



EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS DA PRÓPOLIS MARROM ATUANTES COMO BARREIRA ANTIMICROBIANA EM FILMES BIOPOLIMÉRICOS DE CARRAGENANA

I.A. BENVEGNÚ^{1*}, C.R. CONTESSA¹, C.C. MORAES¹, G.S. DA ROSA¹

¹ Universidade Federal do Pampa, UNIPAMPA, Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia dos Materiais

*e-mail: isadorabenvegnu.aluno@unipampa.edu.br

RESUMO - O trabalho buscou estudar a extração da própolis marrom a fim de verificar seus compostos bioativos para posterior aplicação em filmes biopoliméricos, avaliando seu potencial para ser utilizado como embalagem para alimentos. O extrato foi obtido utilizando a técnica de extração por ultrassom fazendo uso de água e etanol 80% como solventes extratores. Os extratos foram avaliados quanto sua atividade antioxidante e compostos fenólicos totais, sendo que para o extrato aquoso os valores foram de $20,32 \pm 2,60\%$ e $15,73 \pm 3,14$ mg GAE.g⁻¹ b.s., respectivamente, e para o extrato etanólico de $93,74 \pm 0,09\%$ e $143,38 \pm 2,77$ mg GAE.g⁻¹ b.s., respectivamente. O extrato com maior conteúdo bioativo foi incorporado aos filmes formulados utilizando carragenana a partir da técnica *casting*. Para avaliação dos filmes foram realizadas as análises de espessura, sendo $0,051 \pm 0,02$ mm. As propriedades mecânicas também foram analisadas, havendo redução de 56,5% na resistência à tração para o filme obtido com extrato etanólico em relação ao filme controle, enquanto que para alongação e permeabilidade ao vapor de água a presença do extrato não interferiu nas propriedades. Ainda, os filmes contendo extrato foram capazes de formar halos de inibição frente às cepas de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.

INTRODUÇÃO

A extração é definida como uma operação físico-química onde ocorre o fenômeno de transferência de massa, a qual possui grande ênfase nos processos industriais (SCHWARTZBERG e CHAO, 1982). Conforme Dutta (2009), a operação de extração sólido-líquido é uma operação em que ocorre a separação dos componentes solúveis de um material sólido por meio de um solvente. Busca-se, na maioria das vezes, o material solúvel como produto, enquanto que o resíduo sólido é utilizado como subproduto e/ou resíduo do processo. Dutta (2009) menciona que a extração sólido-líquido envolve diferentes mecanismos físico-químicos, os quais variam dependendo da característica do sólido analisado, como o tamanho da partícula,

granulometria e porosidade. Segundo o autor, para uma maior eficiência, o material sólido geralmente é quebrado em partículas menores, para que assim ocorra um aumento na taxa de extração. Sendo assim, é de suma importância avaliar as circunstâncias empregadas, onde o tempo, solvente utilizado, temperatura e disposição da matriz sólida são fatores primordiais durante a operação, para que assim se garanta uma maior eficiência na obtenção dos compostos bioativos da matéria-prima utilizada. Tem-se que é de grande interesse da indústria a busca por melhores condições de preservação e de extração de seus compostos bioativos, bem como a busca por tecnologias que garantam a potencial aplicação em novos mercados (DEVEQUI-NUNES *et al.*, 2018).

A incorporação de extratos naturais em novos produtos tem se destacado quando se faz necessário um olhar crítico a respeito dos

produtos convencionais já conhecidos que são consumidos diariamente. Sabe-se que dentro do âmbito alimentício as embalagens plásticas desempenham a função de conter o alimento, contribuir na conservação dos mesmos e servirem como meio informativo a respeito do produto embalado (Landim *et al.*, 2016). Todavia, o uso e o descarte desordenado, acaba por influenciar negativamente nas questões ambientais. Assim, observa-se que a busca por materiais advindos de fontes renováveis ganhou força nos últimos anos. A problemática que norteia a utilização de embalagens plásticas abre espaço à busca e ao desenvolvimento de tecnologias que não agridam os ecossistemas, favorecendo dessa forma o uso de alternativas ambientalmente amigáveis. Nesse sentido, destacam-se o uso de filmes biopoliméricos, os quais se caracterizam por serem produzidos a partir de materiais biológicos (THE WORLD BANK, 2018).

