

INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA
GOIANO – *CAMPUS* RIO VERDE
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA, PÓS-GRADUAÇÃO E INOVAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM TECNOLOGIA DE
ALIMENTOS

**BIOFILMES À BASE DE AMIDO INCORPORADOS COM
EXTRATO ETANÓLICO DE PRÓPOLIS**

Autora: Giana Ferreira da Cunha
Orientadora: Dra. Geovana Rocha Plácido
Coorientador: Dr. Celso Martins Belisário

Rio Verde – Goiás
Agosto – 2017

INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA
GOIANO – *CAMPUS* RIO VERDE
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA, PÓS-GRADUAÇÃO E INOVAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM TECNOLOGIA DE
ALIMENTOS

BIOFILMES À BASE DE AMIDO INCORPORADOS COM EXTRATO ETANÓLICO DE PRÓPOLIS

Autora: Giana Ferreira da Cunha
Orientadora: Dra. Geovana Rocha Plácido
Coorientador: Dr. Celso Martins Belisário

Dissertação apresentada, como parte das exigências para obtenção do título de MESTRE EM TECNOLOGIA E ALIMENTOS, no Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano – *Campus* Rio Verde – Área de concentração Tecnologia e Processamento de Alimentos.

Rio Verde – Goiás
Agosto – 2017

CC972b CUNHA, GIANA FERREIRA DA
BIOFILMES À BASE DE AMIDO INCORPORADOS COM EXTRATO
ETANÓLICO DE PRÓPOLIS / GIANA FERREIRA DA
CUNHA;orientadora Geovana Rocha Plácido; co-
orientador Celso Martins Belisário
. -- Rio Verde, 2017.
87 p.

Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) -
- Instituto Federal Goiano, Câmpus Rio Verde, 2017.

1. composto bioativo. 2. biopolímero. 3. perfil
químico. 4. antioxidante. 5. embalagens de alimentos.
I. Rocha Plácido, Geovana , orient. II. Martins
Belisário , Celso, co-
orient. III. Título.

**INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA
GOIANO – CAMPUS RIO VERDE
DIRETORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM TECNOLOGIA DE ALIMENTOS**

**BIOFILMES À BASE DE AMIDO INCORPORADOS COM
EXTRATO ETANÓLICO DE PRÓPOLIS**

Autora: Giana Ferreira da Cunha
Orientadora: Geovana Rocha Plácido

TITULAÇÃO: Mestre em Tecnologia de Alimentos – Área de Concentração
em Tecnologia e Processamento de Alimentos.

APROVADA em 23 de agosto de 2017.



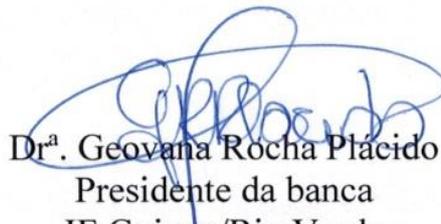
Dr.^a. Clarice Aparecida Megguer
Avaliadora externa
IF Goiano/Morrinhos



Dr. Marco Antônio Pereira da Silva
Avaliador interno
IF Goiano/Rio Verde



Dr. Celso Martins Belisário
Avaliador interno
IF Goiano/Rio Verde



Dr.^a. Geovana Rocha Plácido
Presidente da banca
IF Goiano/Rio Verde

“Desistir...eu já pensei seriamente nisso, mas, nunca me levei realmente a sério; é que tem mais chão nos meus olhos do que cansaço nas minhas pernas, mais esperança nos meus passos, do que tristeza nos meus ombros, mais estrada no meu coração do que medo na minha cabeça. ”

“Cora Coralina”

AGRADECIMENTOS

Primeiramente ÀQUELE que é a fonte de toda sabedoria, meu Deus, Pai, Senhor e Amigo, a Ele minha gratidão. Ao meu esposo Rüter, pelo amor, compreensão, carinho e suporte, por entender as noites maldormidas e todo o estresse e cansaço ao longo desse período. Aos meus pais, João e Ivete, pelo amor incondicional a mim dedicado, por não passarem um só dia sequer sem interceder junto ao Pai por minha vida e por aqueles que amo, pelo apoio financeiro, emocional e espiritual à minha formação acadêmica.

Aos meus irmãos, por fazerem parte daquilo que me tornei e em especial *in memoriam* de minha irmã Marlene, pelo que foi, e o que representa me inspirou a prosseguir quando pensei em desistir.

Com ternura, agradeço aos meus sogros pelo carinho que me receberam na cidade de Rio Verde, às “vovinhas” Cidália e Ilda, pelo carinho, hospedagens e comidinhas, quando ainda morando em Belo Horizonte, vinha aos finais de semana para as aulas do curso.

A minha professora orientadora Geovana, pela confiança em mim depositada e pelo caminho apontado. Ao professor Celso, pela coorientação atenciosa.

Aos meus colegas de pesquisa, em especial Jackeline Cintra, a quem devo muita gratidão. A empresa Eleve Pesquisa e Desenvolvimento, pelo apoio e parceria financeira.

A banca examinadora por receber de bom grado o convite para contribuir com a finalização deste trabalho. Ao apoio do Instituto Federal Goiano – *Campus* Rio Verde, e ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos.

BIOGRAFIA

Giana Ferreira da Cunha, filha de João Ferreira da Cunha e Ivete Pereira da Cunha, nascida em Governador Valadares, Minas Gerais, no dia 23 de maio de 1985. Graduada pela Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais em janeiro de 2009. Mudou-se para Belo Horizonte, Minas Gerais, onde trabalhou como Técnica da Garantia da Qualidade e Analista Sênior da Garantia da Qualidade na empresa Brasil Foods S.A de 2010 a 2014. Em 2017, concluiu o mestrado no Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos, no Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano- *Campus* Rio Verde, na área de Pós-Colheita e Processamento de Grãos e Vegetal.

ÍNDICE

	Página
1. INTRODUÇÃO.....	5
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	7
2.1. Amido.....	7
2.1.1 Amido de mandioca.....	9
2.1.2 Películas biodegradáveis à base de amido.....	10
2.2. Própolis	12
2.2.1 Atividade biológica	14
2.2.2 Principais compostos químicos da própolis	16
2.2.3 Incorporação de EEP a filmes biodegradáveis	18
REFERÊNCIAS.....	21
3. OBJETIVOS.....	32
3.1. Geral.....	32
3.2. Específicos	32
4. CAPÍTULO I.....	33

RESUMO	33
ABSTRACT	34
4.1. INTRODUÇÃO	34
4.2. MATERIAL E MÉTODOS	36
4.2.1. Preparo do extrato etanólico de própolis.....	36
4.2.2. Atividade antimicrobiana	36
4.2.2.1. Concentração inibitória mínima.....	37
4.2.2.2. Concentração bactericida mínima	37
4.2.3. Perfil de compostos fenólicos por cromatografia líquida de alta eficiência	37
4.2.4. Teor de compostos fenólicos totais	38
4.2.5. Teor de flavonoides.....	38
4.2.6. Atividade de eliminação de radicais ABTS	39
4.3. RESULTADO E DISCUSSÃO	40
4.3.1. Atividade antimicrobiana	40
4.3.2. Identificação e quantificação de compostos fenólicos	41
4.3.3. Teor de compostos fenólicos totais	44
4.3.4. Teor de flavonoides	45
4.3.5. Atividade antioxidante	45
4.4. CONCLUSÃO	47
4.5. REFERÊNCIAS	48
5. CAPÍTULO II.....	56
RESUMO	56
ABSTRACT	56
5.1. INTRODUÇÃO	57
5.2. MATERIAL E MÉTODOS	59
5.2.1. Preparo do extrato etanólico de própolis.....	59
5.2.2. Preparo dos filmes.....	59

5.2.3. Caracterização dos filmes	60
5.2.4. Determinação da espessura	60
5.2.5. Análise de microestrutura (MEV).....	60
5.2.6. Propriedades mecânicas	61
5.2.7. Teor de compostos fenólicos.....	61
5.2.8. Atividade de eliminação de radicais ABTS	62
5.2.9. Análise estatística.....	62
5.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	63
5.3.1. Análise de microestrutura	63
5.3.2. Espessura e propriedades mecânicas.....	64
5.3.3. Teor fenólico e atividade antioxidante	66
5.4. CONCLUSÃO	68
5.5. REFERÊNCIAS	70
6. CONCLUSÃO GERAL	74

ÍNDICE DE TABELAS

	Página
Tabela 1 - Classificação da própolis brasileira.	13
Tabela 1 - Concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) do extrato etanólico de própolis	40
Tabela 2 – Cromatografia líquida de alta eficiência: pico de atribuição, tempo de retenção e área de quantificação dos principais compostos do EEP	42
Tabela 1 – Concentração de EEP (C_{CEE}), espessura, resistência à tração (RT), alongamento até a ruptura (AR) e módulo de yong (MY).....	65
Tabela 2 – Concentração de EEP (C_{CEE}), teor fenólico total e atividade antioxidante (ABTS) dos filmes	67

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1 – Estrutura química da amilose e da amilopectina.	8
Figura 2 - Estrutura química do éster fenetil do ácido cafeico (CAPE)	17
Figura 3 - Estrutura química do artepelin C, o ácido 3,5-diprenil-4-hixidrocínâmico (DHCA)	18
Figura 1 – Cromatograma de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) do extrato etanólico de própolis	42
Figura 1: Filmes de amido incorporados com 0, 30 e 60g de extrato etanólico de própolis 100g ⁻¹ de amido (a) C EEP = 0 100g ⁻¹ g de amido; (B) C EEP = 30 g 100g ⁻¹ de amido; (C) C EEP = 60 g 100g ⁻¹ de amido.	60
Figura 2 – Micrografias de superfície de filmes de amido incorporados com 0, 30 e 60g de EEP 100 g ⁻¹ de amido (a) C EPE = 0 g 100 g ⁻¹ de amido; Imagem de superfície; (B) C EPE = 30 g 100 g ⁻¹ de amido; Imagem de superfície; (C) C EPE = 60 g 100 g ⁻¹ de amido; Imagem de superfície.....	64

LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS, ABREVIACÕES E UNIDADES

%	Porcentagem
mL	Mililitro
g	Gramma
mg	Miligramma
EEP	Extrato Etanólico de Própolis
kg	Quilogramma
$\mu\text{g mL}^{-1}$	Microgrammas /mL
μL	Microlitro
$^{\circ}\text{C}$	Graus Celsius
UFC	Unidade formadora de colônia
CIM	Concentração Inibitória mínima
CBM	Concentração bactericida mínima
CCDAE	Cromatografia em camada delgada de alta eficiência
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência

mm	Milímetro
µm	Micrômetro
GAE	Equivalente de ácido gálico
p / v	Peso por volume
nm	Nanômetro
ABTS ·+	2,2-azinobis - (3-etilbenzotiazolin-6-ácido sulfônico),
mM	Milimolar
CAPE	Ester fenil do ácido cafeico
µmol	Milimol
TE mL ⁻¹	Capacidade antioxidante equivalente de Trolox /mililitros
Trolox	ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcorman-2-carboxílico
cm ²	Centímetros quadrados
MEV	Microestrutura Eletrônica de Varredura
N	Newton
mm s ⁻¹	Milímetro por segundo
MPA	Megapascal

RESUMO

CUNHA, GIANA. FERREIRA. Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano – *Campus* Rio Verde – GO, agosto de 2017. **Biofilmes à base de amido incorporados com extrato etanólico de própolis**. Orientadora: Dra. Geovana Rocha Plácido. Coorientador: Dr. Celso Martins Belisário.

Levando-se em consideração as tendências atuais de desenvolvimento de filmes biodegradáveis e materiais que interajam com as embalagens dos alimentos através da incorporação de substâncias ativas no interior do material de embalagem. A possibilidade da utilização da própolis como composto bioativo natural, foi estudada a fim de se propor uma tecnologia de desenvolvimento de embalagem bioativa, elaborada com amido de mandioca, com efeito antioxidante para alimentos. Filmes de amido de mandioca foram produzidos e incorporados com extrato etanólico de própolis (EEP) nas concentrações de 0, 30 e 60g 100g⁻¹ de amido. Foi avaliado o perfil químico, a atividade antioxidante e antimicrobiana do EEP. Foi avaliado o efeito da incorporação do EEP, nas propriedades mecânicas do filme, bem como a microestrutura, a concentração de compostos fenólicos e atividade antioxidante na matriz do

biopolímero. O EEP apresentou atividade antioxidante e antimicrobiana bactericida e bacteriostática contra *S. aureus* (Gram-positivo) e *E. coli* (Gram-negativo) sendo que o microrganismo Gram-positivo foi mais susceptível ao EEP. E a análise do perfil químico indicou a presença artepelin C (cerca de 10,957 mg mL⁻¹ EEP) em grande quantidade. A incorporação do EEP às películas melhorou a flexibilidade e extensibilidade, tornou-as mais homogêneas e menos ásperas. Também revelaram que a matriz polimérica continha compostos fenólicos e atividade antioxidante. Os ensaios realizados nas películas revelaram o potencial para serem utilizadas como embalagens de alimentos ativos contribuindo para diminuir a quantidade de antioxidantes sintéticos utilizados para a conservação de alimentos.

PALAVRAS-CHAVES: composto bioativo, biopolímero, perfil químico, antioxidante, embalagens de alimentos.

ABSTRACT

CUNHA, GIANA. FERREIRA. Instituto Federal de Educação, Ciência, e Tecnologia Goiano (Goiano Federal Institute of Science, Education, and Technology) – Rio Verde *Campus* – Goiás State (GO), Brazil, august 2017. **Starch-Based Biofilms Incorporated with Propolis Ethanol Extract**. Advisor: Dr. Plácido, Geovana Rocha. Co-advisor: Dr. Belisário, Celso Martins.

Considering the current trends in the development of biodegradable films and materials that interact with food packaging through the incorporation of active substances within the packaging material it was evaluated the possibility of using propolis as a natural bioactive compound in order to propose a bioactive packaging development technology, elaborated with cassava starch, that has antioxidant effect for food. Cassava starch films were produced and incorporated with ethanolic propolis extract (EEP) at the concentrations of 0, 30 and 60g 100g⁻¹ of starch. The chemical profile, antioxidant and antimicrobial activity of the EEP were evaluated. The effect of the incorporation of EEP on the mechanical properties of the film, as well as the microstructure, the concentration of phenolic compounds and antioxidant activity in the biopolymer matrix

were evaluated. The bacterial and bacteriostatic antimicrobial and bacteriostatic activity against *S. aureus* (Gram-positive) and *E. coli* (Gram-negative) showed that the Gram-positive microorganism was more susceptible to EEP. The analysis of the chemical profile revealed the presence of artepelin C (about 10.957 mg mL⁻¹ EEP) in great quantity. The incorporation of EEP to films improved flexibility and extensibility, made them more homogeneous and less harsh. They also revealed that the polymer matrix had phenolic compounds and antioxidant activity. The tests carried out on the films revealed the potential to be used as active food packaging, helping to reduce the amount of synthetic antioxidants used for food preservation.

KEY WORDS: bioactive compound, biopolymer, chemical profile, antioxidant, food packaging.

