2. Embalagens Ativas.....	12
2.2.1. Compostos bioativos	13
2.2.1.1. Óleos essenciais	13
2.2.1.2. Ácidos orgânicos e nisina.....	15
2.2.1.3. Outros bioativos	17
2.2.2. Aplicações	19
3. MATERIAL E MÉTODOS	21
3.1. Material.....	21
3.2. Extração e caracterização da própolis	21
3.2.1. Extração da própolis.....	21
3.2.2. Caracterização do extrato etanólico de própolis	22
3.3. Produção dos filmes	22
3.3.1. Filme plastificado com sorbitol.....	22
3.3.2. Filme plastificado com citrato de acetiltributíla.....	23
3.4. Caracterização dos filmes bioativos	23

3.4.1.	<i>Propriedades mecânicas</i>	24
3.4.2.	<i>Solubilidade em água</i>	24
3.4.3.	<i>Cor e opacidade</i>	25
3.4.4.	<i>Permeabilidade ao vapor de água</i>	26
3.4.5.	<i>Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)</i>	26
3.4.6.	<i>Microestrutura dos filmes</i>	26
3.5.	Avaliação do efeito do tempo de armazenamento na concentração de polifenóis e na atividade antimicrobiana dos filmes bioativos	27
3.5.1.	<i>Concentração de polifenóis</i>	27
3.5.2.	<i>Atividade antimicrobiana</i>	28
3.6.	Análise estatística	28
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
4.1.	Caracterização do extrato etanólico de própolis	29
4.2.	Caracterização dos filmes bioativos	30
4.2.1.	<i>Propriedades mecânicas</i>	30
4.2.1.1.	<i>Tração</i>	30
4.2.1.2.	<i>Perfuração</i>	33
4.2.2.	<i>Solubilidade em água</i>	34
4.2.3.	<i>Cor e opacidade</i>	36
4.2.4.	<i>Permeabilidade ao vapor de água</i>	38
4.2.5.	<i>Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)</i>	39
4.2.6.	<i>Microscopia eletrônica de varredura</i>	41
4.2.7.	<i>Atividade antimicrobiana e concentração de polifenóis</i>	45
4.3.	Avaliação do efeito do tempo de armazenamento na concentração de polifenóis, atividade antimicrobiana, cor e opacidade dos filmes aditivados com extrato etanólico de própolis	47
4.3.1.	<i>Concentração de polifenóis</i>	47
4.3.2.	<i>Atividade antimicrobiana</i>	49

4.3.3. <i>Parâmetros de cor e opacidade</i>	55
4.4. Avaliação do efeito do tempo de armazenamento na concentração de polifenóis, atividade antimicrobiana e cor do extrato etanólico de própolis	58
5. CONCLUSÃO.....	61
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	62

1. INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, a pesquisa sobre embalagens tem dado maior atenção aos filmes biodegradáveis, produzidos a partir de biopolímeros naturais tais como proteína do milho, glúten do trigo, proteína de soja, proteínas do soro de leite, albumina, colágeno, quitosana, celulose, pectina, além de algumas fontes microbianas (THARANATHAN, 2003). Dentre as macromoléculas naturais, a gelatina devido a suas propriedades funcionais, produção em larga escala e baixo custo, vem sendo intensamente utilizada em diversos trabalhos na produção de filmes comestíveis e/ou biodegradáveis (CAO; YANG; FU, 2009; CARVALHO; GROSSO, 2004; SOBRAL et al., 2001; THOMAZINE; CARVALHO; SOBRAL, 2005, VANIN et al., 2005).

Além disso, devido à preocupação constante em se prevenir a deterioração química e, principalmente, microbiológica dos alimentos (CHEN; WANG; WEG, 2010), o interesse em embalagens ativas tem aumentado, pois além de preservação do alimento, este tipo de sistema pode apresentar funcionalidade adicional como suporte de substâncias antioxidantes e antimicrobianas. Assim, a incorporação de compostos antimicrobianos em filmes biodegradáveis promoveria um novo meio para a melhoria da segurança e da vida de prateleira de alimentos prontos para o consumo (CAGRI; USTUNOL; RYSER, 2001).

Assim, na seleção de compostos bioativos, tais como agentes antimicrobianos, deve ser considerado que estes compostos, para aplicação em filmes ou recobrimentos comestíveis, devem ter grau alimentício e que sejam, preferencialmente, substâncias naturais (CHEN; WANG; WEG, 2010), principalmente, devido aos efeitos adversos causados por substâncias sintéticas ao ambiente e à saúde dos consumidores.

Muitas substâncias naturais como enzimas, bacteriocinas e óleos essenciais têm sido estudadas por suas propriedades funcionais como aditivos em filmes biodegradáveis. No entanto, uma substância natural amplamente encontrada e que apresenta elevado potencial para atuar como aditivo em materiais poliméricos é a própolis.

Coletada por abelhas melíferas, a própolis é uma resina fortemente adesiva que tem sido utilizada pelo homem desde tempos antigos devido suas propriedades farmacológicas (BURDOCK, 1998). Sua composição química é complexa, mas basicamente consiste de ceras, resinas, água, compostos inorgânicos, fenólicos e óleos essenciais, mas a exata composição depende da fonte vegetal (MARCUCCI, 1995; BURDOCK, 1998). A amplitude das atividades farmacológicas da própolis é maior em regiões tropicais do planeta e menor nas

regiões temperadas, uma vez que nas regiões tropicais a diversidade vegetal é muito superior à diversidade observada nas regiões temperadas (BANKOVA, 2005). Apesar do grande uso da própolis na medicina popular e de relatos que comprovam sua funcionalidade, os estudos científicos vêm corroborando que a própolis possui um grande potencial terapêutico, principalmente, em relação às atividades antiinflamatória, antimicrobiana, antineoplásica e antioxidante (MENEZES, 2005).

Embora muitos estudos na área de embalagens ativas sejam encontrados, enfatizando inclusive o uso de substâncias naturais com propriedades funcionais, a própolis não apresenta papel de destaque para essa aplicação, embora apresente inúmeras outras aplicações como cápsulas, cremes, pomadas, pastilhas, entre outros. Desta forma, a produção de embalagens biodegradáveis ativas utilizando-se a própolis como agente antimicrobiano apresenta um enorme potencial, principalmente devido à escassez de estudos que confirmem tal propriedade.

Assim, o objetivo deste trabalho foi a produção e caracterização de filmes poliméricos à base de gelatina aditivados com diferentes concentrações de extrato etanólico de própolis. Adicionalmente foi avaliado o efeito do tempo de armazenamento na estabilidade da concentração de polifenóis e da atividade antimicrobiana da própolis na matriz polimérica

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Própolis

A própolis é uma poderosa substância natural largamente utilizada na medicina popular e que tem ganhado destaque nas pesquisas científicas. Própolis é uma denominação genérica utilizada para descrever uma mistura complexa de substâncias resinosas, gomosas e balsâmicas colhidas por abelhas melíferas de brotos, flores e exsudatos de plantas, onde as abelhas acrescentam secreções salivares, cera e pólen para a elaboração do produto final (GHISALBERTI, 1979). A composição química e a atividade farmacológica da própolis podem variar de acordo com a espécie vegetal, local e período de coleta (MARCUCCI, 1995).

Inúmeras propriedades biológicas têm sido associadas à própolis, tais como atividade antibacteriana, antiviral, antifúngica, antiinflamatória, antitumoral e antioxidante (CARVALHO et al. 2011; CHAILLOU; NAZARENO, 2009; KUJUMGIEV et al., 1999; LASKAR et al., 2010; PARK et al., 1998a; PAULINO et al., 2008; VARDAR-ÜNLÜ; SILICI; ÜNLÜ, 2008). Em razão destas propriedades, suas aplicações incluem, por exemplo, cicatrização de feridas, regeneração de tecidos, tratamento de queimaduras, estomatites, doenças periodontais, resfriados. Adicionalmente, é usada em cremes dentais, soluções bucais e produtos cosméticos (BURDOCK, 1998). Os principais compostos químicos isolados da própolis até o momento podem ser organizados em alguns grupos principais como: ácidos e ésteres alifáticos, ácidos e ésteres aromáticos, açúcares, álcoois, aldeídos, ácidos graxos, aminoácidos, esteróides, cetonas, charconas e di-hidrocharconas, flavonóides, terpenóides, proteínas, vitaminas B1, B2, B6, C, E, bem como diversos minerais (MENEZES, 2005). Dentre estes grupos de compostos, o grupo dos flavonóides, que são membros de uma classe de compostos naturais que tem sido objeto de um considerável interesse científico e terapêutico, certamente é o que mais vem chamando a atenção dos pesquisadores (HAVSTEEN, 2002). A ingestão de flavonóides interfere em diversos processos fisiológicos, auxiliando na absorção e na ação de vitaminas, atuando nos processos de cicatrização como antioxidantes, além de apresentarem atividade antimicrobiana e moduladora do sistema imune (WILLIAMS; SPENCER; RICE-EVANS, 2004). Todavia, a capacidade da própolis em inibir o crescimento de microrganismos é a atividade farmacológica mais popularmente conhecida e comprovada cientificamente (MENEZES, 2005), e por isso vários pesquisadores têm demonstrado esta propriedade contra diferentes microrganismos.

Além da atividade farmacológica, um importante aspecto relacionado à pesquisa da própolis refere-se à sua origem botânica e a conseqüente variação em sua composição química quando amostras de diferentes origens geográficas são comparadas (SALATINO et al., 2005).

2.1.1. Variabilidade de composição química e atividade antimicrobiana

A composição da própolis depende sobretudo da vegetação da área de onde é coletada. Por causa da diferença climática e geográfica, a própolis da Europa, América do Norte e do Sul, Ásia e África apresentam diferente composição química (MARCUCCI, 1995).

Na Tabela 1 podem-se observar alguns exemplos da variabilidade da composição química da própolis em função de sua origem geográfica.

Tabela 1 - Composição de ácidos aromáticos, ésteres de ácidos fenólicos e flavonóides (principais tipos de compostos) em amostras de extratos etanólicos de própolis de diferentes origens geográficas.

Local	Ácidos aromáticos (%)	Ésteres de ácidos fenólicos (%)	Flavonóides (%)
Bulgária	3	24	42
Mongolia	4	35	24
Albânia	4	53	38
Egito	2	12	5
Rio Claro	31	-	+
Prudentópolis	30	-	-
Pacajus	3	-	-
Limeira	14	1	+

(+) detectado, mas não quantificado; (-) não detectado (Fonte: Kujumgiev et al., 1999).

Gardana et al. (2007) também analisaram amostras de própolis de diferentes origens geográficas (França, Alemanha, Rússia, Croácia, Argentina, Uruguai, Chile, Peru, Paraguai, Canadá, Macedônia, Coreia, China, Polônia, Bulgária, Itália e Brasil) e verificaram que, com exceção do Brasil, os flavonóides mais abundantes foram chrysin, pinocembrina, pinobanksin e galangina. Na própolis brasileira foram identificados, principalmente, artepillin C, diferentes ácidos cafeoilquínicos e alguns flavonóides

Devido a esta variabilidade, principalmente geográfica, muitos autores relacionam a composição química da própolis com suas atividades biológicas.

Kujumgiev et al. (1999) investigaram as atividades antibacteriana (*Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*), antifúngica (*Candida albicans*) e antiviral de amostras de própolis

de diferentes origens geográficas, e verificaram que apesar das diferenças na composição química, todas as amostras exibiram significativa atividade antibacteriana e antifúngica, e a maioria delas apresentou propriedade antiviral, mas nenhuma foi ativa contra *E. coli* (bactéria Gram-negativa). De acordo com estes autores, a diferença química das amostras mostra que não é uma única substância ou uma classe específica de substâncias que responde pela ação biológica da própolis, mas sim a combinação dos diferentes compostos presentes.

O extrato etanólico da própolis iraniana (MOHAMMADZADEH et al., 2007), também foi avaliado quanto à sua atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas (*Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Bacillus subtilis*), Gram-negativas (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*) e fungos (*Candida albicans*; *Aspergillus niger*), sendo verificado que o mesmo inibiu o crescimento de todos os microrganismos testados, embora tenha apresentando maior atividade contra as bactérias Gram-positivas. Quanto à composição química da própolis estudada, foram identificados altos níveis de flavononas e flavonóis, além de ácidos alifáticos, ácidos aromáticos e seus ésteres.

Estudos realizados com extratos de própolis da cidade de Kayseri na Turquia (VARDAR-ÜNLÜ; SILICI; ÜNLÜ, 2008) mostraram que os mesmos inibiram a maioria de microrganismos clinicamente importantes em um largo espectro, incluindo fungos patogênicos, mas não bactérias Gram-negativas, que foram resistentes a altas doses dos extratos testados neste estudo. As bactérias mais susceptíveis aos extratos foram *Mycobacterium smegmatis*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes* e os fungos *Candida albicans* e *Candida krusei*. Como esperado, o extrato analisado mostrou uma composição característica da própolis derivada da espécie vegetal do gênero *Populus*, contendo o flavonóide pinobanksin e ácidos aromáticos como os ácido caféico e ferúlico e seus ésteres (VARDAR-ÜNLÜ; SILICI; ÜNLÜ, 2008).

Chaillou e Nazareno (2009) verificaram que cerca de 77% das amostras de própolis coletadas de Santiago Del Estero (Argentina) apresentaram efeito inibitório sobre *Staphylococcus aureus*, sendo também observada correlação, estatisticamente significativa, entre esta atividade e o conteúdo de polifenóis e de flavonóides, que variaram, respectivamente, de 92 a 187mg de ácido gálico/g de própolis e de 6 a 18mg de quercetina/g de própolis. As amostras estudadas apresentaram considerável concentração do flavonóide pinocembrina, considerado, segundo Marcucci (1995), o flavonóide mais efetivo contra *S. aureus*.

Extratos etanólicos de própolis da Grécia, ilhas gregas e leste do Chipre apresentaram polifenóis entre 11,9 e 373,5mg/g de extrato, e exibiram significante atividades antioxidante,

antibacteriana e antifúngica, afetando um espectro mais largo de microrganismos, quando comparados à nisina (KALOGEROPOULOS et al., 2009).

Schnitzler et al. (2010) analisaram a composição da própolis coletada da Morávia (República Tcheca) e identificaram polifenóis, flavonóides e ácidos fenilcarboxílicos como seus principais constituintes. Em Portugal, Falcão et al. (2010) caracterizaram a própolis do nordeste do país, identificando 37 compostos fenólicos, que incluem não somente os típicos ácidos fenólicos e flavonóides encontrados na própolis de zonas temperadas, mas também vários compostos cuja ocorrência ainda não havia sido referida na literatura.

Em relação a outros fatores de variação, Sforzin et al. (2000) analisaram a atividade antimicrobiana da própolis brasileira (Botucatu, SP) coletada durante as quatro estações do ano, objetivando avaliar o efeito da sazonalidade nesta atividade. Segundo este estudo, o crescimento de *Staphylococcus aureus*, bactéria Gram-positiva, foi susceptível a baixas concentrações de própolis (0,4%). No entanto, para as bactérias Gram-negativas (*Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* e *Salmonella typhimurium*) a concentração mínima inibitória variou de 4,5 a 8%. Quanto à sazonalidade, não houve diferença significativa na curva de sobrevivência dos microrganismos. Este resultado talvez possa ser explicado pelo fato de que esta própolis foi obtida de uma mesma região geográfica, e, possivelmente, as diferenças na composição química e atividade biológica estejam relacionadas principalmente à flora de diferentes regiões.

Por outro lado, estudos relacionados com a atividade antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus* do extrato etanólico da própolis coletada em diferentes períodos (junho, agosto e outubro-novembro) e de várias regiões de Taiwan mostraram atividade antibacteriana superior na própolis coletada no mês de agosto (LU; CHEN; CHOU, 2005).

Segundo Silici e Kutluca (2005), diferentes amostras de própolis, coletadas em um mesmo apiário e produzidas por três espécies diferentes de *Apis mellifera*, mostraram alta atividade contra *Staphylococcus aureus*, mas fraca eficácia contra *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Candida albicans*. A amostra de própolis produzida por *Apis mellifera caucásica* mostrou atividade antimicrobiana mais alta quando comparada às outras duas espécies, *Apis mellifera anatolica* e *Apis mellifera carnica*, que pode ser atribuída à sua composição química e concentração dos compostos encontrados.

2.1.2. Composição e variabilidade da própolis brasileira

A própolis brasileira tem sido classificada em 12 grupos com base em suas características físico-químicas, sendo cinco na região sul, um na região sudeste e seis no nordeste brasileiro (PARK; ALENCAR; AGUIAR, 2002). Entre estes, a própolis do grupo 12, conhecida como própolis verde, tem ganhado preferência no mercado mundial de própolis (SALATINO et al., 2005).

A espécie, *Baccharis dracunculifolia*, conhecida popularmente como alecrim do campo, é considerada a principal fonte vegetal da própolis do tipo 12 (PARK; ALENCAR; AGUIAR, 2002), que é coletada nos estados de São Paulo e Minas Gerais, e rica em derivados fenólicos do ácido cinâmico (ALENCAR et al., 2005; PARK et al., 2004). A própolis verde é dura e quebradiça, exala um aroma resinoso agradável e sua cor varia entre amarelo esverdeado e verde escuro (SALATINO et al., 2005).

As várias atividades biológicas da própolis brasileira têm sido principalmente atribuídas à presença de compostos fenólicos, principalmente os flavonóides e ácidos fenólicos (FUNARI; FERRO, 2006), que também são encontrados em *B. dracunculifolia*. Um importante ácido fenólico presente na própolis brasileira e também em *B. dracunculifolia* é o ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico (DHCA), conhecido como artepillin C (LEE et al., 2007; PARK et al., 2004).

Na Tabela 2 encontram-se os resultados das análises quantitativas do perfil de flavonóides e de outros compostos fenólicos de extratos etanólicos de própolis do grupo 12 e de exsudatos resinosos de *B. dracunculifolia* (Park et al., 2004), sendo que estes autores também verificaram que o composto artepillin C foi encontrado em concentrações mais elevadas quando comparado aos demais constituintes químicos (Tabela 2).

A análise de amostras de própolis de três localidades de Minas Gerais (Itapecerica, Paulo Cândido e Virginópolis), realizada por Teixeira et al. (2010), revelou que os compostos fenólicos encontrados foram principalmente derivados do ácido cinâmico, sendo o composto artepillin C encontrado na proporção de 8,7 e 14,9%, nas amostras de Itapecerica e Paulo Cândido, respectivamente. Na amostra de Virginópolis não foram detectadas substâncias fenólicas, contendo principalmente triterpenóides. Os autores também verificaram que as análises do total de fenólicos e da atividade antioxidante das amostras de Itapecerica, coletadas mensalmente por um ano, revelaram considerável variação. No estudo também não foi observada nenhuma correlação entre a atividade antioxidante e o conteúdo total de fenólicos ou de artepillin C.