Um exemplo de material biológico que pode ser empregado é a carragenana, que conforme Pereira (2010), é caracterizada como um polissacarídeo, o qual é comumente encontrado nas paredes esqueléticas de algas vermelhas. Esse material se ressalta dentro de sua aplicação devido suas propriedades espessantes, gelificantes, emulsificantes e estabilizantes. Como vantagem, os filmes biopoliméricos (que podem ser utilizados como embalagens biodegradáveis) possuem rápida degradação e baixo custo, além de possuírem a capacidade de serem acrescentados de aditivos naturais que aumentem sua funcionalidade, atuando de forma a agregar funções de interesse, seja prolongando a vida de prateleira e preservando as propriedades sensoriais e/ou agindo diretamente como barreira antimicrobiana, antifúngica ou antioxidante. Assim, o caráter ativo age de forma gradativa, onde o agente ativo é adicionado diretamente na matriz polimérica e permite a liberação lentamente do aditivo ao alimento (Adilah *et al.*, 2018; Braga e Silva, 2017; De Aquino *et al.*, 2019).

A própolis, que pode ser definida como uma mistura complexa resinosa, gomosa e balsâmica, por exemplo, pode ser empregada como aditivo devido suas inúmeras propriedades biológicas e terapêuticas (Ezazi *et al.*, 2021; Machado *et al.*, 2016). O apelo ao uso

de uma técnica ambientalmente amigável para obtenção do extrato da própolis (como a água) torna-se alvo de uma maior atenção, visto que grande parte dos estudos envolvendo solventes extratores referem-se ao uso de etanol como solvente, este que quando utilizado em grande quantidade é considerado tóxico. Além disso, segundo Pugliese e Lourencetti (2017), a produção de etanol pode gerar impactos ainda desconhecidos pela maior parte da população, tanto na produção agrícola quanto na produção industrial, podendo ocasionar poluição atmosférica e poluição dos recursos hídricos. Nesse sentido, torna-se importante o estudo de caracterização dos filmes produzidos, evidenciando a importância da busca de tecnologias que favoreçam o desenvolvimento sustentável, e que, de forma inovadora, contribuam para o avanço na incorporação de produtos naturais como substitutos aos aditivos sintéticos.

Assim sendo, frente ao exposto, o objetivo do presente trabalho foi realizar o estudo da extração dos compostos bioativos presentes na própolis marrom e verificar sua potencial aplicação em filmes biopoliméricos de carragenana, avaliando suas propriedades física, química, mecânica, de barreira, ativa e morfológica.

MATERIAIS E MÉTODOS

Preparo da matéria-prima

A própolis marrom utilizada para obtenção do extrato contendo o agente ativo foi relativa à espécie *Apis mellifera*, obtida de apiários localizados no interior do município de Bagé, Rio Grande do Sul. A matéria-prima, que foi disponibilizada pelo apicultor em sua forma seca, foi coletada, e posteriormente eliminada manualmente suas impurezas. Em seguida, de forma a reduzir sua granulometria, o que garantiu uma maior área de contato entre as partículas, ocasionando em um maior arraste de componentes no momento do contato com o solvente extrator e conseqüentemente em um melhor resultado no momento da obtenção dos compostos bioativos (ROJAS, 2015), a mesma foi moída utilizando um moinho analítico (IKA - A11BS32). A Figura 1 ilustra a matéria-prima utilizada.



Figura 1: Própolis bruta *in natura* (1) e moída (2)

Extração e caracterização dos compostos bioativos da própolis marrom

A extração dos compostos bioativos da própolis marrom foi realizada utilizando o método de extração assistida por ultrassom, utilizando um banho ultrassônico (ALTRONIC CLEAN 3IA). Para tanto, foi utilizado 2 g de amostra em 50 mL de solvente, à temperatura ambiente no tempo de 5 min. Essas condições de extração foram obtidas por meio de testes preliminares, onde variou-se o tempo, temperatura e o pH de extração, sendo escolhidas os parâmetros citados acima com base no melhor rendimento. Os solventes utilizados foram água e etanol 80%. Para eliminação de ceras e impurezas presentes no extrato após a extração, foi realizada a filtragem à vácuo do extrato com o auxílio de uma bomba (NEW PUMP) utilizando um funil de *Büchner* e *Kitassato*. O extrato final foi armazenado em recipiente fechado até posteriores análises.