1. INTRODUÇÃO

O desenvolvimento de embalagens que entrem em contato direto com os alimentos, elaboradas a partir de biopolímeros no lugar de materiais sintéticos convencionais, é uma nova tendência que surge em resposta à demanda dos consumidores para o uso de produtos naturais que causem pouco impacto ambiental (DELGADO et al., 2016).

As tendências atuais também incluem a elaboração de materiais que possam interagir com a embalagem dos alimentos e uma alternativa que está sendo estudada, é a incorporação de substâncias ativas no interior do material de embalagem, como em películas biodegradáveis (KECHICHIAN et al., 2010).

Esses filmes poderiam então, servir como suporte para aditivos antimicrobianos e antioxidantes e permitir que tais compostos ativos sejam lançados na superfície do alimento promovendo a melhoria da segurança alimentar e aumento da vida de prateleira de produtos prontos para o consumo (BODINI et al., 2013).

Matérias-primas como polissacarídeos, proteínas e lipídios utilizadas no desenvolvimento de embalagens de base biológica possuem características como biodegradabilidade, comestibilidade, biocompatibilidade e propriedades ambientalmente amigáveis, e podem ser vista com vantagens sobre os materiais sintéticos (PETERSON, et al.,1999).

O amido é uma matriz polimérica comumente utilizada para embalagens por causa da disponibilidade, baixo custo e facilidade de se manusear. O amido é ainda mais barato que o polietileno e é uma fonte renovável. É também um biopolímero

totalmente biodegradável no solo e na água, o que é uma grande vantagem do ponto de vista ambiental (RODRÍGUEZ et al., 2006; JIMÉNEZ et al., 2012;)

Existem vários ingredientes naturais, que podem ser adicionados a biopolímeros, que apresentam propriedades antioxidantes ou antimicrobianas. Tais como os óleos essenciais (HAFSA et al., 2016), extrato de laranja (STINCO et al.; 2013).

A própolis é uma resina complexa formada por flavonoides, ácidos fenólicos e seus ésteres, ceras, óleos essenciais, pólen e vários compostos orgânicos. Possui atividade antioxidante e antibacteriana (KUMAZAWA et al., 2004).

O desenvolvimento de embalagens biodegradáveis contendo compostos ativos que possam atuar como antioxidante e antimicrobiano natural é uma estratégia interessante que deve ser considerada pela indústria de alimentos.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Amido

O amido é polímero semicristalino armazenado em grânulos como fonte de reserva da maioria das plantas (AVELLA et al., 2005). É a maior fonte de nutrição humana e de animais e importante matéria-prima para a indústria (HUANG et al., 2015).

O amido é composto de duas frações principais, amilose e amilopectina. Ambas são compostas por unidades de glicose, porém, por apresentarem diferenças estruturais, apresentam propriedades físico-químicas diferentes. A amilopectina é um polímero altamente ramificado formado por cadeias curtas de unidades de glicose ligadas por ligações α -1,4 e ramificações em α -1,6 com alto peso molecular (1×10^8 g mol). Por outro lado, a amilose é formada principalmente por moléculas lineares compostas por unidades de glicose ligadas através de ligações α -1,4, com peso molecular médio de 1×10^6 g mol (WANG et al., 2017). A Figura 1 mostra a estrutura química da amilose e amilopectina.

Os grânulos de amido são formados por camadas cristalinas e amorfas dispostos alternadamente. A organização estrutural de amilose e amilopectina no grânulo de amido não está completamente compreendida, mas, as cadeias laterais de amilopectina são responsáveis pela formação da estrutura das lamelas cristalinas, com pontos de ramificações localizados nos domínios amorfos em que se localizam o maior teor de

amilose (ICHIHARA et al., 2016).

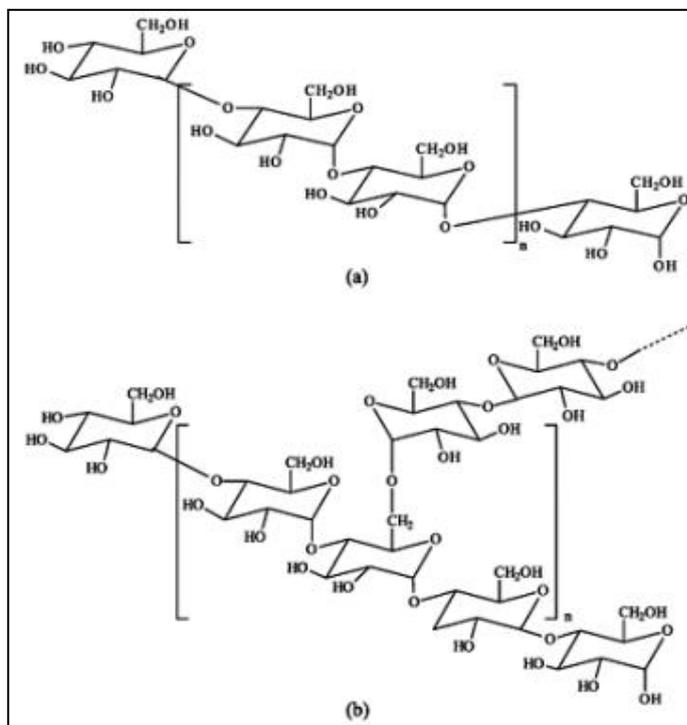


Figura 1 - Estrutura química da amilose (a) e da amilopectina (b).

Fonte: CORRADINI et al. (2005).

Os grânulos de amido absorvem água e incham quando aquecidos na presença de água. Alguns componentes do amido especialmente a amilose lixivia e se solubiliza. Com o aumento da temperatura e absorção de água, os grânulos se rompem e as cadeias são desordenadas (ZHU, 2015). Após o resfriamento, a amilose em solução sofre um processo chamado retrogradação, caso a concentração seja suficientemente elevada, esse processo resulta na formação de uma rede que transforma a solução em um gel. O gel de amido adapta-se como o modelo de preenchimento da matriz, e o material de enchimento são grânulos de amido intumescido e a matriz é formada por grânulos de amido lixiviado (ICHIHARA et al., 2016).

A gelatinização é um processo básico endotérmico no qual a estrutura semicristalina do amido nativo é convertida em estado amorfo antes de se transformar em amido termoplástico. O processo de gelatinização depende principalmente do teor

de água e da temperatura de aquecimento do amido (IBRAHIM et al., 2014).

A retrogradação é o processo no qual o sistema gelatinizado é submetido ao resfriamento com conseqüente reassociação e reorganização das cadeias através de interações moleculares e ligações de hidrogênio. O amido é o carboidrato de armazenamento mais abundante em vegetais e tem sido utilizado em indústrias de alimentos e outras aplicações industriais como produção de bioetanol e plásticos biodegradáveis (CHANDANASREE et al., 2016).

Amidos de diferentes origens botânicas possuem unidades estruturais idênticas, no entanto, seus diferentes conteúdos de amilose e amilopectina influenciam principalmente em as suas propriedades físicas e químicas (SESSINI et al., 2016). A amilose possui melhores propriedades gelificantes do que a amilopectina e suas cadeias lineares interagem através das ligações de hidrogênio em maior proporção do que as cadeias da amilopectina (WANG et al., 2017).

De uma forma geral, o amido nativo é variável na morfologia dos grânulos, teor de amilose, estrutura da amilopectina e também no arranjo das regiões cristalinas e amorfas dentro dos grânulos. Além disso, as propriedades funcionais do amido nativo como inchaço dos grânulos, gelatinização, retrogradação, plastificação e digestão enzimática estão diretamente relacionadas às suas características estruturais (LIU et al., 2017).

2.1.1 Amido de mandioca

A mandioca (*Manihot esculenta Crantz*) conhecida como tapioca, cassava, aipim e macaxeira entre outros (BUIRAGO, 1990), originou-se a partir da fronteira Sul da Bacia Amazônica no Brasil, a descoberta foi feita através de uma técnica sofisticada de sequenciamento de DNA que traçou a variação de um único gene (G3pdh), encontrado em mandioca cultivada e silvestre (OLSEN e SACHAAL, 1999).

O amido de mandioca também pode ser denominado como fécula, polvilho doce ou goma, é um carboidrato extraído de tubérculos e raízes da mandioca (ARIENTE et al., 2005). O amido de mandioca é apreciado por possui características como baixa temperatura de gelatinização, clareza da pasta e boa estabilidade do gel (MALI et al., 2006).

A fécula de mandioca pode realizar a maior parte das funções do amido de milho, arroz e trigo. E tem se tornado uma das matérias-primas mais importante de

alimentos e indústrias conexas. É utilizada em lanches extrudados, para aprimorar a expansão, como agente espessante em molhos, sopas, tortas de frutas, pudins, alimentos processados para bebês, como agente de liga em biscoitos e produtos de confeitaria (CHANDANASREE et al., 2016). Também tem sido utilizada na elaboração de películas em substituição de materiais de embalagem não degradáveis e não renováveis na indústria de alimentos, devido às suas características atrativas como inodoro, incolor, atóxico, insípido e biodegradável (PIÑEROS - HERNANDEZ et al., 2016).

2.1.2 Películas biodegradáveis à base de amido

Existe grande interesse em substituir alguns ou todos os plásticos sintéticos por materiais biodegradáveis em diversas aplicações (AVELLA et al., 2005). Nos últimos anos a pesquisa e desenvolvimento de filmes comestíveis ou biodegradáveis elaborados a partir de biopolímeros têm sido extensivamente estudados. Esses materiais de base biológica têm sido reconhecidos por melhorarem a sustentabilidade ambiental e características técnicas essenciais necessárias para execução das funções globais de embalagem de alimento (ROMPOTHI et al., 2016).

A produção e utilização de plásticos em todo o mundo têm crescido drasticamente, aumentando os impactos ambientais e agravando os problemas para eliminação de resíduos. Por esse motivo, o uso de biopolímeros em substituição aos polímeros sintéticos não degradáveis, está se tornando alternativa sustentável e muito interessante para aplicação em embalagens de alimentos (DICASTILLO et al., 2016).

O amido tem sido amplamente utilizado em embalagens de alimentos, pelo baixo custo e boas propriedades de formação de película (LIU et al., 2017). É um polímero natural de carboidrato versátil e o segundo tipo mais abundante de biomassa depois da celulose. É barato e possui propriedades físico-químicas como biocompatibilidade, biodegradabilidade e atoxidade (ULU et al., 2016).

A formação de películas, propriedades mecânicas e de barreira, bem como as condições de processamento, são dependentes da relação entre amilose e amilopectina, em geral uma quantidade elevada de amilose melhora essas propriedades (MENDES et al., 2016). Lâminas e filmes de amido com alto teor de amilose normalmente apresentam excelentes propriedades mecânicas (WANG et al., 2017).

Um dos fatores mais relevantes a ser avaliado na elaboração de filmes para utilização em embalagens é a biodegradabilidade. O amido pode ser rapidamente

atacado por microrganismos quando é enterrado no solo e facilmente metabolizado por uma gama de microrganismos resultando em produtos finais da fermentação tais como etanol e metano (SELIGRA et al., 2016).

Recentemente foi demonstrado que produtos à base de amido possuem o tempo de degradação mais curto quando comparados com outros materiais poliméricos tais como ácido polilático ou poli (succinato de butileno -co- adipado de butileno). Uma grande vantagem da rápida degradação do material no aterro é que o volume de resíduos a ser compactado também é reduzido. A diminuição no tempo de degradação, mesmo de alguns dias significa a redução do volume de lixo e se torna, importante vantagem em relação a aspectos ambientais (MEDINA-JARAMILLO et al., 2016).

No entanto, amidos termoplásticos são altamente quebradiços e a natureza hidrofílica o torna susceptível à umidade, alterações na estabilidade dimensional e propriedades mecânicas. Dependendo das condições de armazenamento, a retrogradação das cadeias de amido pode ocorrer causando alterações indesejadas no desempenho termomecânico do material final à base de amido. Para se obter a flexibilidade necessária para aplicações em películas, a fragilidade dos amidos pode ser eliminada pela adição de plastificantes (SESSINI et al., 2016).

A adição de plastificantes como o glicerol e sorbitol, intensifica a flexibilidade do filme, pela capacidade de reduzir as ligações de hidrogênio internas entre as cadeias de polímeros enquanto aumentam o volume molecular, além prevenirem rachaduras durante o manuseio e armazenamento e afetar a permeabilidade a solutos, gases, vapor de água e características de sorção (MALI et al., 2006).

Raízes e tubérculos de várias fontes botânicas têm sido estudados devido ao alto teor de amido e suas promissoras propriedades de formação de películas (GUTIÉRREZ et al., 2015).

A fécula ou amido de mandioca, extraído de raízes e tubérculos, por seu baixo custo, ampla disponibilidade e biodegradabilidade tem sido estudado não somente pelas propriedades de formação de película, mas também como suporte para incorporação de agentes antimicrobianos e antioxidantes para elaboração de películas e filmes biodegradáveis para utilização em embalagens de alimentos com funções ativas (KECHICHIAN et al., 2010; SOUZA et al., 2013; PIÑEROS-HERNANDES et al., 2017). A incorporação de substâncias ativas que possam interagir com as embalagens de alimentos é uma nova tendência que está a sendo extensivamente estudada.

2.2. Própolis

As abelhas utilizam a própolis para selar as paredes da colmeia, fortalecer as bordas dos favos e embalsamar invasores mortos. A própolis é um material utilizado para construção das paredes da colmeia e favos é também uma "arma química" contra microrganismos e agentes patogênicos de composição química complexa e essa por sua vez varia muito em função de sua origem botânica e geográfica (BANKOVA, 2005).

As diferentes espécies de plantas utilizadas como matéria-prima para elaboração da própolis pelas abelhas podem gerar variações na composição, mas basicamente a própolis é formada por 50% de resina, 30% de cera, 5% de pólen, 10% de óleos aromáticos e 5% de outros resíduos orgânicos (SHIMIZU et al., 2004).

Na zona temperada do Hemisfério Norte, as abelhas coletam própolis apenas no verão, final da primavera e início do outono. No Brasil, a coleta de própolis ocorre ao longo de todo o ano e por esse motivo variações sazonais são esperadas. Embora a própolis possa ser coletada durante as estações com concentrações mais altas de compostos biologicamente ativos as variações sazonais na composição da própolis não são significativas e são predominantemente quantitativas, qualitativamente são idênticas. Esse fato indica que as abelhas coletam própolis do mesmo grupo vegetal, com uma fonte vegetal predominante (SFORCIN, 2007).

Sforcin e Bankova (2011) relataram a existência de diferentes tipos de própolis, o tipo Álamo (*Populus spp*) originário da Europa, América do Norte, regiões não tropicais da Ásia, Nova Zelândia, cujos principais compostos são Flavonas, flavononas, ácidos cinâmicos e seus ésteres; Tipo Videiro (*Betula verrucosa*) originário da Rússia é formado principalmente por Flavonas e flavonoides diferentes do tipo Álamo; Tipo verde (*Baccharis spp*) encontrado no Brasil, formado principalmente por prenilados do ácido p-cumárico e ácidos diterpênicos; Tipo vermelho (*Dalbergia spp*) encontrado no Brasil, México e Cuba, tendo como principais compostos isoflavonoides; Tipo Clusia (*Clusia spp*) de Cuba e Venezuela composto por benzofenonas preniladas; Tipo Pacífico (*Macaranga tanarius*) encontrado na região do Pacífico (Okinawa, Taiwan, Indonésia) composto principalmente por prenilflavononas; Tipo Mediterrâneo, da família Cupressaceae (espécie não identificada), encontrado recentemente na Grécia, Sicília e Malta formada principalmente por diterpenos.