Tabela 2 - Composição química da própolis do grupo 12 (G 12) e da espécie vegetal *Baccharis dracunculifolia*.

Composição química (mg/g de extrato)	Própolis G 12	<i>B. dracunculifolia</i>
Ácido cumárico	10,67	4,23
Ácido ferúlico	2,40	4,80
Ácido cinâmico	2,62	0,68
Pinobanksin	1,66	7,20
Kaempferol	1,30	1,10
Isosakuranetin	4,87	1,22
Chrysin	1,86	1,05
Acacetin	6,65	2,33
Kaempferide	12,57	8,15
Artepillin C	38,58	40,54

(Fonte: Park et al., 2004).

Como diversos estudos relatam que a composição química e a concentração de componentes específicos presentes nos extratos de própolis são dependentes da origem geográfica e da sazonalidade de coleta das abelhas, Silva et al. (2006) avaliaram a atividade antimicrobiana sobre *Staphylococcus aureus* e a atividade antioxidante de extratos de própolis produzidos em diferentes cidades brasileiras. Os autores concluíram que apesar das diferenças nos teores de polifenóis e de flavonóides todas as amostras exibiram atividade antimicrobiana e antioxidante, e que a composição da própolis não reflete diretamente a atividade biológica dos extratos.

Quando comparada a amostras de própolis de quatro regiões da Coréia, Choi et al. (2006) verificaram que a própolis brasileira apresentou um conteúdo total de polifenóis (120mg/g de extrato) mais baixo do que os extratos coreanos (160,6 a 212,7mg/g de extrato), entretanto, a atividade antimicrobiana (analisada através do método da difusão em ágar) de todos os extratos mostraram atividade contra *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Salmonella typhimurium* e *Candida albicans*.

Orsi et al. (2007) investigaram a susceptibilidade de *Salmonella typhimurium* e *Salmonella enteritidis* (bactérias Gram-negativas) à própolis proveniente de Brasil e Bulgária. As duas amostras de própolis mostraram ação antibacteriana contra as cepas de salmonela, todavia *S. typhimurium* mostrou-se mais resistente.

Koru, Toksoy, Acikel (2007) verificaram que a atividade antimicrobiana de amostras de própolis coletadas de diferentes regiões da Turquia e Brasil diferiram significativamente entre si, e que embora todos os extratos tenham sido efetivos contra as nove cepas de patógenos anaeróbios encontrados na cavidade oral, as bactérias Gram-positivas foram mais

susceptíveis do que as Gram-negativas. Quanto à composição, o estudo revelou que a porcentagem de flavonóides presentes na amostra de própolis brasileira foi consideravelmente mais baixa do que a própolis proveniente das diferentes áreas da Turquia. Kumazawa, Hamasaka e Nakayama (2004) também reportaram que o conteúdo total de polifenóis e de flavonóides da própolis brasileira foi mais baixo que amostras da Europa e China, que possuem muitos tipos de flavonóides e de ésteres de ácidos fenólicos (BANKOVA; CASTRO; MARCUCCI, 2000).

De um modo geral, os estudos realizados até o presente momento confirmam que, apesar das diferenças na composição química, a própolis sempre demonstra considerável atividade biológica, especialmente atividade antimicrobiana.

Além da atividade antibacteriana, outra funcionalidade da própolis que atualmente tem despertado a atenção de diversos pesquisadores é sua capacidade antioxidante, principalmente devido ao interesse das indústrias alimentícia, cosmética e farmacêutica em produtos naturais capazes de inibir processos oxidativos. A seguir são descritos trabalhos que estudam esta propriedade biológica da própolis.

2.1.3. Atividade antioxidante

É importante salientar que a capacidade antioxidante da própolis também é objeto de estudo. Park et al. (1998b) prepararam extratos etanólicos de própolis cujas concentrações de etanol variaram de 10 a 95% e verificaram que todos os extratos apresentaram atividade antioxidante, no entanto, os extratos de própolis obtidos com 70 e 80% de etanol foram os mais efetivos.

Nagai et al. (2003) avaliaram *in vitro* as propriedades do extrato aquoso de própolis contra a oxidação lipídica e inibição da formação de radicais livres e verificaram elevada atividade antioxidante do extrato, sendo que nas concentrações de 50 e 100mg/mL observaram inibição completa na formação do radical hidroxila e na produção de superóxidos. Os resultados deste estudo sugerem ainda, segundo os autores, que a própolis apresenta potencial farmacológico contra doenças relacionadas a processos oxidativos.

Ahn et al. (2007) estudaram amostras de própolis de várias regiões da China e verificaram nas mesmas elevada variabilidade no conteúdo de polifenóis totais (42,9 a 302mg/g de extrato etanólico de própolis) e de flavonóides (8,3 a 188mg/g de extrato etanólico de própolis), embora todas tenham apresentado forte atividade antioxidante. Laskar

et al. (2010) verificaram a alta capacidade antioxidante da própolis amarela proveniente da Índia, cujo extrato etanólico apresentou um total de polifenóis de aproximadamente 269mg de ácido gálico/g de extrato.

Moreira et al. (2008) em estudos de extratos de própolis de duas regiões de Portugal (Bornes e Fundão) verificaram elevada atividade antioxidante. Ainda em relação à própolis portuguesa, Miguel et al. (2010), avaliando várias amostras de Algarve (sul de Portugal), verificaram que maiores concentrações de compostos fenólicos foram identificados na primavera do que inverno e que a atividade antioxidante de amostras da área de Barrocal, que apresentaram as maiores concentrações de polifenóis, também foi superior.

A análise de quatro amostras de própolis da região de Veneto (Itália) identificou pinocembrina, carysin, galangina, éster fenetil do ácido caféico (CAPE), ácido caféico 1,1 dimetilalilcafeato (DMAC) e em menor quantidade quercetina, apigenina, naringenina e kaempferol como os principais componentes fenólicos, e mostrou que todos os extratos etanólicos apresentaram alta atividade antioxidante, expressa como a capacidade de inibição da peroxidação lipídica (GREGORIS; STEVANATO, 2010).

2.1.4. Aplicações

Em função dos diversos estudos que comprovam as propriedades biológicas da própolis, sobretudo a antimicrobiana, diversas aplicações, principalmente farmacológica, estão sendo estudadas.

Park et al. (1998a) estudaram a atividade antimicrobiana do extrato etanólico de própolis em *Streptococcus mutans*, microrganismo associado à formação de cáries, sendo verificado que todas as amostras analisadas exibiram ação inibitória sobre o crescimento da bactéria testada.

Marquele et al. (2006) desenvolveram emulsões de uso tópico contendo extrato de própolis e realizaram estudos de liberação controlada do aditivo. A atividade antioxidante da própolis foi comprovada, o que justifica seu uso em formulações para prevenir e tratar danos na pele, que continuamente é exposta a processos oxidativos. Também ficou evidente que esta atividade é função do sinergismo entre os vários compostos presentes no extrato.

Considerando que bactérias anaeróbias podem causar inúmeras infecções em humanos e que a resistência aos antibióticos tem sido encontrada em muitas espécies, Boyanova et al. (2006) avaliaram a atividade de extratos etanólicos de própolis (Bulgária) contra 94 cepas

clínicas de bactérias anaeróbias isoladas de pacientes com diferentes tipos de infecções. De acordo com este estudo, o uso do extrato de própolis resultou na inibição do crescimento da maioria (96,8%) de todas as cepas avaliadas, mostrando a possibilidade do uso da própolis na profilaxia ou tratamento de infecções orais e cutâneas.

Santos et al. (2008) realizaram um estudo com o objetivo de avaliar a eficácia clínica de uma formulação de um gel de própolis brasileira em pacientes diagnosticados com estomatite. O gel de própolis foi capaz de promover a cicatrização da área afetada em todos os pacientes, além de não ter sido relatado nenhum caso de sensibilidade ou alergia ao produto.

Mantovani et al. (2008) estudaram a atividade antimicrobiana do extrato etanólico de própolis de duas regiões brasileiras, além do sinergismo do extrato com drogas antimicrobianas comerciais. Cujos resultados mostraram que o extrato etanólico de própolis do sudeste foi mais efetivo na inibição do crescimento de *Staphylococcus* coagulase negativa, e em relação à melhora da eficácia das drogas testadas, a amostra do sul apresentou um maior sinergismo. Segundo esses autores, o sinergismo estudado torna a própolis uma alternativa relevante no tratamento de patógenos que apresentam resistência a várias drogas antimicrobianas.

A atividade antifúngica da própolis (Província de Tucumán, Argentina) foi analisada por Agüero et al. (2010), cujos resultados mostraram que as espécies mais susceptíveis foram os dermatófitos *Microsporum gypseum*, *Trichophyton mentagrophytes*, e *Trichophyton rubrum*, fungos causadores de infecções de pele, mas *Candida albicans*, *Candida tropicalis* e *Saccharomyces cerevisiae* também foram moderadamente inibidos. É interessante citar que os extratos de própolis apresentaram tanto ação fungistática como fugicida. Esse estudo mostra como os fungicidas naturais poderiam apresentar vantagens sobre os sintéticos, devido à boa eficácia e baixa toxicidade.

Alguns estudos sobre a aplicação da própolis em alimentos também têm sido realizados. Han e Park (2002) avaliaram o potencial de extratos de própolis para controlar a deterioração oxidativa em linguças preparadas a partir de carne de porco curada. As linguças receberam quatro tratamentos: extrato etanólico de própolis, extrato aquoso de própolis, resíduo seco de extrato etanólico de própolis e sorbato de potássio. Após 4 semanas de estocagem à 5°C, as linguças de todos os tratamentos apresentaram reduções no processo oxidativo em relação ao controle, sendo que o tratamento com o extrato etanólico de própolis foi o mais efetivo.

Gregory et al. (2008) avaliaram a eficácia de vapores de sub-frações polares e apolares de própolis sobre o controle microbiano e oxidativo durante a estocagem de arroz. Os vapores

de própolis controlaram a carga microbiana no arroz armazenado, limitando o crescimento das bactérias Gram-positivas remanescentes após o tratamento. As subfrações preparadas por extração com etanol absoluto foram as mais efetivas no controle da degradação oxidativa do arroz. O estudo mostra o potencial da própolis em preservar a qualidade do produto estocado.

2.2.Embalagens Ativas

Sabe-se que as alterações microbianas são responsáveis por enormes perdas de alimentos e, portanto, ao longo dos anos, vários processos químicos e físicos têm sido desenvolvidos para estender a vida de prateleira dos alimentos. A utilização de embalagens adequadas é fundamental e preponderante para a preservação da qualidade dos alimentos. Devido ao aumento da demanda dos consumidores por produtos minimamente processados e livre de conservantes, estes últimos devem ser aplicados nas embalagens, de forma que apenas baixos níveis dessas substâncias entrem em contato com o alimento (DUTTA et al., 2009). Em virtude de tal preocupação, alguns estudos têm sido realizados sobre embalagens ativas, utilizando como agentes antimicrobianos diferentes substâncias incorporadas a materiais poliméricos.

A embalagem antimicrobiana é uma forma de embalagem ativa que poderia aumentar a vida de prateleira dos produtos e fornecer segurança aos consumidores. Este tipo de embalagem visa reduzir, inibir ou retardar o crescimento de microrganismos patogênicos e deteriorantes em alimentos embalados (VERMEIREN et al. 1999). No entanto, deve-se ressaltar que a adição de agentes antimicrobianos também pode afetar as propriedades físicas e mecânicas dos materiais de embalagem (MAIZURA et al., 2007; OJAGH et al., 2010).

Vários compostos têm sido propostos por suas atividades antimicrobianas para utilização em embalagens de alimentos, incluindo ácidos orgânicos, nisina, lisozima, fungicidas, e antimicrobianos naturais como as especiarias que são ricas em compostos fenólicos, tais como os flavonóides e ácidos fenólicos (ALTIOK et al., 2010; DADALIOGLU; EVRENDILEK, 2004; MAIZURA et al., 2007; THARANATHAN, 2003). Considerando isso, os estudos apresentados a seguir mostram os principais bioativos incorporados em filmes biodegradáveis e a capacidade dos mesmos em inibir o crescimento de microrganismos patogênicos e deteriorantes comumente associados a produtos alimentícios.

2.2.1. Compostos bioativos

2.2.1.1. Óleos essenciais

Pesquisas recentes tentam desenvolver estratégias alternativas para reduzir o uso de aditivos químicos na indústria alimentícia. Neste contexto, o uso de compostos naturais como os óleos essenciais, que possuem forte propriedade antibacteriana contra patógenos alimentares (MAIZURA et al., 2007), está sendo explorado. Sabe-se que a atividade antimicrobiana destas substâncias é devida à sua composição química, principalmente aos componentes fenólicos (COSENTINO et al., 1999), tais como carvacrol, eugenol e timol, que exibem ampla escala de efeitos biológicos, incluindo propriedades antioxidantes e antimicrobianas (MAIZURA et al., 2007).

Os óleos essenciais podem ser aplicados na formulação de filmes comestíveis para promover propriedades antimicrobianas, e, por conseguinte, estender a vida de prateleira e reduzir ou inibir microrganismos patógenos e deteriorantes (OUSSALAH et al., 2004; ZIVANOVIC; CHI; DRAUGHON, 2005), sendo encontrados diversos trabalhos que demonstram tais propriedades. Por exemplo, filmes à base de alginato e incorporados com óleo essencial de alho (PRANOTO; SALOKHE; RAKSHIT, 2005) exibiram atividade antibacteriana contra *Staphylococcus aureus* e *Bacillus cereus*, verificada através do método de difusão em ágar. Entretanto, as propriedades funcionais dos filmes foram significativamente afetadas pela incorporação do óleo nas concentrações de 0,3 e 0,4%.

Seydim e Sarikus (2006) avaliaram a atividade antimicrobiana de filmes produzidos à base de proteínas do soro de leite e incorporados com óleos essenciais de orégano, alecrim e alho. Os autores concluíram que os filmes contendo óleos essenciais de orégano e de alho foram efetivos contra as bactérias testadas (*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 estes 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 poderia ter uma aplicação alternativa em embalagens de alimentos.

Filmes produzidos a partir de alginato e purê de maçã (ROJAS-GRAÜ et al., 2007), contendo diferentes óleos essenciais ou seus principais constituintes inibiram o crescimento

de *E. coli* O157:H7, sendo que a atividade antimicrobiana dos filmes contendo óleo essencial de orégano e carvacrol foram significativamente maiores do que aqueles aditivados com óleo de capim limão, citral, óleo de canela e cinamaldeído. De acordo com estes autores, a incorporação destes compostos em filmes comestíveis promoveria uma nova forma para melhorar a segurança e aumentar a vida de prateleira dos alimentos. Os aditivos não afetaram as permeabilidades ao vapor de água e ao oxigênio, mas afetaram as propriedades mecânicas dos filmes

Filmes comestíveis, preparados a partir de uma mistura de amido de sagu parcialmente hidrolisado e alginato, e incorporados com óleo de capim limão como agente antimicrobiano (0,1 a 0,4%) mostraram-se efetivos contra *E. coli* O157:H7, sendo que com o aumento da concentração do óleo também aumentou significativamente as zonas de inibição em todos os níveis testados. A permeabilidade ao vapor de água e a porcentagem de elongação aumentaram, mas a tensão na ruptura diminuiu na presença do agente antimicrobiano (MAIZURA et al., 2007).

Del Nobile et al. (2009) verificaram que filmes de zeína aditivados com timol nas concentrações de 20 e 35%, foram efetivos na inibição do crescimento de *Pseudomonas* spp e *Bacillus cereus*. Emiroğlu et al. (2010) testaram a atividade antimicrobiana de filmes comestíveis à base de proteína de soja incorporados com (1 a 5%) com óleos essenciais de orégano e/ou tomilho contra *Escherichia coli*, *E. coli* O157:H7, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Lactobacillus plantarum* e verificaram que os óleos essenciais inibiram todos os microrganismos testados até mesmo na mínima concentração (1%).

Gómez-Estaca et al. (2010) testaram a atividade antimicrobiana de filmes comestíveis à base de gelatina e quitosana incorporados com óleos essenciais (cravo, erva-doce, lavanda, tomilho, alecrim) como agentes antimicrobianos contra importantes bactérias patogênicas e deteriorantes (*Pseudomonas fluorescens*, *Shewanella putrefaciens*, *Photobacterium phosphoreum*, *Listeria innocua*, *Escherichia coli* and *Lactobacillus acidophilus*), e observaram que os filmes contendo óleo essencial de cravo foram os que apresentaram o mais alto efeito inibitório.

Altioek et al. (2010) produziram filmes de quitosana incorporados com óleo essencial de tomilho (*Thymus vulgaris*) em concentrações que variaram de 0,2 a 1,2%. Os testes antimicrobianos mostraram que a mínima concentração do óleo essencial utilizado para prevenir o crescimento de todos os microrganismos selecionados (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*) foi de 1,2%. Quanto às propriedades mecânicas e físicas, o aditivo causou uma significativa redução na tensão de

ruptura dos filmes, e a porcentagem de alongação diminuiu com o aumento da concentração do mesmo, no entanto, a permeabilidade ao vapor de água aumentou ligeiramente.

Filmes de quitosana (OJAGH et al., 2010) contendo óleo essencial de canela em níveis de 0,4; 0,8; 1,5 e 2,0% apresentaram atividade antimicrobiana contra *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus sakei* e *Pseudomonas fluorescens*, além de redução da umidade, solubilidade em água, permeabilidade ao vapor de água e da alongação na ruptura, quando comparados aos filmes não aditivados. Outro exemplo de óleo essencial é o de *Melaleuca alternifolia*, conhecida como árvore do chá, cujos benefícios farmacêuticos são largamente conhecidos (BAGG et al., 2006; JULIANO; DEMURTAS; PIU, 2008), sendo que a incorporação deste em filmes à base de quitosana, apresentou atividade inibitória contra *Listeria monocytogenes* e *Penicillium italicum* (SÁNCHEZ-GONZÁLEZ et al., 2010).

A atividade antibacteriana de óleos essenciais de limão (*Citrus lemon* L.), laranja (*C. sinensis* L.), tangerina (*C. reticulata* L.) e grapefruit (*C. paradisi* L.) também foi testada por Viuda-Martos et al. (2008) que verificaram o efeito inibitório de todos os óleos sobre *Staphylococcus xylosus*, *Staphylococcus carnosus*, *Enterobacter gergoviae*, *Enterobacter amnigenus*, *Lactobacillus sakei* e *Lactobacillus curvatus*. Sendo que o óleo essencial de limão mostrou maior eficácia de inibição sobre *S. carnosus*, *E. gergoviae* and *E. amnigenus*, enquanto o óleo de grapefruit inibiu mais efetivamente *S. xylosus*, *L. curvatus* e *L. sakei*. Já os óleos de laranja e tangerina apresentaram a mais baixa inibição sobre as seis bactérias testadas. Logo, os óleos essenciais de frutas cítricas poderiam ser usados como antimicrobianos naturais, representando uma alternativa à indústria alimentícia para reduzir o uso de aditivos sintéticos.