Obtidos os extratos, foram realizadas as análises de compostos fenólicos totais (CFT) e atividade antioxidante (AA), em triplicatas. Para CFT foi adotada a metodologia descrita por Singleton e Rossi (1965). O método foi realizado por espectrofotometria, utilizando o reagente Folin-Ciocalteu. Para tanto, foi utilizado 0,5 mL das amostras do extrato obtido e 10 mL de água destilada, que foram acrescidos de 1 mL do reagente em um tubo de ensaio. Após 3 min foram adicionados 8 mL de solução de Na_2CO_3 (7,5% m/v), mantendo as amostras sem presença de luz por um período de 2 h em temperatura ambiente. A absorbância foi determinada no comprimento de onda de 760 nm por meio do espectrofotômetro (UV

755B – EQUILAM). Para a quantificação, foi feito uma curva de calibração, utilizando ácido gálico em concentrações de 0 a 500 mg/L e o resultado foi expresso em mg de GAE.g⁻¹.

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

Elaboração do filme biopolimérico

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

contendo solução de ácido sulfúrico, para manter a umidade relativa em 50% no interior do mesmo.

Caracterização do filme biopolimérico

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

A fim de avaliar as propriedades mecânicas dos filmes, foi determinado com o auxílio de um texturômetro (STABLE 203-MICRO SYSTEM), a resistência à tração e a porcentagem de alongação no momento de ruptura, conforme descrito na Norma ASTM D-882-09 (2009). A tensão na ruptura foi calculada pela relação entre força e área da seção transversal inicial do filme (Equação 1), enquanto que a porcentagem de alongação foi determinada por meio da Equação 2.

$$T = \frac{F_m}{A_{min}} \quad (1)$$

em que T é a tensão máxima relacionada à tração (Pa), F_m é a força máxima que antecede o momento de ruptura (N) e A_{min} é a área da seção transversal inicial do filme (m^2).

$$\% \text{ Elongação} = \frac{dr}{di} * 1000 \quad (2)$$

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

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

$$PVA = \frac{m_{ab}}{t} * \frac{L}{A\Delta P} \quad (3)$$

em que PVA é a permeabilidade ao vapor de água ($g \cdot m^{-1} \cdot Pa^{-1} \cdot s^{-1}$), m_{ab} é a massa de umidade absorvida (g), t é o tempo total do teste (segundos), L é a espessura do filme (mm), A é a área da superfície exposta do filme (m^2) e ΔP é a diferença de pressão parcial através do filme (Pa).

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

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O valor dos compostos fenólicos totais e da atividade antioxidante atingidos para os extratos obtidos por meio da extração por banho ultrassônico estão dispostos na Tabela 1.

Tabela 1: Resultados obtidos através da extração ultrassônica

EXTRATO	CFT (mg GAE.g ⁻¹ b.s.)	AA (%)
Aquoso	15,73 ± 3,14	20,32 ± 2,60
Etanólico	143,38 ± 2,77	93,74 ± 0,09

Nota: Os dados relatados são valores médios e ± desvio médio.

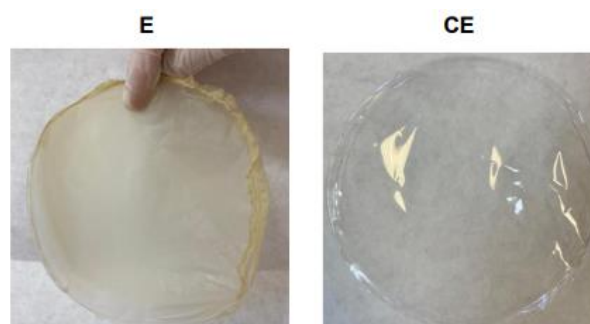
Para o extrato aquoso no que se refere aos compostos fenólicos totais, o resultado encontrado foi maior ao obtido por Alves e Kubota *et al.* (2013) que obtiveram $5,39 \pm 1,51$ mg GAE.g⁻¹ em extratos aquosos comerciais, bem como Mello *et al.* (2010) que tiveram como resultado o valor de $7,51 \pm 1,61$ mg GAE.g⁻¹ em amostras de própolis vermelha obtidas por nano filtração, ou ainda, menores aos de Mello, Petrus e Hubinger (2010) que obtiveram $23,67 \pm 2,14$ mg GAE.g⁻¹ em extratos aquosos obtidos por maceração. Por sua vez, quanto à atividade antioxidante, o valor foi inferior ao encontrado por Alves e Kubota (2013), que reportaram um valor de $89,31 \pm 0,60\%$. Essas variações podem ser justificadas devido ao método de extração e suas condições, bem como ao tipo de matéria-prima utilizada e suas particularidades.