A própolis brasileira tinha sido caracterizada e classificada em 12 grupos baseados em características físico-químicas: cinco grupos no Sul do Brasil, um grupo Sudeste do Brasil e seis grupos no Nordeste brasileiro como descrito na Tabela 1. Até que amostras de própolis vermelha, produzidas por abelhas *Apis mellifera* foram coletadas no Nordeste do Brasil e classificada como um novo tipo de própolis considerada fonte promissora de compostos bioativos (ALENCAR et al., 2007).

Tabela 1 - Classificação da própolis brasileira

Fonte: PARK et al., 2000

EXTRATO ETANÓLICO DE PRÓPOLIS BRASILEIRA		
Grupos	Cor	Local de Origem
Grupo 1	Amarelo	Região Sul (RS)
Grupo 2	Castanho Claro	Região Sul (RS)
Grupo 3	Castanho Escuro	Região Sul (PR)
Grupo 4	Castanho Claro	Região Sul (PR)
Grupo 5	Marrom esverdeado	Região Sul (PR)
Grupo 6	Marrom avermelhado	Região Nordeste (BA)
Grupo 7	Marrom esverdeado	Região Nordeste (BA)
Grupo 8	Castanho Escuro	Região Nordeste (PE)
Grupo 9	Amarelo	Região Nordeste (PE)
Grupo 10	Amarelo Escuro	Região Nordeste (CE)
Grupo 11	Amarelo	Região Nordeste (PI)
Grupo 12	Verde ou Marrom esverdeado	Região Sudeste (SP)

A origem botânica das plantas de três desses grupos (grupo 3 do Sul do Brasil, grupo 6 no Nordeste e grupo 12 do Sudeste) foram investigadas através da cromatografia de camada delgada de alto desempenho de fase reversa, cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa e Cromatografia gasosa acoplado à espectrometria de massa. Com base no perfil químico, concluiu-se que as própolis do grupo 3, grupo 6 e grupo 12 foram produzidas a partir de *resinas Populus nigra* (álamo), *Hyptis divaricata* e *Baccharis dracunculifolia*, (alecrim-do-campo),

respectivamente (PARK et al., 2002).

A própolis possui uma natureza pegajosa e, portanto, não pode ser utilizada em sua forma bruta por isso, muitas vezes é purificada por extração com solventes que são destinados a preservar os compostos fenólicos, pois o método de extração, também pode afetar a atividade biológica (ALENCAR et al., 2013).

A própolis não é tóxica, e sua concentração segura para seres humanos pode ser de 1,4 mg kg⁻¹ corporal por dia, ou aproximadamente 70 mg dia⁻¹ (BURDOCK, 1998).

A própolis brasileira, produzida pelas abelhas (*Apis mellifera*) a partir de plantas diferentes tem instigado o interesse de pesquisadores nos últimos anos pela variedade de compostos químicos interessantes que podem variar de acordo com a flora local utilizada (RODRIGUES et al., 2016).

Do ano de 2010 para 2012, o preço de um quilo de própolis bruta brasileira, se elevou em mais de 50% no mercado internacional e o preço da própolis vermelha em 2016, foi cinco vezes maior que os demais tipos de própolis. Recentemente, tem sido utilizada para elaboração de cosméticos, antissépticos e cremes dentais, na indústria de alimentos e bebidas (FREIRES et al., 2016).

2.2.1 Atividade biológica da própolis

A própolis apresenta atividades antibacteriana, antifúngica, antiviral, antioxidante e antitumoral (BANKOVA, 2005).

O mecanismo de ação para o efeito antimicrobiano não está ainda claramente compreendido, alguns estudos sugerem que os constituintes da própolis interferem na divisão celular, causando a desorganização do citoplasma, inibindo a síntese de proteínas e causando a morte das células (TAKAISI-KIKUNI; SCHILCHER, 1994).

A atividade antibacteriana da própolis é bem documentada contra diferentes bactérias como *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* e *Salmonella typhimurium*, embora a própolis seja principalmente ativa contra as bactérias Gram-positivas que são inibidas com uma concentração menor de própolis do que as bactérias Gram-negativas (SFORCIN et al., 2000).

Mirzoeva et al. (1997) verificaram que a própolis possuía um poderoso efeito negativo contra *Rhodobacter sphaeroides* (gram-negativo), possivelmente refletindo a presença de porina ou lipopolissacarídeos da composição externa da membrana,

sugerindo que o efeito antimicrobiano da própolis em gram-negativos, é dependente da composição externa da membrana. Esses autores, também demonstraram que a própolis e alguns dos componentes cinâmicos e flavonoides, são capazes de desestabilizar a membrana citoplasmática, afetar a função de barreira e inibir a motilidade bacteriana.

Kujungiev et al. (1999) demonstraram que apesar das grandes diferenças na composição química, a própolis de diferentes localidades geográficas apresenta atividade antifúngica. Esses autores estudaram a atividade antifúngica de amostras de própolis (extratos de etanol e óleos voláteis) de diferentes localidades nos trópicos e na zona temperada inclusive o Brasil, contra *Candida albicans* e todas as amostras apresentaram atividade antifúngica significativa.

Durante o controle de pós-colheita de frutos citros, o extrato etanólico de própolis a 70% inibiu completamente a germinação conidial de *Penicillium digitatum* em todas as concentrações testadas e 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de extrato etanólico de própolis proporcionaram a inibição completa da doença de bolor verde em toranjas (fruta originária do Texas) feridas, mas não inoculadas artificialmente. A própolis é uma fonte de antibióticos naturais e os extratos etanólicos possuem efeitos inibitórios de amplo espectro sobre bactérias, fungos e nematoides (SOYLU et al., 2008).

As propriedades antiparasitas de extratos etanólico de própolis também foram estudadas e demonstradas por HIGASHI e CASTRO (1994) em relação ao *T. cruzi* e a interação com células hospedeiras. O extrato etanólico de própolis (EEP) foi altamente ativo contra *T. cruzi*, inibindo a proliferação do parasita tanto dentro das células hospedeiras como meio de cultura axênico. O EEP inibiu os níveis de infecção nas concentrações de 10-15 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para macrófagos, e 25 a 75 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para as células do músculo cardíaco. A lise total de tripomastigotas da corrente sanguínea foi observada após 24 horas na presença de EEP a uma concentração de 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Marcucci et al. (2001) estudaram as propriedades antiparasitas de compostos isolados da própolis brasileira, o ácido 3-prenil-4-hidroxicinâmico (PHCA), 2,2-dimetil-6-carboxietenil-2H-1-benzopirano (DCBEN), 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico (DHCA) e 2,2-dimetil-6-carboxietenil-8-prenil-2H-1-benzopirano (DPB), e todos os compostos testados foram ativos contra *T. cruzi*.

A própolis possui comprovadamente atividade antioxidante como demonstrado por CASTRO et al. (2014) e ALM-ELDEEN et al. (2017). A capacidade antioxidante está geralmente intimamente associada com o teor de compostos

fenólicos, pelos seus extensos sistemas conjugados de elétrons π que facilita a doação de elétrons das porções hidroxila para espécies de radicais oxidantes, além de exercerem efeito sinérgico entre si e com alguns compostos lipofílicos tais como as vitaminas C e E (BITTENCOURT et al., 2015).

Os antioxidantes previnem danos teciduais e impedem a perturbação e a perda da funcionalidade das enzimas e membranas biológicas, sequestrando radicais livres que de outra maneira poderiam induzir a oxidação de lipídios, proteínas e DNA (NIKI, 2011 e CASTRO et al., 2014).

A própolis apresenta várias outras propriedades biológicas e farmacológicas, tais como antiviral, imunomoduladora, anti-inflamatória, citotóxica e antitumoral (BANSKOTA et al., 2000; SFORCIN et al., 2002; GEKKER et al., 2005; HU et al., 2005; ORŠOLIĆ ; BAŠIĆ, 2005). Também possui propriedades antisséptica, adstringente, espasmolítica e anestésica, portanto, sua lista de preparações e uso é quase infinita (BURDOCK, 1998).

2.2.2 Principais compostos químicos da própolis

Geralmente, a própolis possui variedade de compostos químicos tais como compostos fenólicos (flavonoides, ácidos fenólicos e os seus ésteres), terpenos, esteroides e aminoácidos (KUMAZAWA et al., 2004).

Bankova et al. (2000) identificaram mais de 300 compostos em diferentes amostras de própolis tais como: vitaminas, aminoácidos, carboidratos, ácidos graxos, cetonas, aldeídos, ésteres, ácidos alifáticos, ácidos aromáticos, terpenoides, chalconas, dihidrochalconas e substâncias inorgânicas.

Os flavonoides (flavonas, flavonóis, flavononas), fenólicos e aromáticos são os constituintes com ação farmacológica mais importantes da própolis (UZEL et al., 2005). Os flavonoides possuem amplo espectro de propriedades biológicas tais como, ação antibacteriana, antiviral e anti-inflamatória. Em regiões tropicais o teor de flavonoides é utilizado como critério de avaliação da qualidade da própolis (HUANG et al., 2014).

No Brasil, a legislação determina que a própolis, independentemente da localização, vegetação e características, tenha no mínimo 5% (m/m) de compostos fenólicos e no mínimo 0,5% (m/m) de flavonoides (BRASIL, 2001).

Própolis de regiões temperadas, chamadas de própolis de tipo álamo são

constituídas principalmente pelos fenólicos: flavonoide aglicona, ácidos aromáticos e seus ésteres. Já a própolis de regiões tropicais contém fenólicos diferentes quando comparadas com o tipo álamo: derivados de prenilados do ácido *p*-cumárico, flavonoides, benzofenonas, lignanas e terpenos (ABU-MELLAL et al., 2012)

O éster fenetil do ácido cafeico (CAPE) é o composto fenólico de maior importância da própolis de regiões temperadas com diversas atividades biológicas (HUANG et al., 2014). Derivado do ácido cafeico, este composto foi identificado com propriedades antitumorais, quimiopreventivas, antioxidantes, antimicrobianas, imunomoduladora e anti-inflamatória (BÚFALO et al., 2013; KARTAL et al., 2014; LI et al., 2016 e)

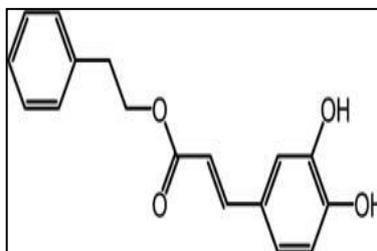


Figura 2 - Estrutura química do éster fenetil do ácido cafeico (CAPE)

Fonte: LI et al., 2016

Os principais componentes da própolis brasileira, especialmente a própolis verde, tipo mais comum são ácidos fenólicos, incluindo ácido cafeico e derivados prenilados do ácido *p*-cumárico (SFORCIN e BANKOVA, 2011). A cor verde da própolis brasileira é derivada da clorofila presente nos tecidos de folhas jovens e pouco desenvolvidas de *Baccharis dracunculifolia* (BITTENCOURT et al., 2015).

Mishima et al. (2005) investigaram através de CLAE a composição química de extratos de própolis verde brasileira da região Sudeste (tipo 12) cuja principal fonte botânica é *B. Dracunculifolia*, e encontraram como principais compostos o ácido clorogênico, ácido *p*-cumárico, ácido 4,5-di- O -cafeoilquinico, ácido 3,5-di- O -cafeoilquinico, ácido 3,4-di- O -cafeoilquinico, drupanina, artepelin C e bacarina.

Shimizu et al. (2004) relataram que a própolis brasileira continha vários fenólicos como resíduos orgânicos principalmente de ácido cinâmico e derivados de kaempferol, e continha artepelin C em grande quantidade, pelo fato das abelhas coletarem exsudados da planta brasileira *Baccharis dracunculifolia* que é rica nesse

composto, um antioxidante biodisponível capaz de prevenir doenças degenerativas atuando sobre DNA celular.

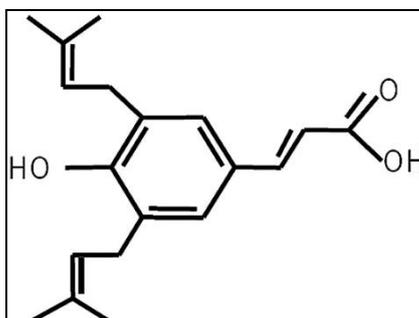


Figura 3 - Estrutura química do artepelin C, o ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinnâmico
Fonte: PAULINO et al. (2008).

O Artepelin C é um composto ativo que pode ser um forte candidato na prevenção do câncer, sendo assim um excelente eliminador de radicais livres além de possuir propriedades antimicrobiana, anti-inflamatória, antioxidante, antitumoral, imunomoduladora e indutora de apoptose (RESENDE et al., 2012).

Recentemente, estudos demonstraram que os efeitos anti-inflamatórios *in vitro* da própolis verde brasileira são atribuídos principalmente aos polifenóis ácido cafeico e artepelin C (PAULINO et al, 2008).

A atividade antioxidante da própolis e do ácido cafeico foi estudada por (BÚFALO et al., 2013) através do método DPPH, e o ácido cafeico demonstrou atividade antioxidante maior do que o extrato de própolis. De acordo com esses autores, os derivados de ácido cafeico presentes na amostra de própolis podem contribuir para a atividade antioxidante. Esse composto também apresentou propriedades anti-inflamatória, antiproliferativa e atividade citotóxica contra diferentes linhagens celulares de câncer humano.

2.2.3 Incorporação de EEP a filmes biodegradáveis

As embalagens de alimentos podem ser utilizadas como estratégia de competitividade na indústria de alimentos, visando atender aos consumidores cada vez mais exigentes e buscam produtos mais próximos ao natural. O fornecimento de embalagens que preservem as características dos alimentos e sejam interessantes do

ponto de vista econômico, além de serem ambientalmente amigáveis atenderia essa demanda e apresentam elevado potencial de aplicação no mercado de alimentos (SOARES et al., 2009).

A indústria de alimentos tem sido encorajada a desenvolver novos conceitos de embalagens a fim de proteger os alimentos contra fatores internos e externos e que prolongue a vida útil dos alimentos (RIBEIRO-SANTOS et al., 2017).

As embalagens deixaram de ser consideradas um componente passivo, e passaram a ser consideradas componente que exerce papel ativo, interagindo com o ambiente externo e com o alimento no interior da própria embalagem, através da liberação de moléculas ativas que prolongam a vida útil dos alimentos, fornecendo proteção contra a deterioração microbiana e oxidação. As boas práticas de fabricação, no entanto, não devem ser substituídas pelo uso de materiais de embalagens ativos, mas essas devem servir como obstáculo adicional contra o desenvolvimento de microrganismos deteriorantes e patogênicos e assim, aumentar a segurança dos alimentos (RIZZOLO et al., 2016).