2.2.1.2. Ácidos orgânicos e nisina

Padgett, Han e Dawson (2000) analisaram o efeito da adição de ácido láurico e nisina em filmes de zeína sobre a atividade antimicrobiana contra *Lactobacillus plantarum* e verificaram que os filmes contendo nisina, na presença ou ausência de ácido láurico, apresentaram claras zonas de inibição microbiana, no entanto, os filmes aditivados apenas com ácido láurico não apresentaram efeito inibitório sobre *L. plantarum*.

Filmes à base de proteína de soja incorporados com nisina e os ácidos cítrico, láctico, málico ou tartárico foram avaliados quanto à atividade antimicrobiana por Eswaranandam,

Hettiarachchy, Johnson (2004) que verificaram que os filmes contendo apenas nisina mostraram reduzida inibição sobre *Listeria monocytogenes*, entretanto a adição complementar dos ácidos cítrico, láctico, málico ou tartárico aumentou o diâmetro de inibição. Já as bactérias *Salmonella gaminara* e *Escherichia coli* O157:H7 foram inibidas somente na presença de um dos ácidos orgânicos.

Li et al. (2006) produziram filmes à base de glucomanan incorporados com quitosana e nisina, e verificaram que os mesmos apresentaram atividade antimicrobiana contra *S. aureus*, *L. monocytogenes* e *B. cereus*. Estes autores também observaram que a incorporação de quitosana melhorou consideravelmente as propriedades físicas e mecânicas dos filmes. As análises de DSC e FTIR mostraram forte interação intermolecular (ligações de hidrogênio) entre quitosana e glucomanan, o que explica a melhora das propriedades físicas.

As propriedades mecânicas e antimicrobianas de filmes de isolado protéico de soja contendo extrato de semente de uva, nisina e ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) foram avaliadas por Sivarooban, Hettiarachchy e Johnson (2008). Quanto à atividade antimicrobiana, os filmes foram avaliados contra *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7 e *Salmonella typhimurium*, sendo que o primeiro microrganismo foi o mais sensível às combinações de extrato de semente de uva, nisina e EDTA. Em relação às propriedades mecânicas, a incorporação do extrato de semente de uva aumentou significativamente a tensão na ruptura nos filmes em relação ao controle, o que possivelmente se deve às ligações cruzadas formadas pelos constituintes fenólicos de alto peso molecular presentes no extrato. As moléculas de proteínas são ligadas aos polifenóis principalmente através de ligações de hidrogênio. As diversas estruturas dos polifenóis do extrato poderiam ter aumentado o número de ligações cruzadas intermoleculares na solução formadora do filme. No entanto, a incorporação de nisina reduziu a tensão na ruptura dos filmes, o que pode ter sido causado pelo enfraquecimento das fortes interações entre as moléculas de proteína. Já a combinação de nisina e extrato de semente de uva promoveu aumento no valor desta propriedade do filme quando comparado ao controle.

Pyla et al. (2010) analisaram e comprovaram a atividade antimicrobiana de filmes à base de amido aditivados com ácido tânico fresco e termicamente processado na inibição de *Escherichia coli* O157:H7 e *Listeria monocytogenes*. Estes autores também observaram que o filme controle não apresentou nenhum efeito antimicrobiano, e que os diâmetros de inibição aumentaram significativamente com o aumento da concentração de ácido tânico.

2.2.1.3. Outros bioativos

Outros compostos também são citados por sua ação antimicrobiana e possível aplicação em filmes comestíveis, tais como sorbato de potássio, quitosana, lisoizima e neem. Cagri, Ustunol e Ryser (2001) estudaram a atividade antibacteriana do ácido p-Aminobenzóico (PABA) e do ácido sórbico em filmes comestíveis de proteína de soja e verificaram efeito inibitório do PABA em relação às cepas de *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7 e *Salmonella typhimurium* em todas as concentrações estudadas. Por outro lado, os filmes contendo ácido sórbico também apresentaram atividade antimicrobiana, embora nas concentrações mais baixas não tenham sido efetivos a algumas cepas de *S. typhimurium*.

Jagannath et al. (2006) prepararam filmes à base de amido e caseína contendo *neem* (*Melia azadirachta*) e verificaram que não houve nenhum efeito sobre as propriedades físicas do filme, e que os mesmos mostraram atividade antimicrobiana contra todos os microrganismos testados (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas spp.*, *Salmonella typhimurium*).

Filmes de zeína incorporados com lisoizima parcialmente purificada mostraram atividade antimicrobiana sobre *Bacillus subtilis* e *Lactobacillus plantarum*, e com a adição de EDTA os mesmos também foram efetivos contra *Escherichia coli*. Este estudo mostra a possibilidade do uso de lisoizima em embalagens antimicrobianas (MECITOGLU et al., 2006).

Seol et al. (2009) analisaram o efeito antimicrobiano de filmes à base de κ -carragena contendo ovotransferrina ou sorbato de potássio como agentes antimicrobianos, na presença ou ausência de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), contra *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Candida albicans*. Estes autores não verificaram, para todos os microrganismos testados, efeito inibitório dos filmes contendo somente ovotransferrina ou sorbato de potássio. No entanto, os filmes produzidos com adição de EDTA apresentaram o efeito inibitório esperado, especialmente o filme contendo ovotransferrina e EDTA, que apresentou um forte efeito inibitório contra *E. coli* e *C. albicans*, com diâmetros da zona de inibição entre 2 e 5mm, mas fraco efeito inibitório contra *S. aureus* e *S. typhimurium*, com diâmetros menores que 2mm. Os filmes também foram utilizados como embalagem para peitos de frango frescos e os resultados mostraram que os filmes à base

de κ -carragena, ovotransferrina e EDTA podem ser utilizados para estender a vida de prateleira do produto testado.

Filmes biodegradáveis preparados à base de amido de batata doce e incorporados de sorbato de potássio ou quitosana mostraram efeito inibitório contra *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* (Shen et al., 2010).

Considerando ainda quitosana, Rao et al. (2010) produziram filmes à base deste polissacarídeo aditivados com goma guar e verificaram que a adição de 15% de goma promoveu redução decimal de *E. coli*, mas não afetou significativamente a redução de *S. aureus* quando comparado ao filme contendo apenas quitosana. Além disso, estes autores concluíram que os filmes produzidos com 85% de quitosana e 15% de goma guar foi o que apresentou a mais baixa permeabilidade ao oxigênio e melhores propriedades mecânicas.

Chen, Wang e Weng (2010) estudaram a atividade antimicrobiana de filmes à base de gelatina e incorporados *Aloe barbadensis*, e verificaram que, entre as bactérias Gram-positivas, *Bacillus cereus* foi mais susceptível do que *Staphylococcus aureus*, e entre as Gram-negativas, *Enterobacter aerogens* foi a mais inibida.

Em relação à utilização da própolis como composto bioativo em filmes biodegradáveis, um número reduzido de trabalhos pode ser encontrado, uma vez que sua aplicação está principalmente associada a estudos farmacológicos.

Kechichian et al. (2010) produziram filmes a partir de amido de mandioca e aditivados com diferentes substâncias antimicrobianas, entre elas o extrato etanólico de própolis, e os avaliaram quanto à influência destes compostos sobre as propriedades mecânicas, permeabilidade ao vapor de água e sólidos totais dos filmes. No entanto, a capacidade antimicrobiana das substâncias na matriz polimérica não foi estudada (KECHICHIAN et al., 2010).

Em outro estudo, filmes à base de hidroxipropilmetilcelulose contendo extrato de própolis mostraram uma notável atividade antifúngica contra *Aspergillus niger* e *Penicillium italicum*, além do que em relação aos filmes não aditivados, mostraram melhora na permeabilidade ao vapor de água, maior rigidez e menor flexibilidade, apresentando-se mais opacos, com menos brilho e transparência (PASTOR et al., 2010).

2.2.2. Aplicações

Além de se avaliar as propriedades mecânicas, de barreira e antimicrobiana dos filmes bioativos, muitos pesquisadores também têm procurado avaliar e demonstrar sua viabilidade e possibilidade de aplicação. Segundo Oussalah et al. (2004), pedaços de músculo de carne bovina foram recobertos por filmes à base de proteínas do soro de leite contendo óleos essenciais de orégano e pimenta, cujo objetivo foi controlar o crescimento de bactérias patogênicas (*Escherichia coli* e *Pseudomonas* spp) e aumentar a vida de prateleira durante a armazenagem a 4°C. O recobrimento de filme com óleos essenciais ajudou na redução da carga microbiana e aumentou a atividade antioxidante durante 7 dias de estocagem.

Filmes de gelatina e amido de milho foram utilizados para o recobrimento de abacates após a colheita, visando o aumento da vida de prateleira do produto. A utilização do filme implicou em frutas com melhor firmeza da polpa, promoveu conservação da cor da casca e menor perda de peso, o que favoreceu a conservação do abacate (AGUILAR-MÉNDEZ et al., 2008).

Amendoins secos foram embalados em saquinhos preparados com filmes comestíveis de concentrado protéico de soro de leite e azeite de oliva, e armazenados sob umidade e temperatura controladas. A maioria dos filmes diminuiu a transferência de umidade e todos reduziram a formação de peróxidos nos amendoins durante a estocagem (JAVANMARD, 2008).

Zinoviadou, Koutsoumanis e Biliaderis (2009) prepararam filmes à base de proteínas do trigo incorporados com diferentes concentrações de óleo de orégano (0,5; 1,0 e 1,5% na solução filmogênica) e verificaram que os filmes com 1,5% de óleo promoveram a redução da contagem de pseudomonas e inibiram completamente o crescimento de bactérias ácido lácticas em pedaços de carne fresca, promovendo o aumento da vida de prateleira do produto.

Santiago-Silva et al. (2009) produziram filmes de celulose incorporados com pediocina, e verificaram que os filmes contendo 50% da bacteriocina inibiram o crescimento de *Listeria innocua* e *Salmonella* sp. em fatias de presunto, previamente inoculadas com as bactérias, apresentando reduções de 2 e 0,5 ciclos logarítmicos, respectivamente, durante o período de estocagem. Estes resultados, segundo os autores, demonstram que filmes contendo pediocina poderiam, aliados às boas práticas de fabricação, atuar na preservação de fatias de presunto.

Cao-Hoang et al. (2010) demonstraram a potencial aplicação de filmes à base de caseinato de sódio incorporados com nisina para reduzir a contagem microbiana de queijos

inoculados com *Listeria innocua*. O estudo visou desenvolver alternativas para superar problemas associados à contaminação no pós-processamento de queijos, melhorando a segurança e estendendo a vida de prateleira deste produto.

Emiroğlu et al. (2010) testaram os efeitos de filmes à base de proteína de soja contendo 5% de óleos essenciais de orégano ou tomilho, ou uma mistura de ambos, sobre carne fresca durante estocagem a 4°C, e observaram que os filmes proporcionaram redução na contagem de coliformes e *Pseudomonas* spp, uma das mais comuns bactérias deteriorantes de carnes em temperaturas de refrigeração.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material

Para a produção dos filmes utilizou-se gelatina do tipo A comercial, fornecida pela empresa GELITA do Brasil Ltda. (São Paulo, Brasil), os plastificantes sorbitol (Nuclear) e citrato de acetiltributíla (Aldrich), lecitina de soja (E 322, Caramuru, São Simão - GO) e etanol (Sinth). Para a produção do extrato etanólico de própolis foi utilizada a resina do tipo 12 (Star Rigel, Raffard - SP). Na análise de polifenóis foram utilizados os reagentes Folin-Ciocalteu (Sigma-Aldrich) e carbonato de sódio anidro (Sinth). Para a avaliação da atividade antimicrobiana utilizou-se caldo BHI (BD), peptona bacteriológica (BD) e ágar nutriente (Merck). A bactéria *Staphylococcus aureus* utilizada nas análises microbiológicas foi adquirida da coleção de culturas da Fundação André Tosello (Campinas).

3.2. Extração e caracterização da própolis

3.2.1. Extração da própolis

O extrato etanólico de própolis (EEP) foi preparado conforme descrito por Alencar et al. (2002), com algumas modificações. Inicialmente, um lote de 5kg da cera foi triturado até a obtenção de um pó fino, e em seguida misturado para obtenção de amostras homogêneas. Para a extração, realizada à 50°C, sob agitação mecânica (500rpm, 30minutos), utilizou-se a proporção de 30g da cera triturada para 100mL de álcool etílico (80%). Após esta etapa, a solução foi resfriada em um banho de gelo por 5minutos, visando à rápida redução de temperatura da mesma, e armazenada sob refrigeração por 24horas para promover a separação de fases. Após este período o extrato (sobrenadante) foi filtrado em papel de filtro Whatman nº1. As extrações foram realizadas em triplicata.

3.2.2. Caracterização do extrato etanólico de própolis

A determinação, em triplicata, do total de polifenóis do extrato etanólico de própolis foi realizada por método espectrofotométrico segundo Kumazawa et al. (2002). Inicialmente, os extratos etanólicos foram diluídos (1:1000) em álcool etílico (80%) imediatamente antes da análise. Alíquotas de 0,5mL de extrato diluído foram distribuídas em tubos de ensaio, 2,5mL do reagente Folin Ciocalteu diluído (1:10) foi adicionado, e a mistura foi agitada adequadamente e mantida em repouso por 5 minutos. Em seguida, 2,0mL da solução de carbonato de sódio 4% foi adicionada e a solução homogeneizada. A solução foi mantida em ambiente sem luminosidade por 2 horas e submetida à leitura espectrofotométrica, em espectrofotômetro Biochrom Libra (S22), no comprimento de onda de 740nm. Os resultados foram expressos em mg de ácido gálico/g de extrato etanólico de própolis.

O extrato etanólico de própolis também foi analisado quanto à cor em um colorímetro Miniscan XE (HunterLab). Para esta análise, 50mL de EEP foram colocados em um recipiente de quartzo, determinando-se então os parâmetros L^* , a^* e b^* , através de medidas realizadas em triplicata para cada amostra de extrato.

3.3. Produção dos filmes

Os filmes foram produzidos à base de gelatina, plastificados com sorbitol (plastificante hidrofílico) ou com citrato de acetiltributíla (hidrofóbico), e aditivados com o extrato etanólico de própolis em diferentes concentrações. Para todas as formulações estudadas, a concentração de gelatina foi mantida fixa em 2g/100g de solução filmogênica, e a concentração do plastificante em 30g/100g de gelatina. Todos os filmes foram produzidos em triplicata.

3.3.1. Filme plastificado com sorbitol

Para a produção dos filmes, inicialmente promoveu-se a hidratação da gelatina (2g/100g de solução filmogênica) em água à temperatura ambiente (30min), e em seguida a mesma foi solubilizada a 55°C (15min) utilizando-se um banho termostático. Após a completa

solubilização da gelatina, o plastificante sorbitol (S) foi adicionado ($C_S = 30\text{g}/100\text{g}$ de gelatina) e a solução agitada magneticamente (1min) e mantida por 15 minutos a 55°C , para a completa solubilização do mesmo. Após esta etapa, a solução filmogênica foi resfriada até a temperatura de 40°C e o extrato etanólico de própolis (EEP) foi adicionado nas concentrações de 5, 40 ou $200\text{g}/100\text{g}$ de gelatina. Para a completa solubilização do extrato na solução filmogênica, utilizou-se álcool etílico na concentração de $15\text{g}/100\text{g}$ de solução filmogênica. As soluções foram dispersas em placas de polietileno (50g de solução/placa), com dimensões de $12 \times 12\text{cm}$, e submetidas à secagem em estufa com ventilação forçada a 30°C , por 24 horas.

3.3.2. Filme plastificado com citrato de acetiltributíla

Para os filmes plastificados com citrato de acetiltributíla (CA), o plastificante ($C_{CA} = 30\text{g}/100\text{g}$ de gelatina) e a lecitina (agente tensoativo, $C_{Lecitina} = 35\text{g}/100\text{g}$ de plastificante) foram adicionados em etanol ($20\text{g}/100\text{g}$ de solução filmogênica) e mantidos sob agitação magnética por um período de 2h, à temperatura ambiente. A gelatina ($2\text{g}/100\text{g}$ de solução filmogênica) foi hidratada ($T = \text{ambiente}$, 30 minutos) e solubilizada ($T = 55^\circ\text{C}$, 30 minutos). Após os períodos estabelecidos, a solução de gelatina e a emulsão (etanol + lecitina + plastificante) foram misturadas e homogeneizadas magneticamente, adicionando-se em seguida o extrato etanólico de própolis nas concentrações de 5, 40 ou $200\text{g}/100\text{g}$ de gelatina. A solução final foi homogeneizada a 6000rpm (10min) utilizando-se um ultra-turrax (IKA, T25). As soluções filmogênicas foram dispersas em placas de acrílico (65g de solução/placa), com dimensões de $15 \times 15\text{cm}$, e submetidas à secagem em estufa com ventilação forçada a 30°C , por 24 horas.

3.4. Caracterização dos filmes bioativos

Os filmes foram pré-acondicionados em dessecadores contendo solução salina saturada de brometo de sódio (umidade relativa de 58%) em condições fixas de temperatura (25°C), durante 5 dias. As caracterizações dos filmes foram realizadas em sala climatizada na temperatura de 25°C e umidade relativa na faixa de 55 a 65%.

A espessura dos filmes foi determinada como a média aritmética de dez medidas aleatórias sobre a área do filme com um micrômetro digital (resolução $0,001\text{ mm}$, Mitutoyo).

A espessura, foi controlada através da relação massa/área e mantida constante em $0,086 \pm 0,003\text{mm}$ para os filmes plastificados com citrato de acetiltributíla e em $0,086 \pm 0,008\text{mm}$ para os filmes plastificados com sorbitol.

3.4.1. *Propriedades mecânicas*

As propriedades mecânicas dos filmes foram avaliadas através de testes de tração e perfuração, utilizando-se um texturômetro TA.XT2 (TA Instruments).

O teste de tração foi realizado de acordo com Paschoalick et al. (2003), onde as amostras dos filmes (15 x 100mm) foram fixadas em uma sonda específica (*tensile grips*). A distância inicial de separação foi fixada em 80mm e a velocidade de realização do teste em 0,9mm/s. A tensão na ruptura (T, em MPa) e a elongação na ruptura (E, %) foram obtidas diretamente das curvas de tensão versus elongação, e o módulo elástico (ME, em MPa) foi determinado calculando-se o coeficiente angular da parte linear da curva.