No que se refere ao extrato etanólico, os valores encontrados durante as análises para compostos fenólicos totais foram maiores que aqueles mencionados por Khacha-ananda *et al.* (2013), que realizaram análises de extratos de própolis marrom obtidos por meio da utilização de etanol 70%, utilizando sonicador de ponteira ultrassônico, onde obtiveram $8,27 \pm 3,30$ mg GAE.g⁻¹. No que se refere à atividade antioxidante, Alves e Kubota (2013) observaram a ação antioxidante de amostras de própolis comerciais, dentre eles amostras de extrato etanólico e identificaram teores que variaram entre $80,55 \pm 0,76\%$ a $92,56 \pm 0,08\%$, valores esses similares aos reportados na Tabela 1. Segundo Gonçalves, Santos e Srebernich (2011), a origem da amostra tem um impacto direto nas concentrações dos compostos bioativos, onde a atividade antioxidante pode variar de acordo sua concentração, seu método de avaliação, como tempo de reação e solvente, e afinidade dos antioxidantes. Conforme citam Alves e Kubota (2013), a presença da ação antioxidante acentuada na própolis está diretamente ligada com o fato de possuir

flavonoides em sua composição, como a quercetina, flavonas e antocianinas, onde a quercetina atua como um bom sequestrante de radical livre, não permitindo a ação de espécies reativas de oxigênio, agindo assim de forma não oxidativa. Ainda, conforme observado por Park *et. al* (1998) através do estudo da análise de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), grandes picos de flavonoides para o extrato etanólico foram detectados, onde o aumento da concentração do solvente extrator resultou no aumento da quantidade de picos formados, estando assim intimamente relacionado, em cada caso, com sua atividade biológica. Observa-se que devido aos maiores valores alcançados por meio da extração etanólica, optou-se pela formulação dos filmes contendo esse tipo de extrato.

Por sua vez, a Figura 2 ilustra o aspecto visual dos filmes biopoliméricos elaborados, sendo “E” o filme contendo extrato etanólico de própolis e “CE” o filme controle, isento de extrato neste caso.

Figura 2: Aspectos visuais dos filmes



O filme elaborado contendo extrato etanólico de própolis (E) demonstrou possuir uma coloração amarelada opaca, característica advinda dos compostos fenólicos da própolis, enquanto que o ausente de extrato apresentou transparência. Além disso, ambos os filmes expressaram uniformidade e ausência de materiais particulados, além de serem maleáveis e flexíveis. O filme E apresentou odor característico, particularidade esta advinda dos compostos bioativos presentes na própolis. Sabe-se que no ramo alimentício, características como coloração, odor e espessura das embalagens são parâmetros que se tornam positivos ou negativos dependendo da aplicação na qual o alimento está inserido. A

Tabela 2 demonstra os resultados para a caracterização dos filmes desenvolvidos.

Tabela 2: Caracterização dos filmes

Análise	Filme E	Filme CE
Espessura (mm)	0,051 ± 0,02 ^b	0,032 ± 0,01 ^a
σ (MPa)	10,32 ± 2,84 ^b	23,02 ± 1,44 ^a
E (%)	13,05 ± 1,86 ^a	15,76 ± 1,40 ^a
PVA (g.m ⁻¹ .Pa ⁻¹ .s ⁻¹)	5,00.10 ⁻¹¹ ± 5,63.10 ^{-13a}	3,75.10 ⁻¹¹ ± 1,22.10 ^{-13a}

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

Pôde-se observar que o filme contendo extrato etanólico (E) foi o que apresentou maior espessura quando comparado ao filme controle CE, ausente de extrato. Esse comportamento sucede devido à maior massa de componentes presente na formulação do filme. Araújo (2015) desenvolveu filmes biodegradáveis de amido incorporados com extrato de própolis e obteve valores entre 0,104 e 0,110 mm de espessura, onde os filmes foram formulados com 3 g de amido para 100 g de solução filmogênica, 20 g de glicerol para 100 g de amido e variado as concentrações dos extratos de própolis utilizados. Os resultados encontrados no presente estudo foram compatíveis com Martiny *et al.* (2018), que desenvolveram filmes biodegradáveis preparados com carragenana e extrato de folhas de oliveira e obtiveram filmes controle com 0,032 mm de espessura, bem como filmes contendo extrato com 0,048 mm de espessura, confirmando a ação do extrato no que se refere ao incremento na espessura dos mesmos.