A deterioração de alimentos causada por microrganismos patogênicos, incluindo bactérias e fungos, apresenta preocupação global, pois não só reduz a vida útil dos alimentos, mas aumenta o risco de doenças transmitidas pelos alimentos (KREPKER et al., 2017).

A embalagem ativa é uma tecnologia inovadora que permite que o produto e seu ambiente interajam para prolongar a vida útil do produto e/ou para garantir a segurança microbiana, mantendo a qualidade do alimento embalado (AHVENAINEN 2013).

Por outro lado, a demanda por antioxidantes naturais tem recebido atenção especial da indústria de alimentos e de pesquisadores de todo o mundo. Devido à natureza carcinogênica de alguns antioxidantes sintéticos, as preferências dos consumidores passaram de antioxidantes sintéticos para naturais. Antioxidantes sintéticos são usados rotineiramente na indústria de alimentos, principalmente em alimentos que contêm óleos e gorduras para proteger contra a oxidação de lipídios (REIS et al., 2017).

Para controlar a ação de microrganismos indesejáveis em alimentos, substâncias antimicrobianas podem ser incorporadas a materiais de embalagens de alimentos liberando ativos antimicrobianos contra microrganismos que poderiam representar risco para a segurança alimentar dos consumidores. Já os antioxidantes amplamente utilizados para estabilidade à oxidação de lipídeos e produtos sensíveis ao O₂, também

podem ser incorporados em películas para estabilização de polímeros com a finalidade de proteção das películas (VERMEIREN et al, 1999).

Devido às propriedades antibacteriana, antiviral, antifúngica, antioxidante, anti-inflamatória, imunoestimulantes, e propriedades anticancerígenas, pelo fato dos principais componentes serem geralmente reconhecidos como seguros (GRAS), além do fato dos consumidores estarem em busca de “produtos ecológicos” a própolis está ganhando popularidade como conservante natural para novas aplicações alimentares e está sendo adicionado aos alimentos e bebidas como fonte de compostos bioativos para melhorar a saúde (LUIS-VILLAROYA et al., 2015).

A aplicação de ingredientes derivados de fontes naturais na indústria de alimentos, adicionados como conservantes naturais é uma nova tendência para redução de substâncias sintéticas e de aditivos alimentares (DICASTILLO et al., 2016).

Pesquisas que relatam a incorporação de própolis para melhorar as propriedades de filmes e revestimentos ainda são limitadas. BODINI et al, (2013) investigou as propriedades de filmes de gelatina incorporado à extrato etanólico de própolis. KECHICHIAN et al. (2010) estudou vários ingredientes microbianos, dentre estes a própolis incorporada a filmes biodegradáveis à base de fécula de mandioca. CHANG-BRAVO et al. (2014) estudaram filmes de carragena e amido adicionados de extrato etanólico de própolis. Os autores identificaram o potencial antioxidante e antimicrobiano do extrato etanólico de própolis incorporado a filmes biodegradáveis mostrando que os estudos sobre a incorporação deste composto a biopolímeros devem ser desenvolvidos e incentivados.

REFERÊNCIAS

- ABU-MELLAL, A.; KOOLAJI, N.; DUKE, R. K.; TRAN, V. H.; DUKE, C. C. Prenylated cinnamate and stilbenes from Kangaroo Island propolis and their antioxidant activity. **Phytochemistry**, v.77, p.251–259, 2012
- AHVENAINEN, R. Active and intelligent packaging: An introduction. Novel food packaging techniques, **Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition**, p.5-21, 2003.
- ALENCAR, S. M.; OLDONI, T. L. C.; CASTRO, M. L.; CABRAL, I. S. R.; COSTA-NETO, C. M.; CURY, J. A.; ROSALEN, P. L.; IKEGAKI, M. (2007). Chemical composition and biological activity of a new type of Brazilian propolis: red propolis. **Journal of Ethnopharmacology**, v.113, n.2, p. 278-283, 2007.
- ALENCAR, S.C.; ZEOULA, L.M.; FRANCO, S.L.; PERES, L.P.; ARCURI, P.B.; FORANO, E. Antimicrobial activity of Brazilian propolis extracts against rumen bacteria in vitro. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.29, n.10, p.1951-1959, 2013.
- ALM-ELDEEN, A.A.; BASYONY, M.A.; ELFIKY, N.K.; GHALWASH, M.M. Effect of the Egyptian propolis on the hepatic antioxidant defense and pro-apoptotic p53 and anti-apoptotic bcl2 expressions in aflatoxin B1 treated male mice. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v.87, p. 247–255, 2017.
- ARIENTE, M.; GIULIANI, A.C.; FARAH, O.E.; PIZZINATTO, N.K.; SPERS, E.E. Competitividade na indústria de fécula de mandioca: estudo exploratório. **Revista FAE**, v.8, n.2, p.53-60, 2005.
- AVELLA, M.; DE VLIEGER, J.J.; ERRICO, M.E.; FISCHER, S.; VACCA, P.; VOLPE, M.G. Biodegradable starch/clay nanocomposite films for food packaging applications, **Food chemistry**, v.93, n.3, p.267-274, 2005.

BANSKOTA, A.H.; TEZUKA, Y.; ADNYANA, I.K.; MIDORIKAWA, K.; MATSUSHIGE, K.; MESSAGE, D.; HUERTAS, A.A.G.; KADOTA, S. Cytotoxic, hepatoprotective and free radical scavenging effects of propolis from Brazil, Peru, the Netherlands and China. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 72, n.1-2, p.239–246, 2000.

BANKOVA, V.S.; DE CASTRO, S.L.; MARCUCCI, M.C. Própolis: avanços recentes em química e origem vegetal. **Apidologie**, v.31, p.3-15, 2000.

BANKOVA, V.; Chemical diversity of propolis and the problem of standardization. **Journal of Ethnopharmacology**, v.100, n.1-2, p. 114-117, 2005.

BITTENCOURT, M.L.F., RIBEIRO, P.R.; FRANCO, R.L.P.; HILHORST, H.W.M.; CASTRO, R.D; FERNANDEZ, L.G. Metabolite profiling, antioxidant and antibacterial activities of Brazilian propolis: use of correlation and multivariate analyses to identify potential bioactive compounds. **Food Research International**, v. 76, p. 449-457, 2015.

BODINI, RB . SOBRAL, PJA. FAVARO-TRINDADE, CS. CARVALHO, RA. Properties of gelatin-based films with added ethanol–propolis extract. **LWT - Food Science and Technology**, V. 51, n. 1, p. 104-110, 2013.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento. Instrução Normativa nº 3, de 19 de janeiro de 2001. Aprova os regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade de Apitoxina, Cera de Abelha, Geleia Real, Geleia Real Liofilizada, Polém Apícola, Própolis e Extrato de Própolis. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 23 jan. 2001. Seção I, p. 18-23

BÚFALO, M.C.; FERREIRA, I.; COSTA, G.; FRANCISCO, V.; LIBERAL, J.; CRUZ, M.T.; LOPES, M.C.; BATISTA, M.T.; SFORCIN, J.M. Propolis and its constituent caffeic acid suppress LPS-stimulated pro-inflammatory response by blocking NF- κ B and MAPK activation in macrophages. **Journal of Ethnopharmacology**, v.149, n.1, p. 84-92, 2013.

BURDOCK, G.A. Review of the biological properties and toxicity of bee

propolis(propolis). **Food and Chemical Toxicology**, v. 36, n.4, p. 347–363, 1998.

BUITRAGO, J. A.; La yucca em alimentacion animal. **Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT)**, p.446, 1990.

CASTRO, C.; MURA, F.; VALENZUELA, G.; FIGUEROA, C.; SALINAS, R.; ZUÑIGA, M.C.; TORRES, J.L.; FUGUET, E.; DELPORTE, C. Identification of phenolic compounds by HPLC–ESI-MS/MS and antioxidant activity from Chilean própolis. **Food Research International**, v.64, p.873–879, 2014.

CHANDANASREE, D.; GUL, K.; RIAR, C.S. Effect of hydrocolloids and dry heat modification on physicochemical, thermal, pasting and morphological characteristics of cassava (*Manihot esculenta*) starch. **Food Hydrocolloids**, v.52, p.175-182, 2016.

CHANG-BRAVO, L.; LÓPEZ-CÓRDOBA, A.; MARTINO, M. Biopolymeric matrices made of carrageenan and corn starch for the antioxidant extracts delivery of Cuban red propolis and yerba mate. **Reactive and Functional Polymers**, v.85, p. 11-19, 2014.

CORRADINI, E.; De MEDEIROS, C.L.E.S.; CARVALHO, A.J.F.; CURVELO, A.A.S.; MATTOSO, L.H.C. Estudo Comparativo de Amidos Termoplásticos Derivados do Milho com Diferentes Teores de Amilose. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, São Carlos, v. 15, n. 4, p. 268-273, 2005.

DELGADO, J.F.; SCENI, P.; PELTZER, M.A.; SALVAY, A.G.; de La OSA, O.; WAGNER, J.R. Development of innovative biodegradable films based on biomass of *Saccharomyces cerevisiae*. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 36, p. 83 – 91, 2016.

DICASTILLO, C.L.; BUSTOS, A.; GUARDA, A.; GALOTTO, M. J. Cross-linked methyl cellulose films with murta fruit extract for antioxidant and antimicrobial active food packaging. **Food Hydrocolloids**, v. 60, p. 335-344, 2016.

FREIRES, I.A.; ALENCAR, S.M.; ROSALEN, P.L. A pharmacological perspective on the use of Brazilian Red Propolis and its isolated compounds against human diseases.

European Journal of Medicinal Chemistry, v.110, p. 267–279, 2016.

GEKKER, G.; HU, S.; SPIVAK, M.; LOKENSGARD, J.R.; PETERSON, P.K. Anti-HIV-1 activity of propolis in CD4+ lymphocyte and microglial cell cultures. **Journal Ethnopharmacol.** V. 102, p. 158–163, 2005.

GUTIÉRREZ, T.J.; TAPIA, M.S.; PÉREZ, E.; LUCÍA FAMÁ, L. Structural and mechanical properties of edible films made from native and modified cush-cush yam and cassava starch. **Food Hydrocolloids**, v.45, p.211-2017, 2015.

HAFSA, J.; SMACH M. ali.; BEN KHEDHER, M. ali.; CHARFEDDINE, B.; LIMEM, K.; MAJDOUB, H.; ROUATBI, S. Physical, antioxidant and antimicrobial properties of chitosan films containing Eucalyptus globulus essential oil. *LWT - Food Science and Technology*, v. 68, p. 356-364, 2016.

HIGASHI, K.O.; CASTRO, S.L. Propolis extracts are effective against *Trypanosoma cruzi* and have an impact on its interaction with host cells. **Journal of Ethnopharmacology**, v.43, n.2, p. 149-155, 1994.

HU, F.; HEPBURN, H.R.; LI, Y.; CHEN, M.; RADLOFF, S.E.; DAYA, S. Effects of ethanol and water extracts of propolis (bee glue) on acute inflammatory animal models. **Journal of Ethnopharmacology**, v.100, n.3, p. 276–283, 2005.

HUANG, S.; ZHANG, C.P.; WANG, K.; LI, G.Q.; HU, F.L. Recent Advances in the Chemical Composition of Propolis. **Molecules**, v.19, p. 19610-19632, 2014.

HUANG, J.; ZHAO, L.; MAN, J.; WANG, J.; ZHOU, W.; HUAIA, H.; WEI, C. Comparação das propriedades físico-químicas do tipo B não tradicionais amidos de diferentes origens. **Jornal Internacional de macromoléculas biológicas**, v.78, p. 165-172, 2015.

IBRAHIM, H.; FARAG, M.; MEGAHEDE, H.; MEHANNY, S. Characteristics of starch-based biodegradable composites reinforced with date palm and flax fibers. **Carbohydrate Polymers**, Giza, v.101, p.11-19, 2014.

ICHIHARA, T.; FUKUDA, J.; TAKAHA, T.; SUZUKI, S.; YUGUCHI, Y.; KITAMURA, S. Small-angle X-ray scattering measurements of gel produced from α -amylase-treated cassava starch granules. **Food Hydrocolloid**, v.55, p.228-234, 2016.

JIMÉNEZ, A.; FABRA, M. J.; TALENS, P.; CHIRALT, A. Effect of re-crystallization on tensile, optical and water vapour barrier properties of corn starch films containing fatty acids. **Food Hydrocolloids**, v.26, n. 1, p. 302-310, 2012.

KARTAL, M., YILDIZ, S., KAYA, S., KURUCU, S., TOPÇU, G. Antimicrobial activity of própolis samples from two different regions of Anatolia. **Journal Ethnopharmacol**, v.86, n.1, p.69–73, 2003.

KECHICHIAN, V.; DITCHFIELD, C.; VEIGA-SANTOS, P.; TADINI, C. C. Natural antimicrobial ingredients incorporated in biodegradable films based on cassava starch. **LWT - Food Science and Technology**, v. 73, p. 1088- 1094, 2010.

KREPKER, M. SHEMESH, R.; POLEG, Y.D.; KASHI, Y.; VAXMAN, A.; SEGAL, E. Active food packaging films with synergistic antimicrobial activity. **Food Control**, v.76, p.117-126, 2017.

KUJUMGIEV, A.; TSVETKOVA, I.; SERKEDJIEVA, Y.; BANKOVA, V.; CHRISTOV, R.; POPOV, S. Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin. **Journal Ethnopharmacol**, v.64, p. 235-240, 1999.

KUMAZAWA, S.; HAMASAKA, T.; NAKAYAMA, T. Antioxidant activity of propolis of various Geo graphic origins. **Food Chemistry**, v.84, n.3, p.329-339, 2004.

LI, H.; WU, F.; TAN, J.; WANG, K.; ZHANG, C.; ZHENG, H.; HU, F. Caffeic acid phenethyl ester exhibiting distinctive binding interaction with human serum albumin implies the pharmacokinetic basis of propolis bioactive components. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.122, p.21-28, 2016.

LIU, B.; XU, H.; ZHAO, H.; LIU, W.; ZHAO, L.; LI, Y. Preparation and characterization of intelligent starch/PVA films for simultaneous colorimetric indication

and antimicrobial activity for food packaging applications. **Carbohydrate Polymers**, v.157, p.842-849, 2017

LIU, J.; WANG, X.; WEN, F.; ZHANG, S.; SHEN, R.; JIANG, W.; KAN, J.; JIN, C. Morphology, structural and physicochemical properties of starch from the root of *Cynanchum auriculatum* Royle ex Wight. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 93, p. 107-116, 2016.

LUIS-VILLARROYA, A.; ESPINA, L.; GARCÍA-GONZALO, D.; BAYARRI, S.; PÉREZ, C.; PAGÁN, R. Bioactive properties of a propolis-based dietary supplement and its use in combination with mild heat for apple juice preservation. **International Journal of Food Microbiology**, v.2015, p.90-97, 2015.

MALI, S.; GROSSMANN, M.V.E.; GARCÍA, M.A.; MARTINO, M. N.; ZARITZKY, N. E. Effects of controlled storage on thermal, mechanical and barrier properties of plasticized films from different starch sources, **Journal of Food Engineering** , v.75, n.4, p.253-460, 2006.