O teste de perfuração foi realizado de acordo com Sobral et al. (2001). Amostras dos filmes foram fixadas em uma célula cilíndrica com anel perfurado (diâmetro = 40mm), e para a realização do teste foi utilizada uma sonda cilíndrica (diâmetro = 3mm). A velocidade do teste foi fixada em 1mm/s. A força na perfuração (F, em N) foi obtida diretamente das curvas de força versus deslocamento da sonda, e a deformação (D, %) calculada de acordo com a eq.(1).

$$D = \frac{\sqrt{d^2 + r^2} - r}{r} 100 \quad (1)$$

Onde: D = deformação na ruptura (%); d = deslocamento da sonda cilíndrica (mm) e r = raio da amostra de filme (20mm).

3.4.2. *Solubilidade em água*

A solubilidade em água dos filmes foi determinada segundo Carvalho e Grosso (2004) e Cuq et al. (1997). Amostras de filmes no formato de discos (diâmetro = 2cm) foram imersas em água destilada (50mL) e mantidas sob agitação mecânica (mesa agitadora Marconi-

MA141) por 24 horas, à 25°C. Após este período, as amostras foram secas (105°C, 24 horas), e pesadas, determinando-se então a massa final seca das amostras (m_f). A massa inicial (m_i) foi determinada conhecendo-se a umidade das amostras. A solubilidade, expressa em termos de massa seca dissolvida, foi calculada de acordo com a eq.(2).

$$\text{Sol} = \left(\frac{m_i - m_f}{m_i} \right) 100 \quad (2)$$

Onde: Sol = solubilidade em água (g/100g de filme), m_i = massa seca inicial da amostra (g), m_f = massa seca final da amostra (g) após solubilização.

3.4.3. Cor e opacidade

A cor dos filmes, expressa através dos parâmetros croma a^* , croma b^* e luminosidade (L^*) e diferença total de cor (ΔE^*), foi determinada de acordo com Sobral et al. (2001) utilizando-se um colorímetro Miniscan XE (HunterLab). Os parâmetros a^* , b^* e L^* dos filmes foram determinados sobrepondo-se os filmes sobre um padrão branco e a diferença total de cor foi determinada de acordo com a eq.(3) (GENNADIOS et al., 1996).

$$\Delta E^* = \sqrt{(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2} \quad (3)$$

Onde: $\Delta L^* = L^*_{\text{padrão}} - L^*_{\text{amostra}}$; $\Delta a^* = a^*_{\text{padrão}} - a^*_{\text{amostra}}$ e $\Delta b^* = b^*_{\text{padrão}} - b^*_{\text{amostra}}$

A opacidade foi determinada segundo Sobral (2000) utilizando-se o software do equipamento. De acordo com este método, a opacidade é calculada como a relação entre a opacidade do filme sobreposto sobre o padrão preto (Y_p) e sobre o padrão branco (Y_b), segundo a eq. (4).

$$Y = \frac{Y_p}{Y_b} \quad (4)$$

3.4.4. Permeabilidade ao vapor de água

A permeabilidade ao vapor de água (PVA) foi determinada de acordo com o método ASTM E96-95 (ASTM, 1995), com gradiente de umidade relativa igual a 100%. Os filmes foram fixados em células de alumínio, contendo sílica gel, através de um anel perfurado (área exposta 12,29cm²). Essas células foram acondicionadas em dessecadores contendo água destilada e mantidas em uma estufa (BOD TE 390, Tecnal) com controle eletrônico de temperatura a 25°C (± 0,2°C). O ganho de massa do sistema (célula + filme) foi determinado em intervalos regulares por um período de 101h, em balança semi-analítica (Marte, AS2000) e a permeabilidade ao vapor de água (PVA) foi calculada utilizando-se a eq.(5).

$$PVA = \frac{G \cdot x}{t \cdot A_e \cdot P_0 \cdot (R_1 - R_2)} \quad (5)$$

Onde: x é a espessura média (mm) dos filmes, A_e é a área exposta (cm²), P₀ é a pressão de vapor da água (Pa) na temperatura de 25° C, (R₁ – R₂) = diferença de umidade relativa (%) e o termo G/t (g/h) corresponde ao coeficiente angular da regressão linear da reta de ganho de massa do sistema versus tempo.

3.4.5. Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

As análises foram realizadas utilizando-se um espectrofotômetro Perkin Elmer (Spectrum One) de acordo com Vicentini (2003). Os filmes foram sobrepostos diretamente sobre célula de leitura. Foram realizadas 16 varreduras na faixa espectral de 40 a 4000cm⁻¹ com resolução de 2cm⁻¹. Os espectros de varredura foram coletados e analisados utilizando-se software adequado.

3.4.6. Microestrutura dos filmes

A microestrutura (superficial e interna) dos filmes foi analisada empregando-se microscopia eletrônica de varredura, utilizando-se um microscópio Leica LEO 440i a 15 kV,

de acordo com Carvalho e Grosso (2004). Para a análise da microestrutura interna, os filmes foram fraturados em nitrogênio líquido.

3.5. Avaliação do efeito do tempo de armazenamento na concentração de polifenóis e na atividade antimicrobiana dos filmes bioativos

Os filmes produzidos foram acondicionados em estufa à temperatura ambiente (22 - 25°C), umidade relativa entre 50-58% e na ausência de luz. Os filmes plastificados com sorbitol e citrato de acetiltributíla foram armazenados durante 177 dias. Durante este período, os filmes foram caracterizados em relação à concentração de polifenóis, cor, opacidade e atividade antibacteriana.

3.5.1. Concentração de polifenóis

A análise de polifenóis foi realizada de acordo com o método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu descrito por Kumazawa et al. (2002), e utilizando ácido gálico como padrão.

Inicialmente, amostras dos filmes (11 a 12mg) plastificados com citrato de acetiltributíla e sorbitol foram solubilizadas em 6mL de água destilada (50°C, 50minutos). Em seguida, as soluções foram agitadas e 4mL de álcool etílico (80%) foi incorporado às mesmas que foram mantidas a 50°C por 10minutos. Após este período, as soluções foram agitadas novamente e então resfriadas à temperatura ambiente para posterior análise. Alíquotas de 0,5mL das soluções foram transferidas para tubos de ensaio e 2,5mL do reagente Folin-Ciocalteu diluído em água destilada (1:10) foi adicionado. Após agitação, os tubos foram mantidos em repouso por 5minutos, adicionando-se a seguir 2,0mL de carbonato de sódio (4%). Os tubos foram mantidos em repouso ao abrigo da luz por 2horas. A absorbância foi determinada em um espectrofotômetro (Biochrom Libra, S22), no comprimento de onda de 740nm. Os resultados da concentração de polifenóis foram expressos em mg de ácido gálico/g de filme.

3.5.2. Atividade antimicrobiana

Para se avaliar a capacidade antibacteriana do extrato etanólico de própolis e da matriz polimérica aditivada com própolis, utilizou-se a bactéria Gram-positiva *Staphylococcus aureus* adquirida da Fundação André Tosello. A determinação do diâmetro de inibição ($D_{inibição}$) dos filmes foi realizada de acordo com Eswaranandam, Hettiarachchy, Johnson (2004). Para esta análise, inicialmente, a bactéria *S. aureus* foi reativada em caldo BHI, a 37°C por 24 horas. Placas de ágar nutriente, previamente preparadas, foram então inoculadas em superfície com 0,1mL de *S. aureus* (10^4 UFC/mL) e discos de 20mm de diâmetro dos filmes colocados sobre a superfície das placas, sendo as mesmas incubadas a 37°C por 24 horas. O diâmetro de inibição foi medido considerando-se o diâmetro dos filmes.

Para o extrato etanólico de própolis, a análise foi realizada de acordo com Park et al. (1998b) com algumas modificações. Discos de 20mm de papel de filtro (Whatman nº1) foram imersos no extrato etanólico por 15 minutos e posteriormente secos em estufa com circulação forçada a 30°C durante 24 horas, para eliminar totalmente o álcool etílico. O procedimento posterior de análise para os discos foi idêntico ao dos filmes, obtendo-se os diâmetros de inibição.

É importante ressaltar que anteriormente à análise microbiológica, tanto os discos contendo o extrato etanólico de própolis quanto os de filme, foram mantidos sob luz ultravioleta por 30 minutos, visando à descontaminação inicial dos mesmos e a não interferência nos resultados. Os testes foram realizados em triplicata para cada concentração de extrato na matriz polimérica (0, 5, 40 e 200%) bem como para os extratos puros. Também foi realizado o controle do crescimento microbiano através da incubação de placas de ágar nutriente inoculadas com a bactéria *S. aureus*.

3.6. Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o programa computacional SAS (SAS, versão 9.2). As diferenças significativas entre as médias foram identificadas através dos testes de Duncan ($p < 0,05$).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Caracterização do extrato etanólico de própolis

O extrato etanólico de própolis (EEP) foi caracterizado em relação à concentração de polifenóis e parâmetros de cor (Tabela 1).

Tabela 1 - Concentração de polifenóis ($C_{\text{Polifenóis}}$) e parâmetros de cor (L^* , a^* e b^*) do extrato etanólico de própolis (EEP).

Análise	EEP
$C_{\text{Polifenóis}}$ (mg de ácido gálico/g de extrato)	$51,9 \pm 2,4$
L^*	$0,8 \pm 0,4$
a^*	$0,4 \pm 0,3$
b^*	$0,3 \pm 0,2$

A concentração inicial de polifenóis obtida para o extrato etanólico de própolis foi de 51,9 mg ácido gálico/g de extrato. O resultado obtido foi inferior ao observado por Choi et al. (2006) para a própolis brasileira (concentração de polifenóis = 120mg de ácido gálico/g de extrato). Entretanto, deve-se ressaltar que estudos mostram que a concentração de polifenóis em diferentes amostras de própolis apresenta uma grande variabilidade, principalmente em função de sua origem geográfica. Por exemplo, em amostras de própolis da China o teor de polifenóis variou entre 42,9 a 302mg/g de extrato (AHN et al., 2007), já a própolis argentina variou entre 92 e 187mg/g de extrato (CHAILLOU & NAZARENO, 2009), enquanto a grega entre 11,9 e 373,5mg/g de extrato (KALOGEROPOULOS et al., 2009), e amostras provenientes de várias regiões do mundo variaram entre 31,2 e 299mg/g de extrato (KUMAZAWA, HAMASAKA E NAKAYAMA, 2004).

Em relação à cor, visualmente o extrato etanólico de própolis (EEP) apresentou uma coloração marron escuro (Figura 1). Considerando o diagrama do sistema CIELab (Figura 2) verificou-se que os resultados observados em relação a luminosidade (L^*), croma a^* (a^*) e croma b^* (b^*) confirmam o observado visualmente.

Figura 1 - Extrato etanólico de própolis utilizado na produção de filmes à base de gelatina plastificados com citrato de acetiltributíla e sorbitol.

Figura 2 - Diagrama CIE Lab para os parâmetros de cor L^* , a^* e b^* .

4.2. Caracterização dos filmes bioativos

4.2.1. *Propriedades mecânicas*

4.2.1.1. *Tração*

O efeito da incorporação do extrato etanólico de própolis (EEP) na tensão na ruptura (T), alongação (E) e módulo elástico (ME) dos filmes plastificados com citrato de acetiltributíla (CA) e sorbitol (S) pode ser observado na (Tabela 2).

Para os filmes plastificados com citrato de acetiltributíla (CA) verificou-se que a incorporação do extrato etanólico influenciou a tensão na ruptura (Tabela 2), sendo que apenas para a concentração de 200% foi verificada uma redução significativa em relação ao filme controle. Comportamento semelhante foi observado para a elongação. Em relação ao módulo elástico, de um modo geral, os filmes aditivados apresentaram valores maiores de ME (Tabela 2). Como a produção do filme plastificado com citrato de acetiltributíla envolve uma etapa de emulsificação, a distribuição da própolis na matriz é extremamente complexa o que pode provocar essa variabilidade.

Tabela 2 - Tensão na ruptura (T), elongação (E) e módulo elástico (ME) dos filmes plastificados com citrato de acetiltributíla (CA) e sorbitol (S) em função da concentração de extrato etanólico de própolis (C_{EEP}).

Plastificante	C_{EEP} (g/100g de gelatina)	T (MPa)	E (%)	ME (MPa)
CA	0	$63,3 \pm 2,1^{b,A}$	$7,7 \pm 1,1^{b,B}$	$14,7 \pm 2,9^{c,BC}$
	5	$66,4 \pm 3,4^{a,A}$	$14,9 \pm 3,1^{a,A}$	$16,3 \pm 1,6^{ab,AB}$
	40	$63,6 \pm 2,3^{b,A}$	$8,2 \pm 1,5^{b,B}$	$15,2 \pm 0,8^{bc,BC}$
	200	$58,7 \pm 3,2^{c,B}$	$5,0 \pm 1,0^{c,D}$	$17,4 \pm 0,4^{a,A}$
S	0	$50,4 \pm 1,9^{a,C}$	$5,7 \pm 1,4^{b,CD}$	$13,4 \pm 2,2^{a,C}$
	5	$45,0 \pm 4,2^{b,D}$	$5,8 \pm 1,1^{b,CD}$	$11,3 \pm 1,0^{ab,D}$
	40	$44,4 \pm 5,2^{b,D}$	$7,9 \pm 2,1^{a,B}$	$9,0 \pm 3,0^{bc,E}$
	200	$31,7 \pm 2,3^{c,E}$	$6,8 \pm 1,6^{ab,BC}$	$8,4 \pm 2,0^{c,E}$

Letras minúsculas diferentes, na mesma coluna para cada tipo de plastificante, indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as concentrações de EEP incorporadas; letras maiúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os tipos de plastificantes e concentrações de EEP. Diferença entre as médias obtidas através do teste Duncan, utilizando-se o programa computacional SAS.

Para os filmes plastificados com sorbitol (S), a tensão na ruptura (Tabela 2) dos filmes aditivados apresentou uma redução significativa e decrescente em função do aumento da concentração de EEP, quando comparados ao filme controle. Quanto à elongação máxima na ruptura, apenas o filme com a concentração de 40% de EEP apresentou um aumento significativo em relação ao filme controle. Para o módulo elástico, a adição de extrato nas concentrações de 40 e 200% promoveu redução significativa deste parâmetro. Possivelmente, a dispersão de componentes na matriz polimérica pode ter provocado o aparecimento de zonas de descontinuidades, resultando em redução da tensão na ruptura e do módulo elástico (PASTOR et al., 2010). Comparando-se os dois tipos de plastificantes (Tabela 2), verificou-se que para a tensão na ruptura os filmes plastificados com CA apresentaram valores superiores ($58,7 - 66,4$ MPa) aos filmes com S ($31,7 - 50,4$ MPa). Estes resultados corroboram com os resultados obtidos por Andreuccetti, Carvalho e Grosso (2009), para filmes à base de gelatina plastificados com CA, onde o valor máximo de tensão na ruptura foi de $68,8$ MPa, enquanto

Thomazine, Carvalho e Sobral (2005) e Cao, Yang e Fu (2009) observaram para filmes com sorbitol valores de 47,8MPa e 35MPa, respectivamente.

Quanto à elongação (E), os filmes com CA e S, na ausência de EEP, apresentaram, respectivamente, porcentagens de 7,7 e 5,7%. Andreuccetti, Carvalho e Grosso (2009), para filmes à base de gelatina plastificados com CA, observaram valores de elongação máxima de 3,8% e Thomazine, Carvalho e Sobral (2005), para filmes à base de gelatina plastificados com sorbitol (25 e 55%), observaram valores entre 5,9 e 74,2%.

Em relação a dados encontrados na literatura sobre filmes biodegradáveis contendo extrato etanólico de própolis (EEP), pode-se citar Pastor et al. (2010), que verificaram que a adição do bioativo em diferentes concentrações (0 a 1,5%) em filmes à base de hidroxipropilmetilcelulose (HPMC) não afetou significativamente a tensão na ruptura e o módulo elástico dos filmes, mas a elongação na ruptura diminuiu significativamente com o aumento da concentração de EEP.

Apesar da escassez de resultados que utilizam a própolis como componente bioativo, a literatura traz diversos estudos envolvendo a adição de outros compostos antimicrobianos, sobretudo óleos essenciais, em filmes à base de macromoléculas naturais, cujos efeitos da incorporação destas substâncias nas propriedades mecânicas parece variar em função da macromolécula utilizada, do tipo e concentração do aditivo, e das interações entre macromolécula e o agente antimicrobiano.

Por exemplo, a redução na tensão de ruptura e aumento na porcentagem de elongação de filmes bioativos também foi verificada por Rojas-Graü et al. (2007) e Maizura et al. (2007), que produziram, respectivamente, filmes à base de alginato e purê de maçã incorporados com óleo essencial de orégano (0,1%) ou de capim limão (0,5%), e filmes de alginato e amido de sagu aditivados com óleo de capim limão (0,1 a 0,4%). Resultado similar foi encontrado por Sánchez-González et al. (2010) em filmes de quitosana contendo óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* (árvore do chá) em concentrações de 0,5; 1 e 2% que apresentaram significativa redução do módulo elástico e da tensão na ruptura quando comparados ao controle (0%). Quanto à elongação na ruptura, os filmes com 0,5 e 1% de óleo não apresentaram variação, entretanto, para a concentração de 2% observou-se redução superior a 50%.

Ainda em filmes de quitosana, Altiok et al. (2010) verificaram que a adição de óleo de tomilho (0,2 – 1,2%) também causou significativa redução na tensão de ruptura dos filmes, mas diferentemente dos resultados já apresentados, a porcentagem de elongação diminuiu à medida que a concentração do aditivo aumentou, e de acordo com os autores este resultado foi

provocado pelo aumento da porosidade dos filmes. Ojagh et al. (2010) também verificaram que a adição de óleo essencial de canela em filmes de quitosana aumentou significativamente a tensão na ruptura dos filmes e, de acordo com estes autores, a forte interação entre polímero e óleo produziu um efeito reticulante, que diminuiu o volume livre e a mobilidade molecular do polímero.

No entanto, Atarés, Bonilla e Chiralt (2010) verificaram que filmes à base de caseinato de sódio contendo óleo essencial de canela ou gengibre não apresentaram variação significativa em suas propriedades mecânicas, provavelmente devido ao baixo conteúdo de óleo incorporado na matriz polimérica.

4.2.1.2. Perfuração

De modo geral, verificou-se que a incorporação de extrato etanólico de própolis (EEP) não afetou a força na ruptura (Tabela 3) dos filmes, independente do tipo de plastificante utilizado. Os filmes plastificados com citrato de acetiltributíla e sorbitol apresentaram para a força máxima na ruptura (Tabela 3) valores entre 27,0 e 28,8N e entre 32,5 e 34,5N, respectivamente.

Em relação à deformação (Tabela 3), para o plastificante hidrofóbico (CA), verificou-se redução significativa em função do aumento da concentração de EEP, mas para o plastificante hidrofílico (S) resultado oposto foi observado. Considerando este resultado e baseando-se no exposto por Sothornvit e Krochta (2001), talvez a adição de EEP tenha aumentado o volume livre entre as cadeias de proteína e permitido maior mobilidade e então aumentado a flexibilidade dos filmes com S, mas atuado de forma oposta nos filmes com CA.