Além disso foi possível perceber uma diminuição na resistência à tração no momento de ruptura no filme na presença do extrato. Verificou-se que a adição do extrato etanólico promoveu uma redução significativa de 56,5% desse parâmetro. Bodini *et al.* (2013) também observaram o mesmo desempenho, onde houve uma redução da tensão na ruptura em filmes baseados em gelatina adicionados de extrato de própolis. Conforme Araújo (2015), uma justificativa para esse comportamento é a de que os filmes contendo extrato possuem ceras em sua composição, as quais podem ter atuado como possíveis plastificantes, aumentando

dessa forma a mobilidade da estrutura da matriz polimérica, tornando os filmes menos rígidos. De acordo com Andrade-Molina *et al.* (2013), os filmes com propriedades mecânicas ideais devem ser resistentes à ruptura para que possam proteger os produtos nos quais são aplicados, e flexíveis, para que possam se adaptar a possíveis deformações e resistirem à possíveis fraturas. Martiny *et al.* (2020) desenvolveram uma embalagem ativa composta por carragenana e extrato de folha de oliveira para conservação de carne de cordeiro e obtiveram como propriedades os valores de 11,83 ± 0,23 MPa para filmes controle, bem como 8,51 ± 0,09 MPa para filmes contendo extrato, valores esses que ainda inferiores, foram similares aos encontrados para os filmes formulados apresentados na Tabela 2. Os resultados corroboram com estudos desenvolvidos por De Araújo *et al.* (2015), onde avaliaram as propriedades físicas, antimicrobianas e antioxidantes de filmes de amidos incorporados com extrato de própolis e puderam constatar valores de tensões que variaram entre 5,1 e 6,7 MPa nos filmes elaborados.

Em relação a porcentagem de alongação no momento de ruptura, o comportamento em ambos os filmes analisados foi semelhante, conforme evidenciado pela análise estatística. O desempenho sugere que a presença do extrato não influenciou significativamente na alongação dos filmes, resultado que pode ser considerado positivo para esse caso. Alguns autores (Araújo, 2015; Braga, 2016; Martiny, 2020) já validaram a mesma informação em seus estudos envolvendo filmes biopoliméricos, onde a porcentagem de alongação não foi, ou foi alterada minimamente na presença de compostos naturais. Hanry e Surugau (2020) avaliaram os efeitos de diferentes concentrações do plastificante glicerol nas características de biofilmes feitos a partir de carragenana semi-refinada e encontraram valores entre 4,48 e 8,58% para porcentagem de alongação na ruptura, evidenciando que o aumento da concentração do plastificante utilizado torna o material mais resistente.

Analisando os resultados obtidos para permeabilidade ao vapor de água, a presença do extrato não interferiu no comportamento do filme, havendo pouca variação entre os resultados encontrados conforme os valores

obtidos através da análise estatística dos dados. Segundo McHugh *et al.* (1993), essa condição está diretamente relacionada com a espessura dos filmes, uma vez que filmes mais espessos tendem a possuir um valor de PVA mais baixo. Conforme ilustrado na Tabela 2, a espessura dos filmes teve pouca variação, corroborando consequentemente com os resultados para PVA dispostos na mesma tabela. Os valores encontrados são próximos, e ainda melhores, dos valores reportados por Roy e Rhim (2021), onde os resultados demonstraram $6,1 \cdot 10^{-10} \text{ g} \cdot \text{m}^{-1} \cdot \text{Pa}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ para filmes a base de carragenana e glicerol, e ainda, $6,8 \cdot 10^{-10} \text{ g} \cdot \text{m}^{-1} \cdot \text{Pa}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ para filmes a base de carragenana e glicerol incorporados com extrato de própolis. Martiny *et al.* (2020), utilizaram as mesmas concentrações para filmes controle a base de carragenana e glicerol e obtiveram $6,61 \cdot 10^{-11} \text{ g} \cdot \text{m}^{-1} \cdot \text{Pa}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, bem como $7,43 \cdot 10^{-11} \text{ g} \cdot \text{m}^{-1} \cdot \text{Pa}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ para os filmes contendo extrato de folhas de oliveira, valores esses que foram muito próximos aos valores listados na Tabela 2. Sabe-se que a própolis possui substâncias hidrofóbicas em sua composição, alterando a interação da água com a matriz polimérica e consequentemente reduzindo a higroscopicidade dos filmes, visto que o valor de permeabilidade foi menor, ainda que não de forma relevante, no filme contendo extrato. Dessa forma, busca-se o desenvolvimento de filmes biopoliméricos que possuam baixo valor de PVA (ou de alta barreira) para aplicações alimentícias, com o intuito de manter as propriedades biológicas dos alimentos na ausência de gases ou vapores, fator que pode ocasionar no aceleração da vida útil do produto, ou ainda, favorecer à degradação por bactérias ou fungos (ZAVAREZE *et al.*, 2012). A Tabela 3 apresenta os resultados da análise microbiológica dos filmes elaborados.