MARCUCCI, M.C.; FERRERES, F.; GARCIA-VIGUERA, C.; BANKOVA, V.S.; DE CASTRO, S.L.; DANTAS, A.P.; VALENTE P.H.M.; PAULINO, N. Phenolic compounds from Brazilian propolis with pharmacological activities. **Journal of Ethnopharmacology**, v.74, n.2, p.105-112, 2001.

MEDINA JARAMILLO, C.; GUTIÉRREZ, T.J.; GOYANES, S.; BERNAL, C.; FAMÁ, C. Biodegradability and plasticizing effect of yerba mate extract on cassava starch edible films. **Carbohydrate Polymers**, v.151, p.150–159, 2016.

MENDES, J.F.; PASCHOALIN, R.T.; CARMONA, V.B.; NETO, A.R.S.; MARQUES, A.C.P.; MARCONCINI, J.M.; MATTOSO, L.H.C; MEDEIROS, E.S; OLIVEIRA, J.E. Biodegradable polymer blends based on corn starch and thermoplastic chitosan processed by extrusion. **Carbohydrate polymers**, v.137, p.452-458, 2016.

MISHIMA, S.; NARITA, Y.; CHIKAMATSU, S.; INOH, Y.; OHTA, S.; YOSHIDA, C.; ARAKI, Y.; AKAO, Y.; SUZUKI, K-M.; NOZAWA, Y. Effects of propolis on

cell growth and gene expression in HL-60 cells. **Journal Ethnopharmacol**, v.99, n.1, p.5–11, 2005.

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

NIKI, E. Antioxidant capacity: Which capacity and how to assess it? **Journal of Berry Research**. v. 1, p.169–176, 2011.

OLSEN, K.M.; SACHAAL, B.A. Evidence on the origin of cassava: Phylogeography of *Manihot esculenta*, **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.96, p.5586-5591, 1999.

ORŠOLIĆ, N.; BAŠIĆ, I. Antitumor, hematostimulative and radioprotective action of water-soluble derivative of propolis (WSDP). **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v.59, n.10, p.561–570, 2005.

PAULINO, N.; ABREU, S.R.L.; UTO, Y.; KOYAMA, D.; NAGASAWA, H.; HORI, H.; DIRSCH, V.M.; VOLLMAR, A.M.; SCREMIN, A.; BRETZ, W.A. Anti-inflammatory effects of a bioavailable compound, Artepillin C, in Brazilian propolis. **European Journal of Pharmacology**, v. 587, n. 1-3, p. 296–301, 2008.

PARK, Y.K.; IKEGAKI, M.; ALENCAR, S.M.; MOURA, F.F. Evaluation of Brazilian propolis by both physicochemical methods and biological activity. **Honeybe Ciência**, v.21, n.2, p.85-90, 2000.

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

PETERSON, K.; NIELSEN, P. V.; BERTELSEN, G.; LAWTHORP, M.; OLSEN, M. B.; NILSSON, N. H, et al. Potential of bio based materials for food packaging, **Food Science & Technology**, v. 10, n. 2 p. 52-68, 1999.

PIÑEROS-HERNANDEZ, D.; MEDINA-JARAMILLO, C.; LÓPEZ-CÓRDOBA, A.; GOYANES, S. Edible cassava starch films carrying rosemary antioxidant extracts for potential use as active food packaging. **Food Hydrocolloids**, v.63, p.488-495, 2017.

REIS, A.S.; DIEDRICH, C.; MOURA, C.; PEREIRA, D.; ALMEIDA, J.F.; SILVA, L.D.; PLATA-OVIEDO, M.S.V.; TAVARES, R.A.W.; TERESINHA CARPES, S.T. Physico-chemical characteristics of microencapsulated propolis co-product extract and its effect on storage stability of burger meat during storage at $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$. **LWT - Food Science and Technology**, v.76, part B, p. 306–313, 2017.

RIBEIRO-SANTOS, R.; ANDRADE, M.; SANCHES-SILVA, A. Application of encapsulated essential oils as antimicrobial agents in food packaging. **Current Opinion in Food Science**, v.14, p.78-84, 2017.

RIZZOLO, A.; BIANCHI, G.; POVOLO, M.; MIGLIORI, C.A.; CONTARINI, G.; VALERIA PELIZZOLA, V.; CATTANEO, T.M.P. Volatile compound composition and antioxidant activity of cooked ham slices packed in propolis-based active packaging. **Food Packaging and Shelf Life**, v.8, p.41-49, 2016.

RESENDE, F.A.; MUNARI, C.C.; MONTEIRO NETO, M.A.B.; TAVARES, D.C.; BASTOS, J.K.; SILVA FILHO, A.A.; VARANDA, E.A. Comparative Studies of the (Anti) Mutagenicity of *Baccharis dracunculifolia* and Artepillin C by the Bacterial Reverse Mutation Test. **Molecules**, v.17, p.2335-2350, 2012.

RODRIGUES, C.R..F.; PLENTZ, L.C.; MARCUCCI, M.C.; DIHL, R.R.; LEHMANN, M. In vivo evaluation of mutagenic and recombinagenic activities of Brazilian própolis. **Food and Chemical Toxicology**, v. 96, p.117-121, 2016.

RODRÍGUEZ, M.; OSÉS, J.; ZIANI, K.; MATÉ, J.I. Combined effect of plasticizers and surfactants on the physical properties of starch based edible films. **Food Research International**, v.39, n.8, p.840-846, 2006.

ROMPOTHI, O.; PRADIPASENA, P.; TANANUWONG, K.;

SOMWANGTHANAROJ, A. Development of non-water soluble, ductile mung bean starch based edible film with oxygen barrier and heat sealability. **Carbohydrate Polymers**, v.157, p.748-756, 2017.

SELIGRA, P.G.; JARAMILLO, C.M.; FAMÁ, L.; GOYANES, S. Biodegradable and non-retrogradable eco-films based on starch–glycerol with citric acid as crosslinking agente. **Carbohydrate Polymers**, v.138, p.66-74, 2016.

SESSINI, V.; ARRIETA, M.P.; KENNY, J.M.; PEPONI, L. Processing of edible films based on nanoreinforced gelatinized starch. **Polymer Degradation and Stability**, v.132, p.157-168, 2016.

SFORCIN, J.M.; FERNANDES Jr, A.; LOPES, C.A.M.; BANKOVA, V.; FURANI, S.R.C. Seasonal effect on Brazilian propolis antibacterial activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v.73, n.1, p.243-249, 2000.

SFORCIN, J.M.; KANENO, R.; FUNARI, S. R.C. Absence of seasonal effect on the immunomodulatory action of Brazilian propolis on natural killer activity. **Journal of Venomous Animals and Toxins**, v.8, p.19-29, 2002.

SFORCIN, J.M. Propolis and the immune system: a review. **Journal of Ethnopharmacology**, v.113, n.1, p.1-14, 2007.

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

SHIMIZU,K.; ASHIDA, H.; MATSUURA, Y.; KANAZAWA, K. Antioxidative bioavailability of artepillin C in Brazilian propolis. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 424, n.2, p.181–188, 2004.

SOARES, I.F.F.; da SILVA, W.A.; PIRES, A.C.S,et al. Novos desenvolvimentos e aplicações em embalagens de alimentos. **Ceres**, v.56, n.4, p. 370-378, 2009.

SOUZA, A.C.; GOTO, G.E.O.; MAINARDI, J.A.; COELHO, A.C.V.; TADINI, C.C. Cassava starch composite films incorporated with cinnamon essential oil: Antimicrobial activity, microstructure, mechanical and barrier properties. **LWT - Food Science and Technology**, v.54, n.2, p.346-352, 2013.

SOYLU, E.M., ÖZDEMİR, A.E., ERTÜRK, E., SAHINLER, N., SOYLU, S. Antifungal activity of propolis against postharvest disease agent *Penicillium digitatum*. **Asian Journal of Chemistry**, v.20, p.4823-4830, 2008.

STINCO, C. M.; FERNÁNDEZ-VÁZQUEZ, R.; HEREDIA, F. J.; MELENDEZ-MARTINEZ, A.J.; VICARIO, I.M. Bioaccessibility, antioxidant activity and colour of carotenoids in ultrafrozen orange juices: Influence of thawing conditions. **LWT - Food Science and Technology**, v. 53, n. 2, p. 458-463, 2013.

TAKAISI-KIKUNI, N.B.; SCHILCHER, H. Electron microscopic and microcalorimetric investigations of the possible mechanism of the antibacterial action of a defined propolis provenance, **Planta Med.** v.60. n.3, p.222–227, 1994.

ULU, A.; KOYTEPE, S.; ATES, B. Design of starch functionalized biodegradable P(MAA-co-MMA) as carrier matrix for l-asparaginase immobilization. **Carbohydrate Polymers**, v.153, p. 559-572, 2016.

UZEL, A.; SORKUN, K.; ÖNÇAG, Ö.; ÇOĞULU, D.; GENÇAY, Ö.; SALI H, B. Chemical compositions and antimicrobial activities of four different Anatolian propolis samples. **Microbiological Research**, v.160, n.2, p.189-195, 2005.

VERMEIREN, L.; DEVLIEGHERE, F.; van BEEST, M.; de KRUIJF, N.; DEBEVERE, J. Developments in the active packaging of foods. **Trends in Food Science & Technology**, v. 10, n.3, p. 77-86, 1999.

WANG, K. WANG, W.; Ye, R.; LIU, A.; XIAO, J.; LIU, Y.; ZHAO, Y. Mechanical properties and solubility in water of corn starch-collagen composite films: Effect of starch type and concentrations. **Food Chemistry**, v.2016, p.209-2016, 2017.

ZHU, F.; Composition, structure, physicochemical properties, and modifications of cassava starch. **Carbohydrate Polymers**, v.122, p.456-480, 2015.

3. OBJETIVOS

3.1. Geral

Avaliar o perfil químico, atividade antimicrobiana e antioxidante do extrato etanólico de própolis (EEP), bem como produzir e caracterizar filmes de amido à base de fécula de mandioca incorporados com diferentes concentrações do extrato e avaliar o efeito da incorporação do extrato nos filmes.

3.2. Específicos

- Identificar e quantificar por cromatografia os principais compostos presentes na amostra de EEP;
- Avaliar a atividade antioxidante e antimicrobiana do EEP;
- Determinar o teor de compostos fenólicos e flavonoides do EEP;
- Produzir biopolímeros de amido a partir de fécula de mandioca incorporados com EEP;
- Avaliar se o efeito da incorporação de EEP afeta as propriedades mecânicas dos biopolímeros (resistência à tração, elasticidade, alongamento) e sua microestrutura;
- Determinar a concentração de compostos fenólicos e a atividade antioxidante do EEP sobre a matriz do biopolímero.

4. CAPÍTULO I

Perfil químico e avaliação da atividade antimicrobiana e antioxidante do extrato etanólico de própolis

RESUMO

CUNHA, GIANA. FERREIRA. Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano – *Campus* Rio Verde – GO, agosto de 2017. **Perfil Químico e Avaliação da Atividade Antimicrobiana e Antioxidante do Extrato Etanólico de Própolis.** Orientadora: Dra. Geovana Rocha Plácido. Coorientador: Dr. Celso Martins Belisário

O perfil químico, teor de compostos fenólicos e flavonoides totais bem como a atividade antioxidante e antimicrobiana do Extrato Etanólico de Própolis verde da região de Minas Gerais foram avaliados e os principais compostos identificados e quantificados. A análise por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) revelou a presença de artepelin C em grande quantidade (cerca de 10,957 mg mL⁻¹ EEP) além dos compostos ácido cafeico, ácido *p*-cumárico, 3,5 dicafeoilquínico, 4,5 Dicafeoilquínico, 4,5 Dicafeoilquínico, aromadendrina-4'-metil éster, drupanina, artepelin C e bacarina. O EEP apresentou atividade antimicrobiana bactericida e bacteriostática contra os microrganismos *Staphylococcus aureus* (Gram-positivo) e *Escherichia coli* (Gram-negativo) sendo que o microrganismo Gram-positivo foi mais susceptível ao EEP, além de atividade antioxidante ($63,47 \pm 0,3$ TE mg mL⁻¹). O teor de compostos fenólicos e flavonoides foi de $17,20 \pm 0,26$ mg mL⁻¹ e $5,38 \pm 0,05$ mg mL⁻¹ expresso em Rutina e $10,42 \pm 0,11$ mg mL⁻¹ em Quercetina respectivamente. Os resultados demonstraram que a própolis estudada é composta por moléculas valiosas com potencial para ser utilizada para melhorar a saúde humana e segurança alimentar.

Palavras-chave: perfil químico; artepelin C; bactericida; bacteriostática

Chemical profile and evaluation of antimicrobial and antioxidant activity of propolis ethanol extract

ABSTRACT

CUNHA, GIANA. FERREIRA. Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano (Goiano Federal Institute of Science, Education, and Technology) – Rio Verde *Campus* – Goiás State (GO), Brazil, August 2017. **Chemical profile and evaluation of antimicrobial and antioxidant activity of propolis ethanol extract.** Advisor: Dr. Plácido, Geovana Rocha. Co-advisor: Dr. Belisário, Celso Martins.

The chemical profile, total phenolic compounds and total flavonoids, as well as the antioxidant and antimicrobial activity of the Brazilian green EEP of the region of Minas Gerais were evaluated in order to identify and quantify the main compounds. Analysis by high performance liquid chromatography (HPLC) revealed the presence of artepelin C in large amounts (about $10.957 \text{ mg mL}^{-1}$ EEP) in addition to the compounds caffeic acid, p-coumaric acid, 3,5-dideofeoylquinic, 4,5-Diopheoylquinic, 4,5-Dicapheoquinic, aromadendrin-4'-methyl ester, drupanine, artepelin C and baccharin. The bacterial and bacteriostatic antimicrobial activity against *Staphylococcus aureus* (Gram-positive) and *Escherichia coli* (Gram-negative) microorganisms were evaluated. The Gram-positive microorganism was more susceptible to EEP, besides antioxidant activity ($63.47 \pm 0,3 \text{ TE mg mL}^{-1}$). The content of phenolic compounds and flavonoids was $17.20 \pm 0.26 \text{ mg mL}^{-1}$ and $5.38 \pm 0.05 \text{ mg mL}^{-1}$ expressed in Rutin and $10.42 \pm 0.11 \text{ mg mL}^{-1}$ in Quercetin respectively. The results showed that the propolis studied is composed of valuable molecules with potential to be used to improve human health and food safety.

Key words: chemical profile; artepelin C; bactericide; bacteriostatic

4.1. INTRODUÇÃO

A própolis é um material resinoso coletados pelas abelhas de brotos de árvores, seiva e outras fontes botânicas, utilizada para proteção da colmeia contra a entrada de intrusos e suavização das paredes. A própolis tem sido amplamente utilizada

desde a antiguidade para embalsamar cadáveres, como desinfetante e antisséptico para infecções cutâneas e bucais. Atualmente, as pesquisas com própolis têm sido elaboradas principalmente com o objetivo de analisar a composição química, por causa das propriedades biológicas tais como antibacteriana, antifúngica e anti-inflamatório, atribuídas ao rico teor de flavonoides, ácidos fenólicos e derivados de terpenos (BANKOVA, et al., 2005 e ZABAIYOU et al., 2017).