Quanto aos resultados obtidos em outros filmes bioativos, Pires et al. (2006) observaram que a adição de nisina e natamicina, isoladas ou em combinação, em filmes de base celulósica promoveu redução da força de ruptura com o aumento da concentração das substâncias na matriz.

Entretanto, Santiago-Silva et al. (2009) verificaram que os filmes incorporados com 25% de pediocina apresentaram significativo aumento para a força na ruptura em relação ao controle, mas nos filmes com 50% do aditivo nenhuma variação foi verificada. Segundo os autores, a adição de pediocina na concentração de 25% promoveu uma possível interação entre este composto e a matriz celulósica, tornando o filme mais rígido, mas na concentração

de 50% possivelmente houve um excesso do aditivo que pode ter enfraquecido as cadeias celulósicas.

Tabela 3 - Força máxima (F) e deformação (D) dos filmes plastificados com citrato de acetiltributíla (CA) e sorbitol (S) em função da concentração de extrato etanólico de própolis (C_{EEP}).

Plastificante	C_{EEP} (g/100g de gelatina)	F (N)	D (%)
CA	0	$28,8 \pm 1,8^{a,B}$	$2,9 \pm 0,6^{a,B}$
	5	$27,2 \pm 1,4^{ab,B}$	$2,0 \pm 0,2^{b,C}$
	40	$28,5 \pm 2,0^{ab,B}$	$1,8 \pm 0,1^{b,C}$
	200	$27,0 \pm 1,8^{b,B}$	$1,9 \pm 0,3^{b,C}$
S	0	$33,9 \pm 3,7^{a,A}$	$3,0 \pm 0,6^{b,B}$
	5	$32,5 \pm 2,7^{a,A}$	$3,0 \pm 0,4^{b,B}$
	40	$33,3 \pm 4,1^{a,A}$	$3,7 \pm 0,4^{a,A}$
	200	$34,5 \pm 2,0^{a,A}$	$3,5 \pm 0,5^{a,A}$

Letras minúsculas diferentes, na mesma coluna para cada tipo de plastificante, indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as concentrações de EEP incorporadas; letras maiúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os tipos de plastificantes e concentrações de EEP. Diferença entre as médias obtidas através do teste Duncan, utilizando-se o programa computacional SAS.

4.2.2. Solubilidade em água

Nos filmes plastificados com citrato de acetiltributíla (Tabela 4), observou-se que na concentração de 40% de EEP houve redução da solubilidade dos filmes em relação ao controle, enquanto que na concentração de 200% de EEP o aumento da solubilidade foi de aproximadamente 129%. No entanto, para os filmes plastificados com sorbitol, apenas pequenas variações foram verificadas na solubilidade (30,6 a 32,4g/100g de filme). Possivelmente, os resultados estão relacionados com a distribuição do extrato na matriz e com possíveis interações dos polifenóis com a proteína.

Gómez-Estaca et al. (2010) verificaram aumento da solubilidade com a adição de óleo essencial de cravo (0,75mL/g de gelatina) em filmes à base de gelatina, e atribuíram esta variação ao estabelecimento de interações entre proteína e polifenóis que enfraqueceram as interações que estabilizam a rede protéica.

Resultado similar foi encontrado em filmes à base de amido de sagu e alginato, onde a incorporação de óleo de capim limão na concentração 0,4% provocou aumento significativo (12,5%) na solubilidade do filme em relação ao controle. E, segundo os autores, nesta concentração o óleo provavelmente interferiu no arranjo das cadeias poliméricas e das

ligações de hidrogênio, promovendo assim menor interação entre as moléculas de amido (MAIZURA et al., 2007).

Tabela 4 - Solubilidade (Sol) e umidade (U) dos filmes plastificados com citrato de acetiltributíla (CA) e sorbitol (S) em função da concentração de extrato etanólico de própolis (C_{EEP}).

Plastificante	C_{EEP} (g/100g de gelatina)	Sol (g/100g de filme)	U (g/100g de filme)
CA	0	$8,1 \pm 1,3^{b,D}$	$9,8 \pm 1,6^{a,CD}$
	5	$7,8 \pm 0,6^{b,D}$	$8,5 \pm 0,7^{b,E}$
	40	$5,9 \pm 1,1^{c,E}$	$10,3 \pm 0,5^{a,C}$
	200	$18,6 \pm 2,6^{a,C}$	$9,4 \pm 0,9^{ab,D}$
S	0	$30,6 \pm 1,6^{b,B}$	$13,7 \pm 0,9^{a,A}$
	5	$32,4 \pm 1,1^{a,A}$	$14,3 \pm 0,7^{a,A}$
	40	$30,9 \pm 1,1^{b,AB}$	$14,3 \pm 0,7^{a,A}$
	200	$31,1 \pm 1,0^{b,AB}$	$11,8 \pm 0,4^{b,B}$

Letras minúsculas diferentes, na mesma coluna para cada tipo de plastificante, indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as concentrações de EEP incorporadas; letras maiúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os tipos de plastificantes e concentrações de EEP. Diferença entre as médias obtidas através do teste Duncan, utilizando-se o programa computacional SAS.

No entanto, a adição de óleo essencial de canela em filmes de quitosana, em concentrações de 1,5 e 2,0%, promoveu reduções de 41 e 55% na solubilidade em água dos filmes, respectivamente, devido aos efeitos de ligações cruzadas proporcionadas pelos componentes do óleo na matriz polimérica (Ojagh et al., 2010).

Considerando o tipo de plastificante (CA e S), os resultados das análises de solubilidade (Tabela 4) mostram que, conforme esperado, os filmes plastificados com S apresentaram solubilidade em água muito superior aos filmes plastificados com CA, devido à hidrofobicidade característica do plastificante citrato de acetiltributíla.

Em relação à umidade (Tabela 4), para ambos os plastificantes, praticamente não houve alteração desta propriedade em função do aumento da concentração de EEP. Contudo, os filmes plastificados com CA apresentaram valores de umidade inferiores quando comparados aos filmes com S, o que era esperado em virtude do caráter hidrofóbico e hidrofílico dos plastificantes, respectivamente.

4.2.3. Cor e opacidade

O efeito da incorporação de EEP nos parâmetros de cor (L^* , a^* , b^* e ΔE^*) e opacidade dos filmes à base de gelatina plastificados com citrato de acetiltributíla (CA) e sorbitol (S) pode ser observado na Tabela 5.

Tabela 5 - Luminosidade (L^*), croma a^* (a^*), croma b^* (b^*), diferença total de cor (ΔE^*) e opacidade dos filmes à base de gelatina plastificados com citrato de acetiltributíla (CA) e sorbitol (S) em função da concentração de extrato etanólico de própolis (C_{EEP}).

Plastificante	C_{EEP}	L^*	a^*	b^*	ΔE^*	Opacidade
CA	0	$93,8 \pm 0,9^{a,A}$	$-1,8 \pm 0,1^{b,C}$	$11,0 \pm 2,1^{d,F}$	$9,7 \pm 2,1^{d,F}$	$40,8 \pm 2,7^{a,A}$
	5	$91,6 \pm 0,9^{b,B}$	$-2,6 \pm 0,7^{c,D}$	$16,1 \pm 1,3^{c,E}$	$14,8 \pm 1,4^{c,E}$	$40,7 \pm 2,1^{a,A}$
	40	$87,0 \pm 0,6^{c,D}$	$-3,8 \pm 0,2^{d,E}$	$32,2 \pm 1,5^{b,C}$	$31,7 \pm 1,5^{b,C}$	$39,1 \pm 2,1^{a,A}$
	200	$77,8 \pm 1,1^{d,F}$	$-0,9 \pm 0,3^{a,A}$	$48,6 \pm 2,2^{a,B}$	$49,9 \pm 2,4^{a,B}$	$23,3 \pm 3,5^{b,B}$
S	0	$91,7 \pm 0,0^{a,B}$	$-1,0 \pm 0,1^{a,B}$	$2,6 \pm 0,1^{d,H}$	$3,2 \pm 0,1^{d,H}$	$0,4 \pm 0,1^{c,D}$
	5	$90,8 \pm 0,1^{b,C}$	$-2,4 \pm 0,1^{b,D}$	$7,7 \pm 0,2^{c,G}$	$7,5 \pm 0,2^{c,G}$	$0,2 \pm 0,1^{c,D}$
	40	$87,7 \pm 0,6^{c,D}$	$-7,4 \pm 0,2^{d,F}$	$25,5 \pm 1,8^{b,D}$	$25,4 \pm 1,9^{b,D}$	$2,0 \pm 0,1^{b,D}$
	200	$79,6 \pm 0,8^{d,E}$	$-3,5 \pm 0,6^{c,E}$	$52,9 \pm 1,7^{a,A}$	$53,6 \pm 1,8^{a,A}$	$7,7 \pm 0,5^{a,C}$

C_{EEP} = concentração de extrato etanólico de própolis (g/100g de gelatina). Letras minúsculas diferentes, na mesma coluna para cada tipo de plastificante, indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as concentrações de EEP incorporadas; letras maiúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os tipos de plastificantes e concentrações de EEP. Diferença entre as médias obtidas através do teste Duncan, utilizando-se o programa computacional SAS.

Para ambos os plastificantes estudados (CA e S) o aumento da concentração de EEP provocou redução significativa de L^* e aumento significativo de b^* e ΔE^* , como pode ser observado na Tabela 5 devido à coloração marrom escuro do EEP. Para o parâmetro a^* , houve aumento significativo dos filmes com CA e diminuição dos filmes com S. Os resultados obtidos para os parâmetros de cor, considerando o diagrama CIELab (Figura 2), corroboram com o observado visualmente em relação à cor dos filmes (Figura 3). Comportamento similar foi observado para a diferença total de cor (ΔE^*). Este efeito era esperado em função da cor do extrato, resultados semelhantes foram observados para filmes à base de proteína de soja incorporados com extrato de semente de uva, cuja cor dos mesmos também variou em relação ao padrão, influenciando significativamente os parâmetros L^* , a^* e b^* , devido à presença de compostos fenólicos que contribuem com cores avermelhadas ou amareladas (SIVAROUBAN, HETTIARACHCHY E JOHNSON, 2008).

Figura 3 - Filmes à base de gelatina plastificados com citrato de acetiltributíla (CA) ou sorbitol (S) com diferentes concentrações de extrato etanólico de própolis (C_{EEP}): (a) CA, $C_{EEP} = 0\text{g}/100\text{g}$ de gelatina; (b) CA, $C_{EEP} = 5\text{g}/100\text{g}$ de gelatina; (c) CA, $C_{EEP} = 40\text{g}/100\text{g}$ de gelatina; (d) CA, $C_{EEP} = 200\text{g}/100\text{g}$ de gelatina; (e) S, $C_{EEP} = 0\text{g}/100\text{g}$ de gelatina; (f) S, $C_{EEP} = 5\text{g}/100\text{g}$ de gelatina; (g) S, $C_{EEP} = 40\text{g}/100\text{g}$ de gelatina e (h) S, $C_{EEP} = 200\text{g}/100\text{g}$ de gelatina.

Por outro lado, o tipo de plastificante também afetou significativamente os parâmetros de cor (Tabela 5). Os filmes plastificados com CA, em função da presença da lecitina, apresentaram, de modo geral, coloração mais amarelada (Tabela 5, Figura 3) devido à cor marrom característica da lecitina de soja.

Em relação à opacidade dos filmes, observou-se que o aumento da concentração de EEP provocou aumento da opacidade apenas dos filmes plastificados com sorbitol, provavelmente devido a coloração marron escuro do EEP. No entanto, para os filmes plastificados com CA diferenças significativas foram observadas apenas para a concentração de 200% de EEP, possivelmente associada a um efeito de diluição, uma vez que a solução filmogênica é emulsionada.

4.2.4. Permeabilidade ao vapor de água

Os valores referentes à permeabilidade ao vapor de água dos filmes à base de gelatina e aditivados com própolis encontram-se na Tabela 6. Para os filmes plastificados com citrato de acetiltributíla, verificou-se que a incorporação do extrato etanólico de própolis promoveu redução significativa da permeabilidade em relação ao filme controle ($C_{EEP} = 0\text{g}/100\text{g}$ de gelatina) em função do aumento da concentração de extrato, o que também foi observado para o plastificante sorbitol. No entanto, para este último, não foi possível correlacionar esta variação ao aumento no teor de EEP. Para os filmes controle, o tipo de plastificante não influenciou a permeabilidade, uma vez que não houve variação significativa entre eles. No entanto, na concentração máxima de extrato ($C_{EEP} = 200\text{g}/100\text{g}$ de gelatina), o efeito de redução da permeabilidade foi mais acentuado para o filme plastificado com citrato de acetiltributíla. Os resultados sugerem que altas concentrações de extrato etanólico de própolis alteram a interação da água com a matriz polimérica.

Pastor et al. (2010) também verificaram que a adição de extrato etanólico de própolis (0,125 a 1,5%) em filmes de hidroxipropilmetilcelulose promoveram redução da permeabilidade ao vapor de água.

De maneira similar, Zivanovic, Chi e Draughon (2005) verificaram que filmes de quitosana enriquecidos com óleo de orégano apresentaram redução na permeabilidade ao vapor de água, devido à hidrofobicidade do óleo. Ojagh et al. (2007) também verificaram que a adição de óleo essencial de canela (0,4 – 2%) em filmes de quitosana promoveu redução significativa na permeabilidade em todas as concentrações estudadas.

Tabela 6 - Permeabilidade ao vapor de água (PVA) dos filmes plastificados com citrato de acetiltributíla (CA) e sorbitol (S) em função de diferentes concentrações de extrato etanólico de própolis (C_{EEP}).

Plastificante	C_{EEP} (g/100g de gelatina)	PVA (10^{-8} g mm/ h cm ² Pa)
CA	0	$3,4 \pm 0,2^{a,A}$
	5	$2,8 \pm 0,2^{b,B}$
	40	$2,5 \pm 0,4^{b,BC}$
	200	$1,7 \pm 0,6^{c,D}$
	0	$3,2 \pm 0,1^{a,A}$
S	5	$2,4 \pm 0,1^{c,C}$
	40	$2,6 \pm 0,1^{b,BC}$
	200	$2,3 \pm 0,1^{c,C}$

Letras minúsculas diferentes, na mesma coluna para cada tipo de plastificante, indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as concentrações de EEP incorporadas; letras maiúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os tipos de plastificantes e concentrações de EEP. Diferença entre as médias obtidas através do teste Duncan, utilizando-se o programa computacional SAS.

Também em filmes de quitosana, a análise de permeabilidade dos filmes incorporados com óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* (árvore do chá) mostrou uma significativa redução linear em seus valores com o aumento na concentração do aditivo, alcançando uma redução máxima de 40% da permeabilidade com a incorporação de 2% de óleo na solução filmogênica. Este comportamento era esperado, uma vez que, de acordo com estes autores, um aumento na fração hidrofóbica usualmente permite uma melhora na propriedade de barreira dos filmes (Sánchez-González et al., 2010).

Quanto a outro tipo de macromolécula, Atarés, Bonilla e Chiralt (2010) verificaram que filmes à base de caseinato de sódio contendo óleos essenciais de canela e gengibre apresentaram melhores propriedades de barreira ao vapor de água, embora nenhuma diferença significativa tenha sido verificada entre as amostras com diferentes tipos de óleos ou diferentes concentrações.

4.2.5. Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

Os espectros dos filmes controle, tanto dos plastificados com citrato de acetiltributíla (Figura 4) quanto dos com sorbitol (Figura 5), mostraram bandas típicas referentes à gelatina. A banda situada ao redor do comprimento de onda de 3300cm^{-1} é atribuída principalmente ao estiramento do grupo N-H de amida A; enquanto que as bandas localizadas nas regiões entre 1700 e 1600cm^{-1} e 1600 e 1500cm^{-1} devem-se, respectivamente, à amida I (estiramento C=O) e amida II (estiramento de C-N e deformação angular da ligação N-H); e amida III com bandas

entre 1200 e 1400cm^{-1} (PRYSTUPA; DONALD, 1996, SIONKOWSKA et al., 2004). Para o filme plastificado com citrato de acetiltributíla o espectro mostra uma banda de absorção ao redor do comprimento de onda de 1750cm^{-1} , que se refere ao grupo funcional éster carboxílico proveniente do plastificante utilizado (ANDREUCCETTI; CARVALHO; GROSSO, 2010).

Por sua vez, a análise dos resultados de FTIR para os filmes plastificados com citrato de acetiltributíla ou sorbitol e incorporados com extrato etanólico de própolis indica que a adição do bioativo não promoveu mudanças estruturais em relação ao filme controle, uma vez que não houve mudanças nas bandas características dos filmes contendo apenas macromolécula e plastificante, como pode ser visualizado nas Figuras 4 e 5. Os espectros dos filmes aditivados com diferentes concentrações de EEP apresentam o mesmo padrão do filme controle, o que sugere que não ocorreu nenhuma interação entre os grupos funcionais do extrato etanólico de própolis e os grupos da gelatina. Resultados semelhantes foram encontrados por Maizura et al. (2007) e Altioek et al. (2010) em filmes contendo componentes bioativos.

Figura 4 - Espectros de infravermelho de filmes à base de gelatina plastificados com citrato de acetiltributíla e diferentes concentrações de extrato etanólico de própolis (C_{EEP}).

Figura 5 - Espectros de infravermelho de filmes à base de gelatina plastificados com sorbitol e diferentes concentrações de extrato etanólico de própolis (C_{EEP}).

4.2.6. Microscopia eletrônica de varredura

A microestrutura (superficial e da fratura) dos filmes à base de gelatina aditivados com própolis pode ser observada na Figura 6 e Figura 7. Comparando-se as micrografias dos filmes plastificados com citrato de acetiltributíla e aditivados com própolis (Figuras 6c, 6d, 6e, 6f, 6g e 6h) com o filme controle (Figuras 6a e 6b) verificou-se que a adição do extrato etanólico de própolis não afetou a estrutura (superfície e interna) da matriz polimérica. Em relação à superfície dos filmes (Figuras 6a, 6c, 6e e 6g) verificou-se a presença de depressões, possivelmente associadas à formação de caminhos preferenciais, durante a secagem, para a eliminação do ar incorporado durante a agitação intensa no processo de preparo dos filmes. De maneira similar, a incorporação de EEP não afetou a estrutura interna (micrografia da fratura) dos filmes, que com ou sem própolis apresentaram irregularidades côncavas e convexas. Deve-se destacar que, embora, após a secagem, os filmes plastificados com citrato de acetiltributíla, na presença ou não de EEP, visualmente tenham apresentado um aspecto homogêneo e uma superfície contínua, as micrografias mostram um aspecto heterogêneo com a presença de gotículas, provenientes do processo de emulsificação, na superfície dos filmes, o que também foi observado por Andreuccetti, Carvalho e Grosso (2010).