Tabela 3: Análise microbiológica (halo, mm)

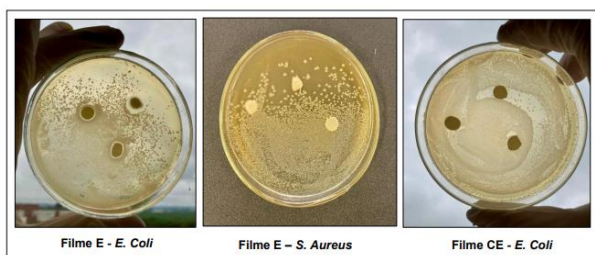
Cepa	E	CE
<i>Staphylococcus aureus</i>	$8,14 \pm 0,31^a$	0
<i>Escherichia coli</i>	$6,81 \pm 0,21^b$	$6,22 \pm 0,33^c$

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

Conforme o exposto, percebe-se que frente à cepa de *Staphylococcus aureus*, apenas

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

Figura 3: Halos de inibição dos filmes E e CE frente às cepas *S. aureus* e *E. coli*



CONCLUSÃO

Através das análises realizadas, foi possível comprovar que o extrato etanólico, apresentou maiores valores de atividade antioxidante e compostos fenólicos totais, com 93,41% e 147,45 mg GAE.g⁻¹ b.s., respectivamente. O filme formulado contendo esse extrato apresentou espessura de 0,051 mm, enquanto que a espessura do filme controle foi de 0,032 mm. As propriedades mecânicas apresentaram redução de 56,5 % no que se refere a resistência à tração em relação ao filme controle, enquanto que para alongação e permeabilidade ao vapor de água a presença do extrato não interferiu nas propriedades dos filmes. Ainda, o filme foi capaz de formar halos de inibição frente às cepas de bactérias Gram-positivas (*Staphylococcus aureus*) e Gram-negativas (*Escherichia coli*) que foram de 8,14 e 6,81 mm, respectivamente, evidenciando o caráter antimicrobiano da própolis utilizada e potencial ativo do filme. Assim, evidencia-se que os filmes podem ser utilizados tanto como embalagens a fim de proteger o alimento contido (visto suas propriedades físicas e mecânicas), como agir de forma secundária, participando ativamente como barreira antimicrobiana, por exemplo, agregando dessa forma ainda mais valor ao filme biopolimérico. De maneira geral, o filme desenvolvido incorporado com o extrato demonstrou características interessantes e importantes, tornando-os potenciais materiais para as mais diversas utilidades dentro da indústria alimentícia, atuando como possível alternativa ao uso de embalagens sintéticas.

AGRADECIMENTOS

Agradecimento à Universidade Federal do Pampa, Fapergs, Capes, CNPq, bem como ao grupo de Pesquisa Engenharia de Processos em Sistemas Particulados e ao Laboratório de Microbiologia.

REFERÊNCIAS

- ADILAH, A. JAMILAH, B. NORANIZAN, M. HANANI, Z. Utilization of mango peel extracts on the biodegradable films for active packaging. *Food Packaging and Shelf Life*, v. 16, n. May 2017, p. 1–7, 2018.
- ALVES E, KUBOTA E. Conteúdo de fenólicos, flavonoides totais e atividade antioxidante de amostras de própolis comerciais. *Rev Bras Cienc Farm* 34: 37 – 41, 2013.
- ANDRADE-MOLINA, T.P., SHIRAI, M.A., GROSSMANN, M.V.E., YAMASHITA, F. Active biodegradable packaging for fresh pasta. *LWT – Food Science and Technology*, v. 54, p. 25-29, 2013.
- ARDJOUR, N. CHIBANI, N. SHANKAR, S. FADHEL, Y. DJIDJELLI, H. LACROIX, M. Development of antimicrobial films based on poly(lactic acid) incorporated with Thymus vulgaris essential oil and ethanolic extract of Mediterranean propolis. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 185, p. 535–542, ago.2021.
- ASTM - Standard D882-09 Standard test method for tensile properties of thin plastic sheeting. In *Proceedings of the ASTM, International*, West Conshohocken, PA, USA, 1 January 2009.
- ASTM - American Society for Testing and Materials. ASTM E96/E96-16: Standard Test Methods for Water Vapor Transmission of Materials, 2016.
- BASTOS, E. GALBIATI, C. LOUREIRO, E. SCOARIS, D. Indicadores físico-químicos e atividade antibacteriana de própolis marrom frente à *Escherichia coli*. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 63, n. 5, p. 1255–1259, 2011.