A própolis é composta basicamente por 50% de resina, 30% de cera, 5% de pólen, 10% de óleos aromáticos e 5% de outros resíduos orgânicos (SHIMIZU et al., 2004). Aos compostos fenólicos como flavonoides e ácidos fenólicos, são associadas as propriedades biológicas como atividades anti-inflamatória, imunomoduladora, anticancerígena, antimicrobiana, leishmanicida e cicatrizante (MARCUCCI et al., 2000, BITTENCOURT et al., 2015).

A composição da própolis depende da flora e local da coleta (BANKOVA et al., 2005). A própolis de regiões temperadas, chamada tipo Álamo, tem como fonte vegetal *Populus sp.*, e é composta principalmente por compostos fenólicos como flavonoides agliconas, ácidos aromáticos e seus ésteres (BANKOVA et al., 2000). A própolis de regiões tropicais é composta principalmente de derivados prenilados do ácido *p*-cumárico, flavonoides, benzofenonas, lignanas e terpenos (POPOVA et al., 2009).

A própolis brasileira é classificada em 13 tipos com base nas propriedades físico-químicas, como cor, textura e perfil químico, bem como origem geográfica (ALENCAR et al., 2007). A própolis verde da região de Minas Gerais, Brasil (grupo 12), tem como fonte as folhas jovens de *Baccharis dracunculifolia* e os principais compostos são terpenoides e derivados prenilados de ácido *p*-cumárico (KUMAZAWA et al., 2003). Das própolis das regiões tropicais, a própolis brasileira é altamente valorizada e possui grande importância comercial, pela ampla gama de benefícios à saúde (SALATINO et al., 2011).

A composição química da própolis pode ser associada às propriedades biológicas, desta forma, a identificação e quantificação dos compostos são fundamentais para compreensão dessas propriedades. Assim, o objetivo desse trabalho foi avaliar o perfil químico do extrato etanólico de própolis verde brasileira (EEP) da cidade de Nepomuceno, Minas Gerais. Determinar o teor de compostos fenólicos e flavonoides totais bem como a atividade antioxidante e antimicrobiana bactericida e bacteriostática do extrato contra *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*.

4.2. MATERIAL E MÉTODOS

Os ensaios atividade antimicrobiana, análise de compostos fenólicos por CLAE, teor de compostos fenólicos e teor de flavonoides foram realizados no Laboratório de Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação da empresa Apis Flora. O ensaio de eliminação de radicais livres ABTS foi realizado no Laboratório de Bioquímica e Análise Instrumental do Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição – ESALQ/USP.

4.2.1. Preparo do extrato etanólico de própolis

A própolis foi coletada no Estado de Minas Gerais, cidade de Nepomuceno (21° 12' 17,79"S/45° 13' 17,2" W), em que *Baccharis dracunculifolia* é a principal fonte vegetal. O extrato etanólico de própolis foi preparado de acordo com BODINI et al., (2013). Triturou-se 30g de resina de própolis e essa foi misturada a 100 mL de álcool etílico (80%). A mistura foi mantida aquecida a 50°C e agitada durante 30 minutos. A mistura foi resfriada e armazenada a 10°C durante 24 horas sendo então filtrada.

4.2.2. Atividade antimicrobiana

A determinação da concentração inibitória mínima (CIM) das amostras foi realizada pela técnica de microdiluição em caldo descrita pelo Comitê Nacional de Padrões de Laboratório Clínico (CLSI, 2003). As microdiluições sucessivas foram realizadas em microplacas de 96 poços. Para o preparo das microplacas, foi adicionado 100 µL de Mueller Hinton Broth (MH) em todos os poços e 100 µL da amostra de EEP no primeiro poço de cada série e a partir do primeiro poço foram realizadas diluições seriadas nos poços seguintes, de modo a atingir uma gama de concentração de 5,150 a 0,003 mg mL⁻¹.

Os microrganismos testados foram: *Escherichia coli* (ATCC25922) e *Staphylococcus aureus* (ATCC25923). As suspensões foram preparadas em solução salina a 0,85% (p/v) e a turbidez das suspensões foi mensurada em espectrofotômetro (625 nm, abs 0,08-0,1) para 10⁸ UFC mL⁻¹ (escala 0,5 de McFarland), essa suspensão inicial foi diluída 200 vezes em MH caldo até a concentração final de 5x10⁵ UFC mL⁻¹.

Uma alíquota de 10 µL da suspensão foi adicionada em todos os poços

(totalizando 5×10^3 UFC mL⁻¹). As placas foram incubadas a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ por 24 horas para posterior avaliação da concentração inibitória mínima (CIM).

4.2.2.1. Concentração inibitória mínima

A concentração inibitória mínima (CIM) foi definida como a concentração mais baixa do EEP que inibiu o crescimento visível bacteriano após o período de incubação da microplaca de 96 poços. Os testes foram realizados em triplicatas. Utilizou-se como controle positivo de crescimento, o meio de cultura Mueller Hinton Broth (MH) inoculado com 10 μL da suspensão de cada microrganismo (5×10^3 UFC mL⁻¹) e como controle negativo (teste de esterilidade do meio de cultura) apenas o meio de cultura Mueller Hinton Broth (MH).

4.2.2.2. Concentração bactericida mínima

A determinação da concentração bactericida mínima (CBM) das amostras foi determinada com base nos resultados obtidos no ensaio de concentração inibitória mínima (CIM), alíquotas de 20 μL de cada poço correspondente à CIM foram transferidas para placas de ágar Mueller Hinton e estas foram incubadas a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ por 24 horas em condições anaeróbicas. A determinação da concentração bactericida mínima das amostras foi determinada levando em consideração a concentração mais baixa de EEP em que não houve crescimento celular no meio sólido (morte do inóculo). Os testes foram realizados em triplicatas.

4.2.3. Perfil compostos fenólicos por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

A análise cromatográfica (CLAE) do extrato etanólico de própolis (EEP) foi realizada utilizando um Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência Shimadzu modelo LC-20AT, equipado com detector de arranjo de díodos (HPLC-UV-DAD), injetor automático, forno, degaseificador e bomba quaternária. Utilizou-se uma coluna Shim-Pack VP-ODS (4,6 mm x 250 mm, diâmetro de partícula de 5 μm). A fase móvel foi constituída de solução de metanol e ácido fórmico 0,1% em água. A eluição foi realizada utilizando um gradiente linear de 25 a 100% em 77 min a uma velocidade de

fluxo de 0,8 mL, a temperatura durante a análise foi mantida a 40°C e o volume de injeção foi de 10 µL. Os dados espectrais foram recolhidos a 275 nm e a identificação foi realizada por comparação dos tempos de retenção. Foi utilizado o ácido gálico como padrão interno. Padrões externos foram utilizados para quantificar os compostos fenólicos, utilizando uma curva de calibração. A curva foi preparada através da mistura de todos os padrões: ácido gálico, ácido cafeico, ácido *p*-cumárico, aromadendrina, artepelin C, 3,5-Dicafeoilquínico, 4,5-Dicafeoilquínico, drupamina e bacarina, 1,06 µg mL⁻¹ a 161 µg L⁻¹ dissolvidos em metanol. O limite mínimo de detecção foi de 0,12 µg mL⁻¹ e o limite de quantificação de 0,35 µg mL⁻¹

4.2.4. Teor de compostos fenólicos totais

Para determinação do conteúdo fenólico total, foi utilizado o método de Folin-Denis, (FUNARI et al., 2007) com adaptações. Foi construída uma curva padrão com soluções de referência de ácido gálico através de diluições sucessivas da solução padrão de ácido gálico (0,4 mg mL⁻¹). Cinco diferentes níveis de concentrações da solução padrão foram preparados transferindo-se para 5 balões volumétricos de 50 mL, os volumes de 0,40; 0,45; 0,50; 0,55 e 0,60 mL, respectivamente, da solução padrão, obtendo 5 soluções com concentrações diferentes (3,20; 3,60; 4,00; 4,40; 4,80 µg mL⁻¹). Em seguida, adicionou-se 25 mL de água destilada, 2,5 mL do reagente de Folin Denis, 5,0 mL de carbonato de sódio e completou o volume com água destilada. Deixando 30 minutos ao abrigo de luz e realizando a leitura em espectrofotômetro em 760 nm.

Para a determinação do conteúdo fenólico total, uma alíquota de 1 mL da amostra foi diluída para 50 mL com água destilada em balão volumétrico e deixado em ultrassom por 10 minutos. Em outro balão de 50 mL contendo 10 mL de água destilada, foi adicionado uma alíquota de 0,5 mL da solução obtida anteriormente, 2,5 mL do reagente Folin-Denis e 5 mL de solução saturada de carbonato de sódio. Deixou-se por 30 minutos ao abrigo da luz e realizou-se a leitura em espectrofotômetro em 760 nm. O branco foi preparado da mesma maneira, sem a alíquota de ácido gálico.

Os resultados foram expressos em GAE: Equivalente de ácido gálico (mg mL⁻¹). Todos os testes foram realizados em triplicatas.

4.2.5. Teor de flavonoides

Foi determinado o teor de flavonoides pelo método descrito por FUNARI et al. (2007) com adaptações. Foram construídas duas curvas padrão com soluções de referência de quercetina e rutina, a solução metanólica padrão de quercetina na concentração de $0,3 \text{ mg mL}^{-1}$ e a solução padrão de rutina na concentração de $0,6 \text{ mg mL}^{-1}$.

Alíquotas de 0,40; 0,45; 0,50; 0,55 e 0,60 mL da solução metanólica de quercetina e rutina padrão ($0,3 \text{ mg mL}^{-1}$ e $0,6 \text{ mg mL}^{-1}$ respectivamente) foram transferidas para balões volumétricos de 25 mL contendo 0,5 mL de solução aquosa de cloreto de alumínio a 5% (p / v) e o volume completado com metanol, obtendo-se cinco soluções com concentrações diferentes para quercetina (4,80; 5,40; 6,00; 6,60 e 7,20 $\mu\text{g mL}^{-1}$) e para rutina (9,60; 10,80; 12,00; 13,20 e 14,40 $\mu\text{g mL}^{-1}$).

Após 30 min ao abrigo da luz, a absorbância foi medida em espectrofotômetro no comprimento de onda de 425 nm. O branco foi preparado com metanol. Todos os testes foram realizados em triplicata.

4.2.6. Atividade de eliminação de radicais ABTS

O ensaio de atividade de eliminação de radical ABTS $\cdot+$, que se baseia na redução do cátion 2,2-azinobis - (3-etilbenzotiazolin-6-ácido sulfônico), foi realizado conforme metodologia descrita por Al-DUAIS et al. (2009). O radical ABTS $\cdot+$ foi formado pela reação de 140 mM de persulfato de potássio com 7 mM de ABTS e armazenado no escuro à temperatura ambiente, por 16 horas. Uma vez formado, o radical foi diluído em tampão fosfato de potássio 7,5 mM (pH=7,4) até a obtenção do valor de absorbância de $0,700 \pm 0,020$ nm em comprimento de onda de 734 nm, a absorbância foi feita em leitora de 96 microplacas (SpectraMax M3, Molecular Devices). A partir do extrato, foram preparadas três diluições diferentes. Em ambiente escuro, foram adicionados em microplacas, alíquota de 20 μL de cada diluição do extrato da amostra e adicionou-se 220 μL de solução do radical ABTS $\cdot+$. As absorbâncias foram lidas a 734 nm, após 6 minutos de reação, utilizando o tampão fosfato de potássio 7,5 mM (pH=7,4) como branco. Como referência, utilizou-se o Ácido Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcorman-2-carboxílico), um antioxidante sintético análogo a vitamina E, nas concentrações de 12,5M a 200 μM . Todos os testes foram realizados em triplicata. Os resultados foram expressos em $\mu\text{mol de Trolox mL}^{-1}$

¹ de extrato (atividade antioxidante = capacidade antioxidante equivalente de Trolox).

4.3. RESULTADO E DISCUSSÃO

4.3.1. Atividade antimicrobiana

A atividade antimicrobiana bacteriostática (CIM) e bactericida (CBM) do EEP foi testada contra *S. aureus* (Gram-positivo) e *E. coli* (Gram-negativo) e ambos foram suscetíveis ao EEP. O resultado da atividade antimicrobiana do EEP contra os microrganismos testados é mostrado na Tabela 1. Embora o EEP tenha sido eficaz contra os dois microrganismos testados, *S. aureus* (0,017 mg mL⁻¹ para CIM e 0,161 mg mL⁻¹ para CBM) foi mais suscetível quando comparado com *E. Coli* (0,161 mg mL⁻¹ para CIM e 1,288 mg mL⁻¹ para CBM).

Tabela 1- Concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) do extrato etanólico de própolis

Microrganismo		CIM (mg mL ⁻¹)	CBM (mg mL ⁻¹)
<i>S.aureus</i> (ATCC25923)	Gram-positivo	0,017	0,161
<i>E.Coli</i> (ATCC25922)	Gram-negativo	0,161	1,288

O resultado encontrado está de acordo com SILICI e KUTLUCA (2005) que investigaram a atividade antimicrobiana de três diferentes extratos de própolis contra bactérias Gram-negativas (*E. coli* e *P. aeruginosa*), Gram-positivas (*S. aureus*) e da levedura (*Candida albicans*) e entre os microrganismos estudados, as amostras de própolis inibiram o crescimento de *S. aureus* melhor do que Gram-negativas e leveduras. De acordo com NORI et al. (2011) bactérias Gram-negativas possuem uma membrana celular quimicamente complexa e um de seus constituintes, o lipopolissacarídeo, determina a antigenicidade, toxicidade e patogenicidade destes

microrganismos.

Vários resultados também sustentam a hipótese de que a própolis é mais ativa contra as bactérias Gram-positivas do que Gram-negativas. DOBROWOLSKI et al. (1991) demonstraram a maior susceptibilidade de microrganismos gram-positivos (*S. aureus*, *S. pyogenes*, *S. viridans*, *D. pneumoniae* e *C. diphtheria*) à própolis do que microrganismos gram-negativos (*E. coli*, *S. typhi*, *S. paratyphi-A*, *S. paratyphi-B* e *S. flexneri*). SFORCIN et al. (2000) mostraram uma ação antibacteriana de própolis eficiente em cepas de *S. aureus* em baixas concentrações (CIM 90% = 0,60% v/v) e a inibição de microrganismos gram-negativos (*E. coli* e *S. typhimurium*) em concentrações maiores (CIM 90% = 8,00% v/v), mostrando que são mais resistentes ao EEP. Esses autores, no entanto, apenas puderam comprovar a atividade bacteriostática do EEP e não bactericida, e pode ser verificado nesse trabalho.

A atividade bactericida e bacteriostática verificada nesse trabalho pode ser pela composição química do EEP, uma vez que de acordo com BURDOCK (1998) a atividade antibacteriana da própolis é relatada como sendo devido aos flavonoides, ácidos aromáticos e seus ésteres e ainda de acordo com MIRZOEVA et al. (1997) é possível que os efeitos bactericidas e bacteriostáticos da própolis sejam o resultado das ações combinadas de componentes como derivados cinâmicos (Ácido cafeico e CAPE) e flavonoides (como Quercetina e a Naringenina). Esses constituintes possuem a capacidade de aumentar a permeabilidade da membrana celular bacteriana atuando como ionóforos inibindo sua motilidade (CAPE > Quercetina > Naringenina > Ácido cafeico) e contribuindo para o efeito citotóxico.