Figura 6 - Imagens fotográficas obtidas por microscopia eletrônica de varredura dos filmes plastificados com citrato de acetiltributíla e com diferentes concentrações de extrato etanólico de própolis (C_{EEP}): (a) $C_{EEP} = 0\text{g}/100\text{g}$ de gelatina; imagem da superfície (6.000x); (b) $C_{EEP} = 0\text{ g}/100\text{ g}$ de gelatina; imagem da fratura (6.000x); (c) $C_{EEP} = 5\text{g}/100\text{g}$ de gelatina; imagem da superfície (6.000x); (d) $C_{EEP} = 5\text{g}/100\text{g}$ de gelatina; imagem da fratura (6.000x); (e) $C_{EEP} = 40\text{g}/100\text{g}$ de gelatina; imagem da superfície (6.000x); (f) $C_{EEP} = 40\text{g}/100\text{ g}$ de gelatina; imagem da fratura (6.000x); (g) $C_{EEP} = 200\text{g}/100\text{g}$ de gelatina; imagem da superfície (6.000x); (h) $C_{EEP} = 200\text{g}/100\text{g}$ de gelatina; imagem da fratura (6.000x).

Para os filmes plastificados com sorbitol, de um modo geral, a análise das micrografias de superfície dos filmes (Figuras 7a, 7c, 7e e 7g) mostrou uma estrutura homogênea, independente da presença ou não do extrato etanólico de própolis. Nas micrografias referentes à fratura (Figuras 7b, 7d, 7f e 7h), entretanto, verificou-se que o filme controle apresentou uma estrutura mais compacta e que o aumento da concentração de EEP, aparentemente, provocou um aumento da rugosidade da matriz, possivelmente associado à insolubilização do EEP.

Comparando-se os filmes plastificados com citrato de acetiltributíla e sorbitol (Figura 6 e Figura 7), verificou-se que o filme plastificado com sorbitol apresentou uma estrutura superficial mais lisa e homogênea, e a estrutura interna apresentou-se mais compacta dos que os filmes plastificados com citrato de acetiltributíla. Esta diferença pode ser atribuída ao processo de emulsificação envolvido na produção do filme plastificado com CA.

O efeito da incorporação de componentes ativos na matriz polimérica é influenciado por diferentes fatores, tais como, tipo e tamanho da molécula, além da interação com a macromolécula. Assim, os estudos relacionados à avaliação da microestrutura de filmes comestíveis e/ou biodegradáveis em função da incorporação de componentes bioativos apresentam diferentes resultados. Por exemplo, a adição de óleo de tomilho aumentou a rugosidade de filmes de quitosana em relação ao controle. Os filmes aditivados apresentaram bolhas que, segundo os autores, é decorrência da rápida evaporação do óleo de tomilho, sendo que o tamanho e o número de bolhas também aumentaram com o aumento da concentração do bioativo. Além disso, as micrografias indicaram que um aumento na concentração do bioativo resultou em uma estrutura mais porosa, em que os poros estavam distribuídos homogeneamente (ALTIOK et al., 2010).

A análise da micrografia da seção transversal de filmes à base de caseinato de sódio contendo óleo de canela, em relação a filmes sem a adição do óleo, não mostrou nenhuma diferença em seu aspecto microestrutural, sugerindo que o óleo permaneceu homogeneamente distribuído na matriz protéica seca. Todavia, nos filmes aditivados com óleo de gengibre, as gotículas de óleo apareceram como irregularidades distribuídas homogeneamente através da espessura do filme, possivelmente associadas ao comportamento das gotículas deste óleo durante a secagem (ATARÉS; BONILLA; CHIRALT, 2010).

Figura 7 - Imagens fotográficas obtidas por microscopia eletrônica de varredura dos filmes plastificados com sorbitol e com diferentes concentrações de extrato etanólico de própolis (C_{EEP}): (a) $C_{EEP} = 0\text{g}/100\text{g}$ de gelatina; imagem da superfície (6.000x); (b) $C_{EEP} = 0\text{g}/100\text{g}$ de gelatina; imagem da fratura (6.000x); (c) $C_{EEP} = 5\text{g}/100\text{g}$ de gelatina; imagem da superfície (6.000x); (d) $C_{EEP} = 5\text{g}/100\text{g}$ de gelatina; imagem da fratura (6.000x); (e) $C_{EEP} = 40\text{g}/100\text{g}$ de gelatina; imagem da superfície (6.000x); (f) $C_{EEP} = 40\text{g}/100\text{g}$ de gelatina; imagem da fratura (6.000x); (g) $C_{EEP} = 200\text{g}/100\text{g}$ de gelatina; imagem da superfície (6.000x); (h) $C_{EEP} = 200\text{g}/100\text{g}$ de gelatina; imagem da fratura (6.000x).

4.2.7. Atividade antimicrobiana e concentração de polifenóis

De acordo com alguns autores (FUNARI; FERRO, 2006; HAVSTEEN et al., 2002; WILLIAMS; SPENCER; RICE-EVANS, 2004), as propriedades biológicas da própolis devem-se, fundamentalmente, à presença de polifenóis. Em virtude disso, os filmes aditivados com extrato etanólico de própolis nas concentrações de 0, 5, 40 e 200g/100g de gelatina foram avaliados qualitativamente quanto sua atividade antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus* e quantitativamente quanto à concentração total de polifenóis presentes na matriz, cujos resultados estão expressos na Tabela 7.

Tabela 7 - Concentração de polifenóis ($C_{\text{Polifenóis}}$) e diâmetro de inibição microbiana ($D_{\text{Inibição}}$) para os filmes plastificados com citrato de acetiltributíla (CA) e sorbitol (S) em função da concentração de extrato etanólico de própolis (C_{EEP}).

Plastificante	C_{EEP} (g/100g de gelatina)	$C_{\text{polifenóis}}$ (mg de ácido gálico/g de filme)	$D_{\text{Inibição}}$
CA	0	*	0
	5	*	0
	40	$9,3 \pm 1,1^{b,B}$	$22,9 \pm 1,0^{b,B}$
	200	$51,5 \pm 1,5^{a,A}$	$26,9 \pm 0,6^{a,A}$
S	0	*	0
	5	*	0
	40	$8,8 \pm 0,6^{b,B}$	$22,8 \pm 0,7^{b,B}$
	200	$50,5 \pm 1,7^{a,A}$	$26,4 \pm 0,7^{a,A}$

* valores não determinados devido à imprecisão do método para concentrações baixas. Letras minúsculas diferentes, na mesma coluna para cada tipo de plastificante, indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as concentrações de EEP incorporadas; letras maiúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os tipos de plastificantes e concentrações de EEP. Diferença entre as médias obtidas através do teste Duncan, utilizando-se o programa computacional SAS.

A análise de polifenóis (Tabela 7) para os filmes (plastificados com citrato de acetiltributíla e sorbitol) com menor concentração de EEP (5%) apresentou leituras de absorbância muito reduzidas ($\leq 0,030$), indicando falta de sensibilidade analítica do método espectrofotométrico para estas concentrações de EEP na matriz polimérica, logo os valores da concentração de polifenóis não foram determinados.

Os filmes plastificados com citrato de acetiltributíla (Figura 8) e sorbitol (Figura 9) contendo 0 e 5g EEP/100 g de gelatina também não apresentaram atividade inibitória contra *S. aureus*. Deve-se destacar que, para a concentração de 5g de EEP/100g de gelatina, observou-se crescimento bacteriano na superfície dos filmes, indicando que, nesta concentração de extrato, os filmes não apresentaram nenhum efeito inibitório contra *S. aureus* (Figuras 8 e 9).

Todavia, para concentrações de EEP superiores a 5%, para ambos os plastificantes usados, o aumento da concentração de extrato etanólico provocou aumento significativo, como esperado, da concentração de polifenóis e do diâmetro de inibição, conforme pode ser observado na Tabela 7.

Figura 8 - Atividade antimicrobiana dos filmes plastificados com citrato de acetiltributíla contra *S. aureus*: (a) $C_{EEP} = 0\text{g}/100\text{g}$ de gelatina e (b) $C_{EEP} = 5\text{g}/100\text{g}$ de gelatina.

Figura 9 - Atividade antimicrobiana dos filmes plastificados com sorbitol contra *S. aureus*: a) $C_{EEP} = 0\text{g}/100\text{g}$ de gelatina e (b) $C_{EEP} = 5\text{g}/100\text{g}$ de gelatina

Quanto à inibição de *S. aureus* por outros compostos bioativos, que também apresentam compostos fenólicos em sua composição química, pode-se citar o estudo realizado por Pranoto, Salokhe e Rakshit (2005) onde filmes à base de alginato aditivados com óleo de alho apresentaram efeito inibitório sobre a bactéria testada a partir da concentração de 0,2% do aditivo na solução filmogênica, com diâmetro de inibição de 20,1mm, considerando o diâmetro de 17mm do filme. Seydim e Sarikus (2006) obtiveram como concentração mínima inibitória os valores de 2% e 3% (solução filmogênica), respectivamente, para filmes de proteína do soro de leite contendo óleos essenciais de orégano e alho. Entretanto, em filmes de proteínas de soja, a concentração mínima de 1% dos óleos de orégano e tomilho foi suficiente para inibir *S. aureus*, verificando-se que o aumento na concentração dos óleos (2 - 5%) aumentou significativamente os diâmetros de inibição, que variaram de 42,0 a 49,5mm

para o óleo de orégano, e de 38,0 a 49,5mm para o óleo de tomilho, considerando o diâmetro de 17mm dos filmes (EMIROĞLU et al. 2010). Para filmes de quitosana contendo também óleo de tomilho, a menor concentração capaz de inibir *S. aureus* foi 1% (solução filmogênica), com diâmetro de 15,5mm, para o filme com diâmetro de 14mm (ALTIOK et al., 2010).

Estes resultados mostraram que o efeito inibitório do bioativo também parece estar associado à macromolécula utilizada na formulação dos filmes.

Em função dos resultados obtidos, o efeito do tempo de armazenamento na atividade antimicrobiana foi avaliado apenas para os filmes aditivados com concentrações de extrato etanólico de própolis de 40 e 200g/100g de gelatina.

4.3. Avaliação do efeito do tempo de armazenamento na concentração de polifenóis, atividade antimicrobiana, cor e opacidade dos filmes aditivados com extrato etanólico de própolis

Visando determinar a estabilidade do extrato etanólico de própolis na matriz polimérica à base de gelatina, os filmes foram avaliados em função do tempo de armazenamento (177 dias) quanto à concentração de polifenóis e atividade antibacteriana. Os parâmetros de cor L^* , a^* , b^* e ΔE^* e a opacidade dos filmes também foram avaliados durante o acondicionamento.

4.3.1. Concentração de polifenóis

A concentração de polifenóis para os filmes plastificados com citrato de acetiltributíla (Tabela 8) e sorbitol (Tabela 9) variou significativamente durante o armazenamento, para ambas as concentrações de extrato etanólico de própolis.

As concentrações de polifenóis, em função do tempo de armazenamento, para os filmes plastificados com citrato de acetiltributíla variaram entre 8,6 e 13,1mg de ácido gálico/g de filme (40g de EEP/100g de gelatina) e entre 47,5 e 55,4mg de ácido gálico/g de filme (200g de EEP/100g de gelatina). Para os filmes plastificados com sorbitol as concentrações variaram entre 8,8 e 13,2mg de ácido gálico/g de filme (40g de EEP/100g de gelatina) e entre 50,3 e 58,0mg de ácido gálico/g de filme (200g de EEP/100g de gelatina).

Entretanto, independente do plastificante utilizado, não foi possível estabelecer uma correlação entre a concentração e o tempo de armazenamento.

Tabela 8 - Concentração de polifenóis ($C_{\text{Polifenóis}}$) para os filmes plastificados com citrato de acetiltributíla (CA) com diferentes concentrações de extrato etanólico de própolis (C_{EEP}) em função do tempo de armazenamento.

C_{EEP} (g/100g de gelatina)	Tempo (dias)	$C_{\text{Polifenóis}}$ (mg de ácido gálico/g de filme)
40	0	$9,3 \pm 1,1^c$
	14	$11,4 \pm 1,1^b$
	28	$13,1 \pm 1,4^a$
	56	$8,7 \pm 1,0^c$
	84	$12,4 \pm 1,2^a$
	112	$8,6 \pm 1,2^c$
	134	$10,8 \pm 1,3^b$
	156	$12,8 \pm 1,2^a$
	177	$10,9 \pm 0,9^b$
	0	$51,5 \pm 1,5^{bcd}$
200	14	$50,9 \pm 1,4^{cd}$
	28	$55,4 \pm 1,5^a$
	56	$51,3 \pm 1,2^{bcd}$
	84	$52,6 \pm 1,6^b$
	112	$47,5 \pm 1,4^e$
	134	$51,1 \pm 2,8^{bcd}$
	156	$52,2 \pm 1,6^{bc}$
	177	$50,5 \pm 1,2^d$

Letras minúsculas diferentes na mesma coluna, para cada concentração de EEP, indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre o tempo de armazenamento. Diferença entre as médias obtidas através do teste Duncan, utilizando-se o programa computacional SAS.

Deve-se ressaltar que a determinação de polifenóis foi realizada após a solubilização de amostras dos filmes (11 a 12mg) em água, de forma que pequenas alterações neste processo podem ter afetado drasticamente a análise. Outro aspecto importante é a distribuição do extrato na matriz polimérica.

Contudo, verificou-se que, apesar da grande variabilidade de resultados referentes ao tempo de armazenamento, a matriz polimérica, tanto plastificada com citrato de acetiltributíla quanto com sorbitol, foi capaz de preservar os polifenóis durante o período de acondicionamento.

Tabela 9 - Concentração de polifenóis ($C_{\text{Polifenóis}}$) para os filmes plastificados com sorbitol com diferentes concentrações de extrato etanólico de própolis (C_{EEP}) em função do tempo de armazenamento.

C_{EEP} (g/100g de gelatina)	Tempo (dias)	$C_{\text{Polifenóis}}$ (mg de ácido de gálico/g de filme)
40	0	$8,8 \pm 0,6^d$
	14	$10,7 \pm 0,9^b$
	28	$9,3 \pm 1,0^{cd}$
	56	$9,6 \pm 1,4^c$
	84	$9,1 \pm 0,7^{cd}$
	112	$10,6 \pm 1,0^b$
	134	$13,2 \pm 0,8^a$
	156	$10,8 \pm 0,9^b$
	177	$11,3 \pm 1,2^b$
	0	$50,5 \pm 1,7^e$
200	14	$52,8 \pm 2,0^{cd}$
	28	$50,3 \pm 1,3^e$
	56	$51,7 \pm 1,8^{de}$
	84	$51,4 \pm 1,5^{de}$
	112	$53,9 \pm 1,8^{bc}$
	134	$58,0 \pm 2,3^a$
	156	$54,5 \pm 1,0^b$
	177	$53,8 \pm 2,4^{bc}$

Letras minúsculas diferentes na mesma coluna, para cada concentração de EEP, indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre o tempo de armazenamento. Diferença entre as médias obtidas através do teste Duncan, utilizando-se o programa computacional SAS.

4.3.2. Atividade antimicrobiana

Os resultados do diâmetro de inibição, de um modo geral, mostram que os filmes aditivados com própolis e plastificados com citrato de acetiltributíla (Figura 10) e sorbitol (Figura 11) mantiveram sua atividade antimicrobiana, durante o período analisado, independente da concentração de extrato etanólico de própolis. Todavia, o aumento da concentração de extrato na matriz polimérica provocou, como esperado, aumento do diâmetro de inibição indicando um aumento da atividade inibitória dos filmes sobre *S. aureus*, possivelmente associado ao aumento da concentração de polifenóis. Não foi possível estabelecer uma correlação entre o tempo de armazenamento e a atividade antimicrobiana devido à variação observada no diâmetro de inibição, o que talvez esteja associado a variações na distribuição do extrato etanólico de própolis na matriz polimérica.

Figura 10 - Diâmetro de inibição microbiana (mm) contra *S. aureus* versus tempo de armazenamento (dias) dos filmes plastificados com citrato de acetiltributíla para diferentes concentrações de extrato etanólico de própolis (C_{EEP}). Letras minúsculas diferentes, para cada concentração de EEP, indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre o tempo de armazenamento. Diferença entre as médias obtidas através do teste Duncan, utilizando-se o programa computacional SAS.

Apesar das variações, é interessante evidenciar que no período analisado os filmes mantiveram sua atividade antimicrobiana contra *S. aureus*, com diâmetros que variaram para os filmes plastificados com citrato de acetiltributíla entre 20,2 e 22,9mm, para $C_{EEP} = 40\%$, e entre 22,9 e 26,9mm, para $C_{EEP} = 200\%$. Em relação aos filmes plastificados com sorbitol, os diâmetros variaram entre 21,2 e 25,4mm, para $C_{EEP} = 40\%$, e entre 25,4 e 29,3mm, para $C_{EEP} = 200\%$.

Quanto ao tipo de plastificante, observou-se que os filmes plastificados com sorbitol, para as duas concentrações de EEP (40 e 200%), apresentaram diâmetros de inibição (Figura 11) ligeiramente superiores aos diâmetros observados para os filmes plastificados com citrato de acetiltributíla (Figura 10) nas concentrações correspondentes. Este resultado pode estar associado a distribuição e difusão do extrato na matriz polimérica, sendo que para os filmes plastificados com sorbitol, aparentemente a liberação deste no ágar foi superior, o que ocasionou maior inibição da bactéria.

Figura 11 - Diâmetro de inibição microbiana (mm) contra *S. aureus* versus tempo de armazenamento (dias) dos filmes plastificados com sorbitol para diferentes concentrações de extrato etanólico de própolis (C_{EEP}). Letras minúsculas diferentes, para cada concentração de EEP, indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre o tempo de armazenamento. Diferença entre as médias obtidas através do teste Duncan, utilizando-se o programa computacional SAS.

Exemplos das placas utilizadas na determinação do diâmetro médio de inibição para avaliação da atividade antimicrobiana, para os filmes plastificados com citrato de acetiltributíla, podem ser observados na Figura 12 ($C_{EEP} = 40\%$) e na Figura 13 ($C_{EEP} = 200\%$). Visualmente, observou-se que a inibição microbiana sobre *S. aureus* manteve-se constante nas duas concentrações estudadas, e que com algumas sutis diferenças, em ambas o comportamento foi similar em função do tempo de armazenamento.

Figura 12 - Atividade antimicrobiana dos filmes plastificados com citrato de acetiltributíla e aditivados com 40g de EEP/100g de gelatina contra *S. aureus* em função do tempo de armazenamento: (a) 0 dias, (b) 14 dias, (c) 28 dias, (d) 56 dias, (e) 84 dias, (f) 112 dias, (g) 134 dias, (h) 156 dias e (i) 177 dias.