- BRAGA, L. A. C. Revestimentos de carragenanas adicionadas de cera de carnaúba para conservação pós-colheita de frutas. Tese (Doutorado em fitotecnia) – Universidade Federal Rural do Semi-Árido. Mossoró, 2016.
- BRAGA, L. R.; SILVA, F. M. Embalagens ativas: uma nova abordagem para embalagens alimentícias. *Brazilian Journal of Food Research*, v. 8, n. 4, p. 170, 2017. v. 50, n. 9, p. 2080–2087, 2015.
- BRAND-WILLIAMS, W., CUVELIER, M. E., BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Science and Technology*, Amsterdam, v. 28, p. 25–30, 1995.
- BODINI, R. SOBRAL, P. FAVARO-TRINDADE, C. CARVALHO, R. Properties of gelatin-based films with added ethanol-propolis extract. *LWT - Food Science and Technology*, v. 51, n. 1, p. 104–110, abr. 2013.
- DE AQUINO, E.S. DA SILVA, L.C. NASCIMENTO, N.S. SIQUEIRA, N.L. Produção de papel biodegradável utilizando folhas de bananeira. p. 402-411. *Anais do VIII Simpósio de Engenharia de Produção*. São Paulo, Blucher, 2020.
- DE ARAÚJO, G. K. P. DE SOUZA, S.J. DA SILVA, M.V. YAMASHITA, F. GONÇALVES, LEIMAN, F.V. SHIRAI, M.A. Physical, antimicrobial and antioxidant properties of starch-based film containing ethanolic propolis extract. *International Journal of Food Science and Technology*, v. 50, n. 9, p. 2080–2087, 2015.
- DE LIMA, D. R. F. DE SOUSA, L.B. MARCIANO, P.M.S.C. JOFRE, J.B.F. JUNIOR, M.B. SIMIONI, A.R. Potencialidades Da Própolis Verde E Sua Fonte Botânica Baccharis Evaluation of Properties and Potentials of Propolis Green and Its Botanical Source. p. 93–110, 2019.
- DEVEQUI-NUNES, D. MACHADO, B.A.S. BARRETO, G.A. SILVA, J.R. DA SILVA, D.F. DA ROCHA, J.L.C. BRANDÃO, H.N. BORGES, V.M. UMSZA-GUEZ, M.A. Chemical characterization and biological activity of six different extracts of propolis through conventional methods and supercritical extraction. *PLoS ONE*, v. 13, n. 12, p. 1–21, 2018.
- DUTTA, B.K. Principles of Mass Transfer and Separation Process. Universiti Teknologi Petronas, New Delhi, 2009.
- EZAZI, A. AFSHIN, J. JAFARIZADEH-MALMIRI, H. Development of a chitosan-propolis extract edible coating formulation based on physico-chemical attributes of hens' eggs: Optimization and characteristics edible coating of egg using chitosan and propolis. *Food Bioscience*, v. 40, 1 abr. 2021.
- GIYATMI. MELANIE, S. FRANSISKA, D. DARMAWAN, M. IRIANTO, HE. Barrier and physical properties of arrowroot starch-carrageenan based biofilms. *Journal of Bio-Science*, v. 25, n. November, p. 45–56, 2018.
- GONÇALVES, G. M. S.; SANTOS, N. P.; SREBERNICH, S. M. Antioxidant and antimicrobial activities of propolis and açai (*Euterpe oleracea* Mart) extracts. *Revista de Ciências Farmaceuticas Basica e Aplicada*, v. 32, n. 3, p. 349–356, 2011.
- GONTARD, N.; DUCHEZ, C.; CUQ, J.; GUILBERT, S. Edible composite films of wheat gluten and lipids: Water vapor permeability and other physical properties. *International Journal Food Science Technology*, Oxford, v. 29, n. 1, p. 39-50, 1994.
- HANRY, E. L.; SURUGAU, N. Characteristics and Properties of Biofilms Made from Pure Carrageenan Powder and Whole Seaweed (*Kappaphycus* sp.). *Journal of Advanced Research in Fluid Mechanics and Thermal Sciences*, v. 76, n. 2, p. 99–110, 2020.
- KAZA, S. YAO, L.C.; BHADA-TATA, P. VAN WOERDEN, F. What a Waste 2.0: A Global Snapshot of Solid Waste Management to 2050. *Urban Development Series*. Washington, DC: World Bank, 2018.