A ação antibacteriana da própolis de acordo com NETO et al. (2017), é complexa mas de forma geral, pode ser descrito como a inibição da síntese de DNA e RNA; inibição da enzima DNA-girase; lesão da membrana citoplasmática causada pela redução da fluidez; inibição do suprimento energético causado pela perturbação no mecanismo de troca de nutrientes e metabólicos por causa do dano causado à membrana citoplasmática; inibição da fixação e formação do biofilme.

4.3.2. Identificação e quantificação de compostos fenólicos

A análise por CLAE do EEP permitiu a identificação e quantificação dos seguintes compostos fenólicos principais: ácido cafeico, ácido *p*-cumárico, 3,5 dicafeoilquínico, 4,5 dicafeoilquínico, aromadendrina (aromadendrina-4'-metil éter),

drupanina (ácido 3-prenil-*p*-cumárico), artepelin C (ácido 3,5-prenil-4-hidrocinâmico) e bacarina (ácido 3-prenil-4-diidrocinamoxi-cinâmico). O extrato etanólico de própolis verde, Minas Gerais, Brasil, apresentou níveis significativos de ácidos fenólicos prenilados, incluindo a artepelin C como mostra o cromatograma de CLAE do EEP (Figura 1). A Tabela 2 mostra as quantidades relativas dos compostos identificados.

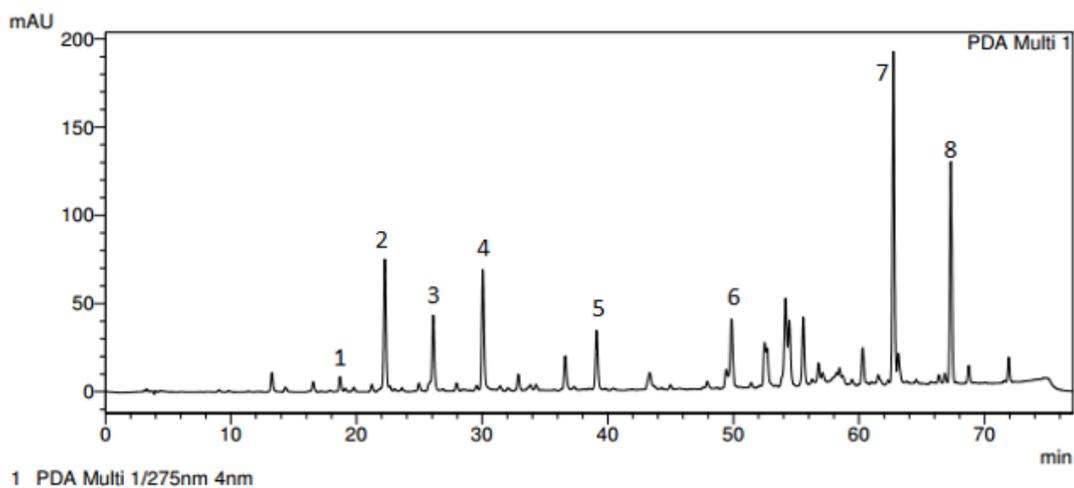


Figura 1- Cromatograma de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) do extrato etanólico de própolis. Miliunidades de absorvância (mAU) em função do tempo de retenção (Rt, em min) dos compostos fenólicos.

Tabela 2- Cromatografia líquida de alta eficiência: pico de atribuição, tempo de retenção e área de quantificação dos principais compostos do EEP.

Número do Pico	Composto Identificado	Tempo de Retenção (min)	mg mL ⁻¹ de EEP
1	Ácido cafeico	19	0,278
2	Ácido <i>p</i> -cumárico	23	1,494
3	3,5 Dicafeoilquínico	26	2,975
4	4,5 Dicafeoilquínico	30	4,761
5	Aromadendrina	39	1,623
6	Drupanina	50	2,017
7	Artepelin C	63	10,957
8	Bacarina	67	2,263

Os resultados encontrados estão qualitativamente concordantes com os achados na literatura, referente a outras própolis da região Sudeste Brasileira (MISHIMA, et al., 2005; FUNARI et al., 2007; TANI, et al., 2010; XUAN, et al., 2011; WANG, et al., 2015).

Os compostos químicos encontrados no EEP desse estudo de forma isolada são responsáveis por várias atividades biológicas já relatadas na literatura da própolis. O ácido *p*-cumárico e seus derivados como ácido cafeico, possuem atividade antioxidante, antimicrobiana, antitumoral e anti-inflamatória (ABDEL-WAHAB, et al., 2003, PROESTOS et al., 2006, BÚFALO et al., 2013, PENG et al., 2015, CANÇÃO et al., 2011). O artepelin C, drupanina e bacarina possuem propriedades anticancerígenas (AKAO et al., 2003). Os compostos aromadendrina-4'-metil éter e a bacarina parecem desempenhar um papel essencial na atividade antioxidante (SIMÕES-AMBROSIO et al., 2010).

O ácido cafeico, e seus derivados, (ácidos monocafeoilquínicos e ácidos dicafeoilquínicos), são potentes antioxidantes, sendo que a atividade antioxidante do ácido cafeico contra H₂O₂ e O₂, é 4 a 6 vezes maior do que o ácido ascórbico (NAKAJIMA et al., 2009). Além disso, o ácido cafeico também possui atividade anti-inflamatória (D'ALMEIDA et al., 2013) e antibacteriana (MIRZOEVA, et al., 1997).

O único marcador utilizado para identificar e quantificar flavonoides nesse estudo foi a aromadendrina (aromadendrina-4 'metil éter), no entanto, a própolis verde brasileira contém outros flavonoides como quercetina, kaempferol, isossacuranetina,

5,6,7-tri-hidroxi- 3'-4-dimetoxiflavona, naringenina (CHEUNG et al., 2011, SIMÕES et al., 2004, MARCUCCI e BANKOVA, 1999, MIRZOEVA et al., 1997).

O perfil fenólico pela análise de CLAE exibiu o artepelin C como pico principal (Figura 1), que foi encontrado em níveis mais elevados que os demais compostos. Verificou-se que a concentração de artepelin C representa cerca de 10,957 mg mL⁻¹ de EEP a 30% (30 g 100 mL⁻¹). De acordo com CARVALHO et al. (2011), a própolis que possui artepelin C, é considerada de alta qualidade pelas propriedades biológicas desse composto e algumas empresas utilizam o teor de artepelin C como parâmetro no controle de qualidade. Esse é um dos compostos ativos mais importantes da própolis verde brasileira, única que possui esse composto e seu perfil químico é relativamente estável devido à relativa ausência de variação sazonal e existência regular da fonte vegetal *Baccharis dracunculifolia* (CHEUNG et al., 2011).

São relatadas para esse composto várias atividades biológicas como anticancerígena, antimicrobiana, antioxidante e aumento na resposta imune contra a leucemia (AKAO et al., 2003; CARVALHO et al., 2011). Propriedades antitumoral, imunomoduladora, imunossupressora, indutor de apoptose e anti-inflamatória além de ser considerado um excelente eliminador de radicais livres (CHEUNG et al., 2011; RESENDE et al., 2012; NAKASHIMA et al., 2014).

4.3.3. Teor de compostos fenólicos totais

A própolis estudada apresentou teor de compostos fenólicos de 17,20 ± 0,26 mg mL⁻¹ expresso em ácido gálico ou 1,7% ± 0,03 g de ácido gálico 100 mL⁻¹ de EEP. Esse resultado está de acordo com o verificado por SILVA et al. (2006) que determinaram os níveis quantitativos dos componentes fenólicos de extratos de própolis brasileiros produzidos em diferentes regiões geográficas e encontraram 1,01 ± 0,03% a 1,84 ± 0,06% para a própolis da região de Minas Gerais. No entanto, a análise por CLAE do EEP revelou um valor maior (tabela 2), e faz concluir que o valor encontrado pelo método espectrofotométrico tenha sido subestimado.

O teor total de polifenóis da EEP do Brasil é menor quando comparado com os da EEP da Europa, sugerindo que os principais componentes da própolis brasileira são diferentes daqueles da própolis europeia e chinesa (KUMAZAWA et al., 2004).

Os principais componentes da própolis brasileira produzida nos estados de São Paulo e Minas Gerais são terpenoides e derivados prenilados de ácido *p*-cumárico. Estes

compostos estão ausentes na própolis europeia, norte-americana e asiática, cujos principais constituintes são vários tipos de flavonoides e ésteres fenólicos (MARCUCCI e BANKOVA, 1999; TAZAWA et al., 1999; SFORCIN e BANKOVA, 2011).

Essa composição particular da própolis verde brasileira é atribuída à sua principal fonte vegetal, *Baccharis dracunculifolia* (*Asteraceae*), arbusto amplamente distribuído nos Estados de São Paulo e Minas Gerais (PARK et al., 2002).

Compostos fenólicos são os principais constituintes responsáveis pela significativa atividade antimicrobiana verificada em amostras de própolis de diferentes regiões, embora apresente perfis químicos diferentes (BANKOVA et al., 2014). Além de serem considerados ótimos antioxidantes capazes de prevenir a formação de radicais livres, eliminando-os ou promovendo a decomposição (CASTRO et al., 2014).

4.3.4. Teor de flavonoides

O Teor de flavonoides do EEP estudado expresso em Quercetina foi de $5,38 \pm 0,05 \text{ mg mL}^{-1}$ (ou 0,05%) e expresso em Rutina foi de $10,42 \pm 0,11 \text{ mg mL}^{-1}$ (ou 0,1%), o valor baixo, no entanto, já era esperado uma vez que a própolis verde brasileira possui uma baixa concentração de flavonoides e ésteres de ácidos fenólicos e em contrapartida, altas concentrações de ácido dihidroxicinâmico, terpenoides e acetofenonas preniladas (BANKOVA et al., 1995).

Elevados teores de flavonoides são verificados somente na própolis vermelha (Grupo 13), encontrada nos Estados do Nordeste do Brasil (Bahia, Paraíba, Sergipe, Pernambuco e Alagoas) (ALMEIDA et al., 2017). No entanto, embora fosse esperado valor baixo para o teor de flavonoides, os valores encontrados nesse estudo podem ter sido subestimados, pois o ensaio de CLAE que embora tenha utilizado apenas o marcador para o flavonoide aromadendrina-4'-metil éter, a concentração verificada desse composto foi superior ao encontrado pela análise de flavonoides totais pelo método espectrofotométrico, esse fato pode ser explicado, pois a utilização de cloreto de alumínio no método é específica para flavonas e flavonóis (FUNARI et al., 2007). A aromadendrina-4'-metil-éter é um flavonóide presente na própolis verde brasileira e ausente nas própolis europeia, norte-americana e asiática (MARCUCCI e BANKOVA, 1999).

O teor de flavonoides encontrados nesse estudo pode ser maior ou ainda menor em períodos diferentes do ano, embora estudos complementares sejam

necessários para confirmação dessa hipótese. Isso porque a concentração dos compostos fenólicos totais de *B. dracunculifolia* parece não ter variações significativas durante o ano, no entanto, foram encontradas variações durante o ano a respeito do teor de flavonoides. As maiores concentrações foram encontradas nos meses de dezembro, fevereiro e março e as menores concentrações foram encontradas em agosto, setembro e maio. *B. dracunculifolia* fornece a maioria dos compostos químicos encontrados nos EEP verde produzidos nos estados de São Paulo e Minas Gerais (FIGUEIREDO-RINHEL et al.,2013), e poderia gerar variações no teor de flavonoides do EEP com quantidades maiores ou menores durante o ano, uma vez que de acordo com os estudos de PARK et al. (2004) e KUMAZAWA et al.(2003), várias substâncias químicas presentes em *B. dracunculifolia* também estão presentes na própolis verde, como flavonoides e derivados de ácido *p*-cumárico.

4.3.5. Atividade antioxidante

Esse estudo encontrou o valor para o EEP de $253,56 \pm 1,21 \mu\text{mol TE mL}^{-1}$ ou $63,47 \pm 0,3 \text{ TE mg mL}^{-1}$, valor semelhante ao encontrado por MACHADO et al. (2016), $77,90 \pm 6,80$ e $86,40 \pm 2,48 \text{ TE mg mL}^{-1}$ pelo método de ABTS de amostras de EEP própolis da região de Minas Gerais e superior ao encontrado por TIVERON et al. (2016) que verificaram valores de $0,29 \pm 0,01$ a $1,24 \pm 0,02 \mu\text{mol TE mg}^{-1}$ pelo método de ABTS quando estudaram amostras de própolis de várias cidades do Sul do Brasil. Esses autores também isolaram os compostos desses extratos de própolis através de Cromatografia em camada delgada de alta eficiência (CCDAE) e CLAE e estudaram a atividade antioxidante desses compostos isolados através do método ABTS e relataram que uma das amostras de própolis apresentou um alto teor de artepelin C ($22,303 \mu\text{g mL}^{-1}$ de EEP) e esse composto exibiu a maior atividade antioxidante dessa amostra, confirmando sua alta atividade antioxidante. Também foram identificados outros compostos na amostra como ácido cafeico, ácido cumárico e ácido gálico, no entanto, a atividade antioxidante desses foi consideravelmente mais baixa ou inexistente.

SHIMIZU et al. (2004) identificaram que a própolis verde da região de Minas Gerais, continha altos níveis de artepelin C, além de vários fenólicos como ácido cinâmico e derivados de kaempferol. O artepelin C (ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico) é um ácido fenólico que pertence ao grupo fenol de compostos

orgânicos geralmente encontrados em frutas e vegetais, no entanto as maiores concentrações de artepelin C encontrados em um produto natural foram verificadas na própolis verde produzida no Sul e Sudeste do Brasil, cuja fonte é *Baccharis dracunculifolia* (RODRIGUES et al., 2017). Esse composto é considerado um excelente eliminador de radicais livres (RESENDE et al., 2012).

O artepelin C pode ter sido um dos principais responsáveis pela atividade antioxidante verificada no EEP desse estudo, no entanto, além do artepelin C, os compostos verificados na análise de CLAE como ácido cafeico e derivados, aromadendrina-4'-metil éter e a bacarina também possuem atividade antioxidante comprovada e podem também ter sido responsáveis pela atividade antioxidante do extrato. Desta forma, mais estudos devem ser realizados para entender se esta atividade ocorre principalmente devido à presença de uma única substância ou uma combinação de compostos.

4.4. CONCLUSÃO

O extrato etanólico da própolis (EEP) verde do estado de Minas Gerais exerceu atividade antioxidante e antimicrobiana bactericida e bacteriostática contra os microrganismos *Staphylococcus aureus* (Gram-positivo) e *Escherichia coli* (Gram-negativo), sendo que o microrganismo Gram-positivo foi mais susceptível ao EEP.

O teor obtido de compostos fenólicos e flavonoides pelos métodos espectrofotométricos foi inferior quando comparados com o ensaio de CLAE.

Dentre os compostos identificados e quantificados pela análise de CLAE, o artepelin C se destacou representando cerca de $10,957 \text{ mg mL}^{-1}$. E pode ser considerado como um dos principais responsáveis pela atividade antioxidante e antimicrobiana verificada no EEP. Estudos complementares devem ser realizados para entender se essas atividades ocorrem pela presença dessa substância ou a combinação de outros compostos.