Figura 13 - Atividade antimicrobiana dos filmes plastificados com citrato de acetiltributíla e aditivados com 200g de EEP/100g de gelatina contra *S. aureus* em função do tempo de armazenamento: (a) 0 dias, (b) 14 dias, (c) 28 dias, (d) 56 dias, (e) 84 dias, (f) 112 dias, (g) 134 dias, (h) 156 dias e (i) 177 dias.

Os resultados observados visualmente para os filmes plastificados com sorbitol (Figura 14 e Figura 15) foram similares aos observados para os filmes plastificados com citrato de acetiltributíla. A análise visual das placas microbiológicas, também evidenciou que os filmes com maior concentração de extrato etanólico de própolis apresentaram maior capacidade de inibição bacteriana.

Figura 14 - Atividade antimicrobiana dos filmes plastificados com sorbitol e aditivados com 40g de EEP/100g de gelatina contra *S. aureus* em função do tempo de armazenamento: (a) 0 dias, (b) 14 dias, (c) 28 dias, (d) 56 dias, (e) 84 dias, (f) 112 dias, (g) 134 dias, (h) 156 dias e (i) 177 dia.

Figura 15 - Atividade antimicrobiana dos filmes plastificados com sorbitol e aditivados com 200g de EEP/100g de gelatina contra *S. aureus* em função do tempo de armazenamento: (a) 0 dias, (b) 14 dias, (c) 28 dias, (d) 56 dias, (e) 84 dias, (f) 112 dias, (g) 134 dias, (h) 156 dias e (i) 177 dias.

Quanto às análises de estabilidade do extrato etanólico de própolis incorporado à matriz de gelatina, bem como a sua propriedade antimicrobiana contra *S. aureus*, é importante ressaltar que não foram encontrados na literatura trabalhos relacionando estabilidade e atividade antibacteriana em função do tempo de armazenamento.

4.3.3. Parâmetros de cor e opacidade

Para os filmes plastificados com citrato de acetiltributíla (Tabela 10), em ambas as concentrações, verificou-se variações significativas dos parâmetros de cor (L , a^* e b^*) e na diferença total de cor (ΔE^*) em função do tempo de armazenamento. Entretanto, essas variações foram reduzidas. Para os filmes aditivados com 40% de EEP, verificou-se que os

valores de L^* variaram entre 84,8 a 89,4, a^* entre -3,9 e -4,3, b^* entre 31,3 e 34,1 e diferença total de cor entre 30,9 e 33,5. Para os filmes contendo 200% de EEP, L^* variou entre 74 e 78,1, a^* entre -0,2 e 1,8, b^* entre 49,3 e 52,8, ΔE^* entre 51,7 e 54,6. Em relação à opacidade, para a concentração de 200% de extrato etanólico foi observada um aumento significativo da opacidade dos filmes, já para a concentração de 40% de EEP não foi observada variação significativa.

Tabela 10 - Efeito do tempo de armazenamento (t) nos parâmetros de cor (L^* , a^* e b^*), diferença total de cor (ΔE^*) e opacidade dos filmes à base de gelatina plastificados com citrato de acetiltributíla e aditivados com diferentes concentrações de extrato etanólico de própolis (C_{EEP}).

C_{EEP}	t (dias)	L^*	a^*	b^*	ΔE^*	Opacidade
40	0	$87,4 \pm 0,4^c$	$-4,0 \pm 0,1^a$	$31,3 \pm 1,0^c$	$30,9 \pm 1,1^c$	$36,4 \pm 2,2^a$
	14	$88,0 \pm 0,1^b$	$-4,0 \pm 0,1^a$	$31,9 \pm 0,9^{bc}$	$31,5 \pm 0,9^{bc}$	$37,5 \pm 2,7^a$
	28	$87,3 \pm 0,3^c$	$-3,9 \pm 0,13^a$	$32,5 \pm 0,9^{bc}$	$31,9 \pm 0,9^{abc}$	$38,1 \pm 2,7^a$
	56	$87,3 \pm 0,2^c$	$-4,0 \pm 0,1^a$	$32,6 \pm 0,6^{abc}$	$32,1 \pm 0,6^{abc}$	$38,6 \pm 2,2^a$
	84	$87,4 \pm 0,3^c$	$-3,9 \pm 0,1^a$	$33,2 \pm 0,6^{ab}$	$32,6 \pm 0,7^{ab}$	$40,1 \pm 1,9^a$
	112	$89,4 \pm 0,3^a$	$-4,0 \pm 0,2^a$	$34,1 \pm 1,0^a$	$33,5 \pm 1,0^a$	$39,5 \pm 2,6^a$
	134	$87,3 \pm 0,3^c$	$-3,9 \pm 0,1^a$	$33,1 \pm 0,8^{ab}$	$32,5 \pm 0,8^{abc}$	$39,1 \pm 2,4^a$
	156	$87,3 \pm 0,4^c$	$-3,9 \pm 0,2^a$	$33,4 \pm 0,9^{ab}$	$32,8 \pm 0,9^{ab}$	$40,2 \pm 2,5^a$
	177	$84,8 \pm 0,6^d$	$-4,3 \pm 0,1^b$	$31,3 \pm 0,6^c$	$31,3 \pm 0,6^{bc}$	$40,7 \pm 3,0^a$
200	0	$77,0 \pm 0,8^{abc}$	$-0,2 \pm 0,5^d$	$49,9 \pm 1,2^{cd}$	$51,5 \pm 1,4^e$	$23,5 \pm 1,5^e$
	14	$77,7 \pm 0,2^{ab}$	$0,1 \pm 0,1^d$	$50,7 \pm 0,3^{bc}$	$52,3 \pm 0,3^{bcde}$	$24,4 \pm 1,2^{ed}$
	28	$77,0 \pm 0,2^{abc}$	$0,4 \pm 0,1^{cd}$	$50,6 \pm 0,2^{bc}$	$52,1 \pm 0,3^{cde}$	$25,4 \pm 0,8^{cde}$
	56	$76,5 \pm 0,8^c$	$0,8 \pm 0,5^{bc}$	$51,4 \pm 0,6^b$	$53,1 \pm 0,9^{bcd}$	$26,5 \pm 1,7^{bcd}$
	84	$76,6 \pm 0,7^{bc}$	$1,0 \pm 0,5^{bc}$	$51,3 \pm 0,5^b$	$52,9 \pm 0,7^{bcde}$	$27,9 \pm 1,4^{abc}$
	112	$78,1 \pm 0,2^a$	$1,4 \pm 0,1^{ab}$	$52,8 \pm 0,5^a$	$54,6 \pm 0,5^a$	$27,7 \pm 0,6^{abc}$
	134	$76,4 \pm 0,4^c$	$1,2 \pm 0,3^{ab}$	$51,6 \pm 0,4^b$	$53,3 \pm 0,5^{abc}$	$27,2 \pm 1,3^{abc}$
	156	$75,9 \pm 0,8^c$	$1,8 \pm 0,4^a$	$51,7 \pm 0,5^b$	$53,6 \pm 0,7^{ab}$	$29,6 \pm 1,7^a$
	177	$74,0 \pm 0,5^d$	$0,5 \pm 0,4^{cd}$	$49,3 \pm 0,5^d$	$51,7 \pm 0,7^{ed}$	$28,4 \pm 1,8^a$

C_{EEP} = concentração de extrato etanólico de própolis (g/100g de gelatina), letras diferentes na mesma coluna (para cada concentração, considerando apenas o efeito do tempo) indicam diferença significativa ($p < 0,05$). Diferença entre as médias obtidas através do teste Duncan, utilizando-se o programa computacional SAS.

Quanto aos filmes com sorbitol (Tabela 11), na concentração de 40% de EEP o parâmetro L^* apresentou pequena variação (86,2 a 90,9) em relação ao tempo inicial, a^* não variou significativamente (-5,6 a -5,8), assim como b^* (21,1 a 22,9) e ΔE (20,9 a 22,7). Para a concentração de 200% de EEP, L^* apresentou uma redução significativa em seus valores em função do acondicionamento (78,1 – 82,2), a^* variou entre -2,9 e -4,1, b^* apresentou pequenas variações, mas não significativas em relação ao tempo inicial (49,5 a 53,9), assim como ΔE^* que apresentou comportamento similar (50,5 – 54,4). A opacidade dos filmes com

40% de EEP apresentou aumento significativo aos 177 dias de análise, enquanto na concentração de 200% de EEP observaram-se maiores variações em função do tempo de armazenamento (3,3 a 7,0).

Em função da reduzida variação observada para os parâmetros de cor, pode-se sugerir que o extrato etanólico de própolis, e consequentemente os compostos fenólicos, foram mantidos estáveis na matriz polimérica justificando a atividade antimicrobiana observada. Visualmente os filmes também mantiveram a coloração inicial.

Tabela 11 - Efeito do tempo de armazenamento (t) nos parâmetros de cor (L^* , a^* e b^*), diferença total de cor (ΔE^*) e opacidade dos filmes à base de gelatina plastificados com sorbitol e aditivados com diferentes concentrações de extrato etanólico de própolis (C_{EEP}).

C_{EEP}	t (dias)	L^*	a^*	b^*	ΔE^*	Opacidade
40	0	$88,5 \pm 0,1^b$	$-5,7 \pm 0,0^a$	$22,5 \pm 0,1^a$	$22,3 \pm 0,1^a$	$0,8 \pm 0,1^c$
	14	$88,8 \pm 0,1^b$	$-5,6 \pm 0,0^a$	$21,1 \pm 0,4^a$	$20,9 \pm 0,45^a$	$0,7 \pm 0,1^c$
	28	$88,6 \pm 0,1^b$	$-5,7 \pm 0,0^a$	$21,6 \pm 0,1^a$	$21,5 \pm 0,1^a$	$0,7 \pm 0,1^c$
	56	$89,0 \pm 0,1^b$	$-5,8 \pm 0,1^a$	$22,1 \pm 0,5^a$	$21,8 \pm 0,5^a$	$0,7 \pm 0,1^c$
	84	$90,9 \pm 0,4^a$	$-5,7 \pm 0,3^a$	$21,6 \pm 2,2^a$	$21,5 \pm 2,3^a$	$0,8 \pm 0,1^c$
	112	$88,6 \pm 0,3^b$	$-5,6 \pm 0,1^a$	$22,9 \pm 1,0^a$	$22,7 \pm 1,0^a$	$1,1 \pm 0,1^b$
	134	$88,6 \pm 0,1^b$	$-5,7 \pm 0,1^a$	$22,2 \pm 0,5^a$	$22,0 \pm 0,5^a$	$0,7 \pm 0,0^c$
	156	$86,2 \pm 1,3^c$	$-5,7 \pm 0,2^a$	$22,0 \pm 1,1^a$	$22,3 \pm 0,9^a$	$0,8 \pm 0,1^c$
	177	$86,3 \pm 0,3^c$	$-5,8 \pm 0,2^a$	$22,0 \pm 1,0^a$	$22,3 \pm 0,1^a$	$1,2 \pm 0,9^a$
200	0	$80,7 \pm 0,6^{bc}$	$-4,1 \pm 0,4^{bc}$	$51,1 \pm 1,4^{abc}$	$51,5 \pm 1,5^{ab}$	$5,3 \pm 0,2^{cd}$
	14	$80,6 \pm 0,3^{bc}$	$-4,0 \pm 0,2^{abc}$	$51,3 \pm 0,8^{abc}$	$51,7 \pm 0,8^{ab}$	$5,4 \pm 0,2^c$
	28	$80,5 \pm 0,2^{bc}$	$-3,9 \pm 0,2^{abc}$	$52,3 \pm 0,3^{abc}$	$52,8 \pm 0,4^{ab}$	$4,8 \pm 0,2^{de}$
	56	$82,0 \pm 0,5^{ab}$	$-4,8 \pm 0,4^c$	$50,7 \pm 1,6^{bc}$	$50,9 \pm 1,7^b$	$3,3 \pm 0,2^f$
	84	$82,2 \pm 0,7^a$	$-3,6 \pm 0,5^{ab}$	$53,9 \pm 1,7^a$	$54,4 \pm 1,8^a$	$4,4 \pm 0,1^e$
	112	$80,0 \pm 0,7^{cd}$	$-2,9 \pm 0,6^a$	$51,4 \pm 1,3^{abc}$	$52,0 \pm 1,4^{ab}$	$7,0 \pm 0,3^a$
	134	$80,6 \pm 1,4^{bc}$	$-3,7 \pm 1,1^{abc}$	$53,1 \pm 2,9^{ab}$	$53,5 \pm 3,2^{ab}$	$3,6 \pm 0,3^f$
	156	$78,8 \pm 0,9^{de}$	$-3,6 \pm 0,6^{ab}$	$49,8 \pm 0,9^c$	$50,6 \pm 1,1^b$	$6,5 \pm 0,2^b$
	177	$78,1 \pm 0,8^e$	$-3,6 \pm 0,5^{ab}$	$49,5 \pm 0,6^c$	$50,5 \pm 0,6^b$	$6,9 \pm 0,8^{ab}$

C_{EEP} = concentração de extrato etanólico de própolis (g/100g de gelatina), letras diferentes na mesma coluna (para cada concentração, considerando apenas o efeito do tempo) indicam diferença significativa ($p < 0,05$). Diferença entre as médias obtidas através do teste Duncan, utilizando-se o programa computacional SAS.

4.4. Avaliação do efeito do tempo de armazenamento na concentração de polifenóis, atividade antimicrobiana e cor do extrato etanólico de própolis

O extrato etanólico de própolis, armazenado à temperatura ambiente (22 – 25°C) e na ausência de luz, também foi avaliado quanto ao efeito do tempo de armazenamento na concentração de polifenóis, atividade antimicrobiana e parâmetros de cor (L^* , a^* , b^*).

Quanto à concentração de polifenóis no extrato (Tabela 12), verificou-se um decréscimo significativo em relação à concentração inicial, em função do tempo de armazenamento, apresentando no final do período de análise (177 dias) a concentração 42,1mg de ácido gálico/g de extrato, ou seja, uma redução de aproximadamente 19%. Porém, como verificado para o extrato incorporado à matriz polimérica, os polifenóis não se degradaram totalmente. Não foram encontrados trabalhos na literatura sobre a degradação de polifenóis em função do tempo de armazenamento do extrato etanólico de própolis.

Tabela 12 - Concentração de polifenóis ($C_{\text{polifenóis}}$) do extrato etanólico de própolis em função do tempo de armazenamento (t).

t (dias)	$C_{\text{polifenóis}}$ (mg de ácido gálico/g de extrato)
0	$51,9 \pm 2,4^a$
14	$47,7 \pm 2,2^b$
28	$42,9 \pm 3,4^e$
56	$43,6 \pm 1,9^{de}$
84	$47,7 \pm 1,3^b$
112	$44,9 \pm 2,0^{cd}$
134	$46,0 \pm 1,8^c$
156	$44,9 \pm 1,7^{cd}$
177	$42,1 \pm 2,0^e$

Letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre o tempo de armazenamento. Diferença entre as médias obtidas através do teste Duncan, utilizando-se o programa computacional SAS.

As análises microbiológicas contra *S. aureus*, expressas como o diâmetro médio de inibição ao redor dos discos, mostraram que, apesar da variação ocorrida em função do tempo de acondicionamento (Figura 16), o extrato manteve sua atividade antibacteriana. No entanto, não foi possível correlacionar a concentração de polifenóis com esta propriedade biológica do extrato.

Figura 16 - Diâmetro de inibição microbiana (mm) contra *S. aureus* versus tempo de armazenamento (dias) do extrato etanólico de própolis. Letras minúsculas diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre o tempo de armazenamento. Diferença entre as médias obtidas através do teste Duncan, utilizando-se o programa computacional SAS.

Na Figura 17 encontram-se as fotos que ilustram os resultados obtidos na análise microbiológica. Estes resultados confirmam a capacidade de inibição de *S. aureus* pelo extrato etanólico de própolis já apresentada por outros estudos (LU; CHEN; CHOU, 2005; CHOI et al., 2006; MOHAMMADZADEH et al., 2007; CHAILLOU; NAZARENO, 2009; KALOGEROPOULOS et al., 2009) e de que, apesar da variabilidade na concentração de polifenóis, a própolis mantém sua principal atividade biológica.

Os resultados referentes à avaliação da cor do extrato etanólico de própolis em função do tempo de armazenamento (Tabela 13) mostraram que a luminosidade L^* , a^* e b^* apresentaram aumento significativo durante o período analisado.

Figura 17 - Atividade antimicrobiana do extrato etanólico de própolis contra *S. aureus* em função do tempo de armazenamento: a) 0 b) 14 c) 28 d) 56 e) 84 f) 112 g) 134 h) 156 i) 177 dias.

Tabela 13 - Efeito do tempo de armazenamento (t) nos parâmetros de cor (L^* , a^* e b^*) do extrato etanólico de própolis.

t (dias)	L^*	a^*	b^*
0	$0,8 \pm 0,4^b$	$0,4 \pm 0,3^d$	$0,3 \pm 0,2^{bc}$
28	$0,6 \pm 0,1^b$	$0,6 \pm 0,2^{cd}$	$-0,1 \pm 0,3^{bc}$
56	$0,5 \pm 0,0^b$	$0,6 \pm 0,2^{cd}$	$0,3 \pm 0,3^{bc}$
84	$0,5 \pm 0,1^b$	$0,6 \pm 0,2^{cd}$	$-0,1 \pm 0,2^{bc}$
112	$0,6 \pm 0,1^b$	$1,4 \pm 0,2^{ab}$	$0,4 \pm 0,1^b$
134	$0,8 \pm 0,1^b$	$0,7 \pm 0,4^{cd}$	$-0,2 \pm 0,3^c$
156	$0,7 \pm 0,1^b$	$1,0 \pm 0,2^{bc}$	$-0,1 \pm 0,3^{bc}$
177	$2,4 \pm 0,1^a$	$1,7 \pm 0,3^a$	$1,2 \pm 0,5^a$

Letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre o tempo de armazenamento. Diferença entre as médias obtidas através do teste Duncan, utilizando-se o programa computacional SAS.

5. CONCLUSÃO

Quanto aos efeitos nas propriedades mecânicas da incorporação do extrato etanólico de própolis (EEP) nos filmes à base de gelatina, verificou-se para a tensão na ruptura, alongação e módulo elástico, variações significativas em função do aumento da concentração de EEP, para ambos os plastificantes (CA e S). No entanto, os testes de perfuração mostraram que o aditivo não promoveu alterações na força de ruptura dos filmes, independente do tipo de plastificante utilizado, sendo que para a deformação pequenas variações foram observadas.

A umidade dos filmes (CA e S) e a solubilidade do filme plastificado com sorbitol foram pouco influenciadas pela adição do extrato, que, entretanto, aumentou significativamente a solubilidade do filme plastificado com citrato de acetiltributíla a 200% de EEP. Devido à coloração marrom escuro do extrato, a cor e a opacidade dos filmes aditivados foram significativamente alteradas.