- KHACHA-ANANDA, S.; TRAGOOLPUA, K.; CHANTAWANNAKUL, P. Antioxidant and Anti-cancer Cell Proliferation Activity of Propolis Extracts from Two Extraction Methods. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, v. 14, n. November 2013, p. 6991–6995, 2016.
- LANDIM, A. P. M. BERNARDO, C.O. MARTINS, I.B.A. FRANCISCO, M.R. SANTOS, M.B. DE MELO, N.R. Sustentabilidade quanto às embalagens de alimentos no Brasil. *Polimeros*, v. 26, p. 82–92, 2016.
- MACHADO, B. A. S. SILVA, R.P.D. BARRETO, G.A. COSTA, S.S. DA SILVA, D.F. BRANDÃO, H.N. DA ROCHA, J.L.C. DELLAGOSTIN, O.A. HENRIQUES, A.P. UMSZA-GUEZ, M.A. PADILHA, F.F. Chemical composition and biological activity of extracts obtained by supercritical extraction and ethanolic extraction of brown, green and red propolis derived from different geographic regions in Brazil. *PLoS ONE*, v. 11, n. 1, p. 1–26, 2016.
- MARTINY, T. R. RAGHAVAN, V. DE MORARES, C.C. DA ROSA, G.S. DOTTO, G.L. Bio-Based Active Packaging: Carrageenan Film with Olive Leaf Extract for Lamb Meat Preservation. *Foods*, v. 9, n. 12, p. 1759, 2020.
- MARTINY, T. R.; MORAES, C. C.; ROSA, G. S. Desenvolvimento de filme biodegradável incorporado com extrato foliar de *Olea europaea* L. para aplicação como embalagem ativa. p. 4683–4686, 2018.
- MCHUGH, T.H.; AVENABUSTILLOS, R.; KROCHTA, J.M. Hydrophilic Edible Films—Modified Procedure for Water-Vapor Permeability and Explanation of Thickness Effects. *J Food Sci* 1993, 58, 899–903.
- Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically. Norma M7-A. Approved Standard - Sixth Edition, 2003.
- PARK, Y.K. DAUGSCH, A. MORAES, C.S. FORT, P. Estudo da preparação dos extratos própolis e suas aplicações. *Ciência Tecnologia Alimentos*, v.18, p.313-318, 1998.
- PEREIRA, L. Extração, Caracterização e Utilização das Carragenanas. Universidade de Coimbra. Coimbra, Portugal, 2010.
- POBIEGA, K. KRASNIEWSKA, K. DEREWIAKA, D. GNIEWOSZ, M. Comparison of the antimicrobial activity of propolis extracts obtained by means of various extraction methods. *Journal of Food Science and Technology*, v. 56, n. 12, p. 5386–5395, 2019.
- SCHWARTZBERG, H.G.; CHAO, R.Y. Solute Diffusivities in Leaching Processes. *Food Technology*, Vol. 36, No. 2, 1982, pp. 73-86.
- SINGLETON, V. L., ROSSI, J. A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, California, v. 16, p. 144–158, 1965.
- RIBEIRO, P. B. ALVES, R.C. RICARDO, L.P. MORAIS, M.M. DA ROSA, G.S. Estudo fluidodinâmico e avaliação da secagem do resíduo de jambolão em leite de jorro. XXXVII ENEMP. Universidade Federal de São Carlos, 2015.
- ROJAS, D. F. Encapsulação de compostos bioativos de *Syzygium aromaticum* em carreadores lipídicos sólidos. p. 138, 2015.
- ROY, S.; RHIM, J. W. Gelatin/agar-based functional film integrated with Pickering emulsion of clove essential oil stabilized with nanocellulose for active packaging applications. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, v. 627, n. July, p. 127220, 2021.
- SIRIPATRAWAN, U., VITCHAYAKITTI, W. & SANGUANDEEKUL, R. (2013). Antioxidant and antimicrobial properties of Thai propolis extracted using ethanol aqueous solution. *International Journal of Food Science and Technology*, 48, 22–27.

- THERKELSEN, G.H. (1993). Cangeenan. In: Whistler RL, BeMiller JN (eds). Industrial gums polysaccharide derivatives. Academic Press, San Diego, pp 145–180.
- ZAVAREZE, E. D. R. Development of oxidised and heat–moisture treated potato starch film. Food Chemistry, v. 132, n. 1, p. 344–350, 2012.