Em relação à propriedade de barreira, o EEP promoveu redução da permeabilidade ao vapor de água, para ambos os plastificantes, o que demonstra uma importante característica deste filme bioativo quando se pensa na utilização do mesmo como material de embalagem. Os filmes (CA e S) contendo concentrações de EEP superiores a 5% mostraram efetiva inibição contra *Staphylococcus aureus*. A avaliação do efeito do tempo sobre esta propriedade mostrou que os filmes aditivados mantiveram a capacidade antibacteriana por um período de 177 dias, o que pode ser associado à também conservação dos compostos fenólicos na matriz polimérica durante o armazenamento. Também se observou que, apesar de pequenas variações, a cor e opacidade dos filmes foram mantidas. A análise adicional do extrato mostrou que o fato da própolis estar incorporada à matriz de gelatina, não alterou as propriedades antimicrobianas desta substância.

Portanto, de modo geral, os resultados obtidos para os filmes bioativos foram bastante interessantes e atenderam aos propósitos deste estudo, o que torna possível futuros trabalhos que visem à aplicação destes filmes na conservação de produtos alimentícios ou como suporte do composto bioativo.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGÜERO, M. B. et al. Argentinean propolis from *Zuccagnia punctata* Cav. (Caesalpinieae) exudates: Phytochemical characterization and antifungal activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v.58, p.194–201, 2010.

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**, London, v.88, p.185-193, 2008.

AHN, MORK-RYEON et al. Antioxidant activity and constituents of propolis collected in various areas of China. **Food Chemistry**, London, v.101, p.1383–1392, 2007.

ALENCAR, S. M. **Estudo fitoquímico da origem botânica da própolis e avaliação da composição química de mel de *Apis mellifera* africanizada de diferentes regiões do Brasil**. 2002. 120f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2002.

ALENCAR, S. M. et al. Composição química de *Baccharis dracunculifolia*, fonte botânica das própolis dos estados de São Paulo e Minas Gerais. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.35, n.4 p.909–915, 2005.

ALTIOK, D. et al. Physical, antibacterial and antioxidant properties of chitosan films incorporated with thyme oil for potential wound healing applications. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, London, v.21, p.2227–2236, 2010.

AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS. E96-95: Standard test methods for water vapor transmission of materials. Philadelphia, 1995.

ANDREUCCETTI, C.; CARVALHO, R. A.; GROSSO, C. R. F. Effect of hydrophobic plasticizers on functional properties of gelatin-based films. **Food Research International**, Barking (Inglaterra), v.42, p.1113–1121, 2009.

ANDREUCCETTI, C.; CARVALHO, R. A.; GROSSO, C. R. F. Gelatin-based films containing hydrophobic plasticizers and saponin from *Yucca schidigera* as the surfactant. **Food Research International**, Barking (Inglaterra), v.43, p.1710–1718, 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**, Essex, v.100, p.678–687, 2010.

BAGG, J.; et al. Susceptibility to *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil of yeasts isolated from the mouths of patients with advanced cancer. **Oral Oncology**, Oxford, v.42, n.5, p.487–492, 2006.

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

BANKOVA, V.S.; CASTRO, S.L.; MARCUCCI, M.C. Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. **Apidologie**, Versailles, v.31, p.3–15, 2000.

BOYANOVA, L. et al. *In vitro* activity of Bulgarian propolis against 94 clinical isolates of anaerobic bacteria. **Anaerobe**, v.12, p.173–177, 2006.

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

CAGRI, A.; USTUNOL, Z.; RYSER, E.T. Antimicrobial, mechanical, and moisture barrier properties of low pH whey protein-based edible films containing p-aminobenzoic or sorbic acids. **Journal of Food Science**, Chicago, v.66, n.6, p.865–870, 2001.

CAO, N.; YANG, X.; FU, Y. Effects of various plasticizers on mechanical and water vapor barrier properties of gelatin films. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v.23, p.729–735, 2009.

CAO-HOANG, L. et al. Importance and efficiency of in-depth antimicrobial activity for the control of listeria development with nisin-incorporated sodium caseinate films. **Food Control**, Guildford, v.21, p.1227–1233, 2010.

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

CARVALHO, A. A. et al. *In vivo* antitumoural activity and composition of an oil extract of Brazilian propolis. **Food Chemistry**, London, v.126, p.1239–1245, 2011.

CHAILLOU, L. L.; NAZARENO, M. A. Bioactivity of propolis from Santiago del Estero, Argentina, related to their chemical composition. **Food Science and Technology**, London, v.42 p.1422–1427, 2009.

CHEN, CHENG-PEI; WANG, BE-JEN; WENG, YIH-MING. Physiochemical and antimicrobial properties of edible aloe/gelatin composite films. **International Journal of Food Science and Technology**, Oxford, v.45, p.1050–1055, 2010.

CHOI, Y.M. et al. Antioxidant and antimicrobial activities of propolis from several regions of Korea. **Food Science and Technology**, London, v.39, p.756–761, 2006.

COSENTINO, S. et al. *In vitro* antimicrobial activity and chemical composition of Sardinian Thymus essential oils. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v.29, p.130-135, 1999.

CUQ, B.; GONTARD, N.; GUILBERT, S. Selected functional properties of fish myofibrillar protein-based films as affect by hydrophilic plasticizers. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v.45, n.3, pp.662-626, 1997.

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**, Easton, v.52, p.8255-8260, 2004.

DEL NOBILE, M. A. et al. Antimicrobial efficacy and release kinetics of thymol from zein films. **Journal of Food Engineering**, Essex, v.89, p.57–63, 2008.

DUTTA, P. K. et al. Perspectives for chitosan based antimicrobial films in food applications. **Food Chemistry**, London, v.114, p.1173–1182, 2009.

EMIROĞLU, Z. K. et al. Antimicrobial activity of soy edible films incorporated with thyme and oregano essential oils on fresh ground beef patties. **Meat Science**, Barking, v.86, p.283-288, 2010.

ESWARANANDAM, S.; HETTIARACHCHY, N. S.; JOHNSON, M. G. Antimicrobial activity of citric, lactic, malic, or tartaric acids and nisin-incorporated soy protein film against *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* 0157:H7, and *Salmonella gaminara*. **Journal of Food Science**, Chicago, v.69, n.3, p.79-84, 2004.

FALCÃO, S. I. et al. Phenolic characterization of Northeast Portuguese propolis: usual and unusual compounds. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, Heidelberg, v.396, p.887–897, 2010.

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

GARDANA, C. et al. Analysis of the polyphenolic fraction of propolis from different sources by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Amsterdam, v.45, p.390–399, 2007.

GENNADIOS, A. et al. Mechanical and barrier properties of egg albumen films. **Journal of Food Science**, Chicago, v.61 n. 3, p.585-589, 1996.

GHISALBERTI, E.L., 1979. Propolis: a review. **Bee World**, Bucks, v.60, p.59–84, 1979.

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

GREGORIS, E.; STEVANATO, R. Correlations between polyphenolic composition and antioxidant activity of Venetian propolis. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v.48, p.76–82, 2010.

GREGORY, A. G. et al. Effect of vapors from fractionated samples of propolis on microbial and oxidation damage of rice during storage. **Journal of Food Engineering**, Essex, v.88, p.341-352, 2008.

HAN, S. K.; PARK, H. K. Accumulation of thiobarbituric acid-reactive substances in cured pork sausages treated with propolis extracts. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v.82, p.1487-1489, 2002.

HAVSTEEN, B. H. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. **Pharmacology and Therapeutics**, Oxford, v.96, n.2-3, p.67-202, 2002.

JAGANNATH, J. H. et al. Antimicrobial, mechanical, barrier, and thermal properties of starch-casein based, *neem* (*melia azadirachta*) extract containing film. **Journal of Applied Polymer Science**, New York, v.101, p.3948-3954, 2006.

JAVANMARD, M. Effect of whey protein edible film packaging on the quality and moisture uptake of dried peanuts. **Journal of Food Process Engineering**, Westport, v.31, p.503-516, 2008.

JULIANO, C., DEMURTAS, C., PIU, L. *In vitro* study on the anticandidal activity of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) essential oil combined with chitosan. **Flavour and Fragrance Journal**, Chichester, v.23, p.227–231, 2008.

KALOGEROPOULOS, N. et al. Chemical composition, antioxidant activity and antimicrobial properties of propolis extracts from Greece and Cyprus. **Food Chemistry**, London, v.116, p.452–461, 2009.

KECHICHIAN, V. et al. Natural antimicrobial ingredients incorporated in biodegradable films based on cassava starch. **Food Science and Technology**, London, v.43, p.1088–1094, 2010.

KORU, O.; TOKSOY, F.; ACIKEL, C. H. et al. In vitro antimicrobial activity of propolis samples from different geographical origins against certain oral pathogens. **Anaerobe**, v.13, p.140–145, 2007.

KUJUMGIEV, A. Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v.64, p.235–240, 1999.

KUMAZAWA, S. et al. Antioxidant activity of polyphenols in carob pods. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v.50, p.373–377, 2002.

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

LASKAR, R. A. et al. Antioxidant activity of Indian propolis and its chemical constituents. **Food Chemistry**, London, v.122, p.233–237, 2010.

LEE, YING-NONG et al. Isolation and purification of 3,5-diprenyl-4-hydroxycinnamic acid (artepillin C) in Brazilian propolis by supercritical fluid extractions. **Separation and Purification Technology**, v.54, p.130–138, 2007.

LI, B. et al. Preparation and performance evaluation of glucomannan–chitosan–nisin ternary antimicrobial blend film. **Carbohydrate Polymers**, Barking, v.65, p.488–494, 2006.

LU, LI-CHANG; CHEN, YUE-WEN; CHOU, CHENG-CHUN. Antibacterial activity of propolis against *Staphylococcus aureus*. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.102, p.213–220, 2005.

MAIZURA, M. et al. Antibacterial activity and mechanical properties of partially hydrolyzed sago starch–alginate edible film containing lemongrass oil. **Journal of Food Science**, Chicago, v.72, n.6, p.C324-C330, 2007.

MANTOVANI, R. P. et al. Anti-coagulase-negative *Staphylococcus* activity of ethanolic extracts of propolis from two Brazilian regions and synergism with antimicrobial drugs by the E-test method. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v.14, n.2, p.357-365, 2008.

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

MARQUELE, F. D. et al. Propolis extract release evaluation from topical formulations by chemiluminescence and HPLC. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Amsterdam, v.41, p.461-468, 2006.

MECITOGLU, Ç. et al. Incorporation of partially purified hen egg white lysozyme into zein films for antimicrobial food packaging. **Food Research International**, Barking, v.39, p.12–21, 2006.

MENEZES, H. Própolis: uma revisão dos recentes estudos de suas propriedades farmacológicas. **Revista Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.72, n.3, p.405-411, 2005.

MIGUEL, M. G. et al. Phenols and antioxidant activity of hydro-alcoholic extracts of propolis from Algarve, South of Portugal. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v.48, p.3418–3423, 2010.

MOHAMMADZADEH, S. et al. Chemical composition, oral toxicity and antimicrobial activity of Iranian própolis. **Food Chemistry**, London, v.103, p.1097–1103, 2007.

MOREIRA, L. et al. Antioxidant properties, total phenols and pollen analysis of propolis samples from Portugal. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v.46, p.3482–3485, 2008.

NAGAI, T. et al. Preparation and antioxidant properties of water extract of propolis. **Food Chemistry**, London, v.80, n.1, p.29-33, 2003.

OJAGH, S. M. et al. Development and evaluation of a novel biodegradable film made from chitosan and cinnamon essential oil with low affinity toward water. **Food Chemistry**, London, v.122, p.161–166, 2010.

ORSI, R. O. et al. Effects of propolis from Brazil and Bulgaria on *Salmonella* Serovars. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v.13, n.4, p.748-757, 2007.

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**, Easton, v.52, p.5598-5605, 2004.

PADGETT, T.; HAN, I. Y.; DAWSON, P. L. Effect of lauric acid addition on the antimicrobial efficacy and water permeability of corn zein films containing nisin. **Journal of Food Processing and Preservation**, Westport, v.24, p.423-432, 2000.

PARK, Y.K. et al. Antimicrobial activity of propolis on oral microorganismos. **Current Microbiology**, New York, v.36, p.24-28, 1998a.

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

PARK, Y. K. et al. Chemical constituents in *Baccharis dracunculifolia* as the main botanical origin of southeastern Brazilian propolis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v.52, p.1100-1103, 2004.

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

PASCHOALICK, T.M. et al. Characterization of some functional properties of edible films based on muscle proteins of Nile Tilapia. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v.17, n.4, p.419-427, 2003.

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

PAULINO, N. et al. Anti-inflammatory effects of a bioavailable compound, artemisinin C, in Brazilian propolis. **European Journal of Pharmacology**, Amsterdam, v.587, p.296-301, 2008.

PIRES, A. C. S. **Desenvolvimento e avaliação de filmes e sachê antimicrobianos na conservação de queijo mussarela fatiado**. 2006. 73f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2006.

PRANOTO, Y.; SALOKHE, V. M.; RAKSHIT, S. K. Physical and antibacterial properties of alginate-based edible film incorporated with garlic oil. **Food Research International**, Barking, v.38, p.267–272, 2005.

PRYSTUPA, D. A.; DONALD, A. M. Infrared study of gelatin conformations in the gel and sol states. **Polymer Gels and Networks**, v.4, p.87–110, 1996.

PYLA, R. et al. Enhanced antimicrobial activity of starch-based film impregnated with thermally processed tannic acid, a strong antioxidant. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.137, p.154–160, 2010.

RAO, M. S. et al. Chitosan and guar gum composite films: preparation, physical, mechanical and antimicrobial properties. **Carbohydrate Polymers**, Barking, v.82, p.1243–1247, 2010.

ROJAS-GRAÜ, M.A. et al. Effects of plant essential oils and oil compounds on mechanical, barrier and antimicrobial properties of alginate–apple puree edible films. **Journal of Food Engineering**, Essex, v.81, p.634–641, 2007.

SALATINO, A. et al. Origin and chemical variation of Brazilian propolis. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v.2, n.1, p.33–38, 2005.

SÁNCHEZ-GONZÁLEZ, L. et al. Physical and antimicrobial properties of chitosan–tea tree essential oil composite films. **Journal of Food Engineering**, Essex, v.98, p.443–452, 2010.

SANTIAGO-SILVA, P. et al. Antimicrobial efficiency of film incorporated with pediocin on preservation of sliced ham. **Food Control**, Guildford, v.20, p.85–89, 2009.

SANTOS, V. R. et al. Efficacy of Brazilian propolis gel for the management of denture stomatitis: a pilot study. **Phytotherapy Research**, London, v.22, p.1544–1547, 2008.

SCHNITZLER, P. et al. Antiviral Activity and mode of action of propolis extracts and selected compounds. **Phytotherapy Research**, London, v.24, p.S20–S28, 2010.

SEOL, K. H. et al. Antimicrobial effect of k-carrageenan-based edible film containing ovotransferrin in fresh chicken breast stored at 5°C. **Meat Science**, Barking, v.83, p.479–483, 2009.

SEYDIM, A. C.; SARIKUS, G. Antimicrobial activity of whey protein based edible films incorporated with oregano, rosemary and garlic essential oils. **Food Research International**, Barking, v.39, p.639-644, 2006.

SFORCIN, J. M. et al. Seasonal effect on Brazilian propolis antibacterial activity. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v.73, p.243-249, 2000.

SHEN, X. L. et al. Antimicrobial and physical properties of sweet potato starch films incorporated with potassium sorbate or chitosan. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v.24, p.285–290, 2010.

SILICI, S.; KUTLUCA, S. Chemical composition and antibacterial activity of propolis collected by three different races of honeybees in the same region. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v.99, p.69–73, 2005.

SILVA, J. F. M. et al. Correlation analysis between phenolic levels of Brazilian propolis extracts and their antimicrobial and antioxidant activities. **Food Chemistry**, London, v.99, p.431–435, 2006.

SIONKOWSKA, A. et al. Molecular interactions in collagen and chitosan blends. **Biomaterials**, Surrey, v.25, p.795–801, 2004.

SIVAROOBAN, T.; HETTIARACHCHY, N. S.; JOHNSON, M. G. Physical and antimicrobial properties of grape seed extract, nisin, and EDTA incorporated soy protein edible films. **Food Research International**, Barking, v.41, p.781–785, 2008.

SOBRAL, P. J. A. Influência da espessura de biofilmes feitos à base de proteínas miofibrilares sobre suas propriedades funcionais. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, 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**, Oxford, n.15, v.3-4, pp.423-432, 2001.

SOTHORNVIT, R.; KROCHTA, J. M. Plasticizer effect on mechanical properties of β -lactoglobulin films. **Journal of Food Engineering**, Essex, v.50,n.3, p.149–155, 2001.

TEIXEIRA, E. W. et al. Seasonal variation, chemical composition and antioxidant activity of Brazilian propolis samples. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v.7, n.3, p.307–315, 2010.

THARANATHAN, R. N. Biodegradable films and composite coatings: past, present and future. **Trends in Food Science & Technology**, Cambridge, v.14, p.71-78, 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**, Chicago, v.70, n.3, p.E172-E176, 2005.

VANIN, F.M. et al. Effects of plasticizers and their concentrations on thermal and functional properties of gelatin-based films. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v.70, n.3, p.172-176, 2005.

VARDAR-ÜNLÜ, G.; SILICI, S.; ÜNLÜ, M. Composition and in vitro antimicrobial activity of Populus buds and poplar-type propolis. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, Oxford, v.24, p.1011-1017, 2008.

VERMEIREN, L. et al. Developments in the active packaging of foods. **Trends in Food Science & Technology**, Cambridge, v.10, p.77-86, 1999.

VICENTINI, N. M. **Elaboração e caracterização de filmes comestíveis à base de fécula de mandioca para uso em pós-colheita**. 2003. 198f.Tese (Doutorado) - Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2003.

VIUDA-MARTOS, M. et al. Antibacterial activity of lemon (*Citrus lemon* L.), mandarin (*Citrus reticulata* L.), grapefruit (*Citrus paradisi* L.) and orange (*Citrus sinensis* L.) essential oils. **Journal of Food Safety**, Westport, v.28, p.567–576, 2008.

WILLIAMS, R. J.; SPENCER, J. P.E.; RICE-EVANS, C. Flavonoids: antioxidants or signalling molecules? **Free Radical Biology and Medicine**, New York, v.36, n.7, p.838-849, 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**, Barking, v.82, p.338–345, 2009.

ZIVANOVIC, S.; CHI, S.; DRAUGHON, A. F. Antimicrobial activity of chitosan films enriched with essential oils. **Journal of Food Science**, Chicago, v.70, M45-M51, 2005.