Os resultados demonstraram que a própolis estudada possui potencial para ser utilizada para melhorar a saúde humana e a segurança alimentar, por conter moléculas valiosas com propriedades biológicas comprovadas.

4.5. REFERÊNCIAS

ABDEL-WAHAB, M.H.; MA EL-MAHDY, M.A.; ABD-ELLAH, M.F.; HELAL, G.K.; KHALIFA, F.; HAMADA, F.M.A. Influence of p-coumaric acid on doxorubicin-induced oxidative stress in rat's heart. **Pharmacological Research**, v.48, n.5, p.461-465, 2003.

AL-DUAIS, M.; MULLER, L.; BOHM, V.; JETSCHKE, G. Antioxidant capacity and total phenolics of *Cyphostemma digitatum* before and after processing: use of different assays. **European of Food Research and Technology**, v. 228, p. 813-821, 2009.

ALENCAR, S. M.; OLDONI, T. L. C.; CASTRO, M. L.; CABRAL, I. S. R.; COSTA-NETO, C. M.; CURY, J. A.; ROSALEN, P. L.; IKEGAKI, M. (2007). Chemical composition and biological activity of a new type of Brazilian propolis: red propolis. **Journal of Ethnopharmacology**, v.113, n.2, p. 278-283, 2007.

ALMEIDA, E.T.C.; SILVA, M.C.D.; OLIVEIRA, J.M.S.; KAMIYA, R.U.; ARRUDA, R.E.S.; VIEIRA, D.A.; SILVA, V.C. Chemical and microbiological characterization of tinctures and microcapsules loaded with Brazilian red propolis extract. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, 2017. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpha.2017.03.004>.

AKAO, Y.; MARUYAMA, H.; MATSUMOTO, K.; OHGUCHI, K.; NISHIZAWA, K.; SAKAMOTO, T.; ARAKI, Y.; MISHIMA, S.; NOZAWA, Y. Cell growth inhibitory effect of cinnamic acid derivatives from propolis on human tumor cell lines. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v.26, n.7, p. 1057-1059, 2003.

BANKOVA, V.; CHRISTOV R, KUJUMGIEV, A.; MARCUCCI, M.C.; POPOV, S. Chemical composition and antibacterial activity of Brazilian propolis. **Z. Naturforsch. C**, v.50, n.3/4, p.167-172, 1995.

BANKOVA, V.S.; DE CASTRO, S.L.; MARCUCCI, M.C. Própolis: avanços recentes em química e origem vegetal. **Apidologie**, v.31, p 3-15, 2000.

BANKOVA, V.; Chemical diversity of propolis and the problem of standardization. **Journal of Ethnopharmacology**, v.100, n.1-2, p. 114-117, 2005.

BANKOVA V, GALABOV AS, ANTONOVA D, VILHELMOVA N, DI PERRI B. Chemical composition of Propolis Extract ACF® and activity against herpes simplex virus. **Phytomedicine**, v. 21, n.1, p.1432–1438, 2014.

BITTENCOURT, M.L.F., RIBEIRO, P.R.; FRANCO, R.L.P.; HILHORST, H.W.M.; CASTRO, R.D; FERNANDEZ, L.G. Metabolite profiling, antioxidant and antibacterial activities of Brazilian propolis: use of correlation and multivariate analyses to identify potential bioactive compounds. **Food Research International**, v. 76, p. 449-457, 2015.

BODINI, RB. SOBRAL, PJA. FAVARO-TRINDADE, CS. CARVALHO, RA. Properties of gelatin-based films with added ethanol–propolis extract. **LWT - Food Science and Technology**, V. 51, n. 1, p. 104-110, 2013.

BÚFALO, M.C.; FERREIRA, I.; COSTA, G.; FRANCISCO,V.; LIBERAL,J.; CRUZ,M.T.; LOPES,M.C.; BATISTA,M.T.; SFORCIN, J.M. Propolis and its constituent caffeic acid suppress LPS-stimulated pro-inflammatory response by blocking NF- κ B and MAPK activation in macrophages. **Journal of Ethnopharmacology**, v.149, n.1, p. 84-92, 2013.

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

CARVALHO, A.A.; FINGER, D.; MACHADO, C.S.; SCHMIDT, E.M.; DA COSTA, P.M.; ALVES, A.P.N.N.; MORAIS, T.M.F.; DE QUEIROZ, M.G.R.; QUINÁIA, S.P.; DA ROSA, M.R.; DOS SANTOS, J.M.T.; PESSOA, C.; DE MORAES, M.O.; COSTA-LOTUFO, L.V.; SAWAYA, A.C.H.F.; EBERLIN, M.N.; TORRES, Y.R. In vivo antitumoural activity and composition of an oil extract of Brazilian própolis. **Food Chemistry**, v.26, n.3, p. 1239–1245, 2011.

CASTRO, C.; MURA, F.; VALENZUELA, G.; FIGUEROA, C.; SALINAS, R.; ZUÑIGA, M.C.; TORRES, J.L.; FUGUET, E.; DELPORTE, C. Identification of phenolic compounds by HPLC–ESI-MS/MS and antioxidant activity from Chilean propolis. **Food Research International**, v. 64, p. 873–879, 2014.

CANÇÃO, K.; AN, S.M.; KOH, J-S.; BOO, Y.C. Comparison of the antimelanogenic effects of p-coumaric acid and its methyl ester and their skin permeabilities. **Journal of Dermatological Science**, v. 63, n. 1, p. 17-22, 2011.

CHEUNG, K-W.; SZE, D.M-Y.; CHAM, W.K.; DENG, R-X.; TU, W.; CHAN, G.C-F. Brazilian green propolis and its constituent, Artepillin C inhibits allogeneic activated human CD4 T cells expansion and activation. **Journal Ethnopharmacol**, v.138, n.2, p. 463–471, 2011.

D'ALMEIDA, R.E.; ALBERTO, M.R.; QUISPE, C.; SCHMEDA-HIRSCHMANN, G.; ISLA, M.I. Antimicrobial phenylpropanoids from the Argentinean highland plant *Parastrephia lucida* (Meyen) Cabrera. **Journal of Ethnopharmacology**, v.142, n.2, p.407-414, 2012.

DOBROWOLSKI, J.W.; VOHORA, S.B.; SHARMA, K.; SHAH, S.A.; NAQVI, S.A.H.; DANDIYA, P.C. Antibacterial, antifungal, antiamebic, antiinflammatory and antipyretic studies on propolis bee products. **Journal of Ethnopharmacology**, v.35, n.1, p.77-82, 1991.

FIGUEIREDO-RINHEL, A.S.G.; KABEYA, L.M.; BUENO, P.C.P.; JORGE-TIOSSI, R.F.; AZZOLIN, A.E.C.S.; BASTOS, J.K.; LUCISANO-VALIM, Y.M. Inhibition of the human neutrophil oxidative metabolism by *Baccharis dracunculifolia* DC (Asteraceae) is influenced by seasonality and the ratio of caffeic acid to other phenolic compounds. **Journal of Ethnopharmacology**, v.150, n.2, p.665-664, 2013.

FUNARI, C.S.; FERRO, V.O.; MATHOR, M.B. Analysis of propolis from *Baccharis dracunculifolia* DC. (Compositae) and its effects on mouse fibroblasts. **Journal of Ethnopharmacology**, v.111, n.2, p.2016-212, 2007.

KUMAZAWA, S.; YONEDA, M.; SHIBATA, I.; KANEDA, J.; HAMASAKA, T.; NAKAYAMA, T. Direct evidence for the plant origin of Brazilian propolis by the observation of honey bee behavior and phytochemical analysis. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v.51, p. 740–742, 2003.

KUMAZAWA, S.; HAMASAKA, T.; NAKAYAMA, T. Antioxidant activity of propolis of various Geographic origins. **Food Chemistry**, v.84, n.3, p.329-339, 2004.

MACHADO, B.A.S.; SILVA, R.P.D.; BARRETO, G.A.; COSTA, S.S.; SILVA, D.F; et al. Chemical Composition and Biological Activity of Extracts Obtained by Supercritical Extraction and Ethanolic Extraction of Brown, Green and Red Propolis Derived from Different Geographic Regions in Brazil. **PLOS ONE**, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0145954>.

MARCUCCI, M.C.; BANKOVA, V. Chemical composition, plant origin and biological activity of Brazilian própolis. **Current Topics in Phytochemistry**, v.2, p. 115–123, 1999.

MARCUCCI, M.C., FERRERES, F., CUSTODIO, A.R.; FERREIRA, M.M., BANKOVA, V.S., GARCIA-VIGUEIRA, C., BRETZ, W.A. Evaluation of phenolic compounds in Brazilian própolis from diferente geographic regions. **Zeitschrift für Naturforschung**, v. 55, p.76-81, 2000.

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

MISHIMA, S.; NARITA, Y.; CHIKAMATSU, S.; INOH, Y.; OHTA, S.; YOSHIDA, C.; ARAKI, Y.; AKAO, Y.; SUZUKI, K-M.; NOZAWA, Y. Effects of propolis on cell growth and gene expression in HL-60 cells. **Journal Ethnopharmacol**, v.99, n.1, p.5–11, 2005.

NAKAJIMA, Y.; TSURUMA, K.; SHIMAZAWA, M.; MISHIMA, S.; HARA, H. Comparison of bee products based on assays of antioxidant capacities. **BCM**

Complementary and Alternative Medicine, v.9, p. 4, 2009.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1186/1472-6882-9-4>.

NAKASHIMA, K-I.; MURAKAMI, T.; TANABE, H.; INOUE, M. Identification of a naturally occurring retinoid X receptor agonist from Brazilian green propolis. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, v.1840, n.10, p. 3034–3041, 2014.

National Committee for Clinical Laboratory Standards – CLSI, 2003. Manual Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standards 6. ed. Document M7-A6 performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.

NETO, M.S.R.; TINTINO, S.R.; SILVA, A.R.P.; COSTA, M.S.; BOLIGON, A.A.; MATIAS, E.F.F.; BALBINO, V.Q.; MENEZES, I.R.A.; COUTINHO, H.D.M. Seasonal variation of Brazilian red propolis: Antibacterial activity, synergistic effect and phytochemical screening. **Food and Chemical Toxicology**, 2017. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2017.03.052>

NORI, M.P.; FAVARO-TRINDADE, C.S.; ALENCAR, S.M.; THOMAZINI, M.; DE CAMARGO BALIEIRO, J.C.; CASTILLO, C.J.C. Microencapsulation of propolis extract by complex coacervation. **LWT-Food Science and Technology**, v.44, n.2, p. 429–435, 2011.

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

PARK, Y.K.; PAREDES-GUZMAN, J.F.; AGUIAR, C.L.; ALENCAR, S.M.; FUJIWARA, F.Y. Chemical constituents in *Baccharis dracunculifolia* as the main botanical origin of the southeastern Brazilian propolis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 1100–1103, 2004.

PENG, W.; WU, J-G.; JIANG, Y-B.; LIU, Y-J.; SUN, T.; NA WU, N.; CHUN-JIE WU, C-J. Antitumor activity of 4-O-(2''-O-acetyl-6''-O-p-coumaroyl- β -d-glucopyranosyl)-p-coumaric acid against lung cancers via mitochondrial-mediated apoptosis. **Chemico-Biological Interactions**. Chemico-Biological Interactions, v. 233, p. 8-13, 2015.

POPOVA, M.P.; CHINOU, I.B.; MAREKOV, I.N., BANKOVA, V.S. Terpenes with antimicrobial activity from Cretan propolis. **Phytochemistry**, v.70, n.10, p. 1262–1271, 2009.

PROESTOS, C.; BOZIARIS, I.S.; NYCHAS, G.J.E.; KOMAITIS, M. Analysis of flavonoids and phenolic acids in Greek aromatic plants: Investigation of their antioxidant capacity and antimicrobial activity. **Food Chemistry**, v. 95, n.4, p. 664–671, 2006.

RESENDE, F.A.; MUNARI,C.C.; MONTEIRO NETO, M.A.B.; TAVARES, D.C.; BASTOS,J.K.; SILVA FILHO, A.A; VARANDA, E.A. Comparative Studies of the (Anti) Mutagenicity of Baccharis dracunculifolia and Artepillin C by the Bacterial Reverse Mutation Test. **Molecules**, v.17, p.2335-2350, 2012.

RODRIGUES, C.R.F.; PLENTZ, L.C.; FLORES, M.A.; DIHL, R.R.; LEHMAN, M. Assessment of genotoxic and antigenotoxic activities of artepillin C in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. **Food and Chemical Toxicology**, v. 101, p. 48-54, 2017.

SALATINO, A., FERNANDES-SILVA, C.C., RIGHI, A.A., SALATINO, M.L.F. Propolis research and the chemistry of plant products. **Natural Product Reports**, v.28, p. 925–936, 2011.

SHIMIZU, K.; ASHIDA, H.; MATSUURA, Y.; KANAZAWA, K. Antioxidative bioavailability of artepillin C in Brazilian propolis. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 424, n.2, p. 181–188, 2004.

SFORCIN, J.M.; FERNANDES Jr, A.; LOPES, C.A.M.; BANKOVA, V.; FURANI,

S.R.C. Seasonal effect on Brazilian propolis antibacterial activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v.73, n.1, p.243-249, 2000.

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

SILVA, J.F.M.; SOUZA, M.C.; MATTA, S.R.; ANDRADE, M.R.; VIDAL F.V.N. Correlation analysis between phenolic levels of Brazilian propolis extracts and their antimicrobial and antioxidant activities. *Food Chemistry*, v. 99, n.3, pp. 431-435, 2006.

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**, v. 99, n.1, p.69-73, 2005.

SIMÕES, L.M.C.; GREGÓRIO, L.E.; DA SILVA FILHO, A.A.; DE SOUZA, M.L.; AZZOLINI, A.E.C.S.; BASTOS, J.K.; LUCISANO-VALIM, Y.M. Effect of Brazilian green propolis on the production of reactive oxygen species by stimulated neutrophils. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 94, n.1, p. 59–65, 2004.

SIMÕES-AMBROSIO, L.M.C.; GREGÓRIO, L.E.; SOUSA, J.P.B.; FIGUEIREDO-RINHEL, A.S.G.; AZZOLINI, A.E.C.S.; BASTOS, J.K.; YM LUCISANO-VALIM, Y.M. The role of seasonality on the inhibitory effect of Brazilian green propolis on the oxidative metabolism of neutrophils. *Fitoterapia*, v.81, n.8, p. 1102–1108, 2010.

TANI, H.; HASUMI, K.; TATEFUJI, T.; HASHIMOTO, K.; KOSHINO, H.; TAKAHASHI, S. Inhibitory activity of Brazilian green propolis components and their derivatives on the release of cys-leukotrienes. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v.18, n.1, p. 151–157, 2010.

TAZAWA, S.; WARASHINA, T.; NORO T. Studies on the constituents of Brazilian própolis. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**. v. 47, p. 1388–1392, 1999.

TIVERON, A.P.; ROSALEN, P.L.; FRANCHIN, M.; LACERDA, R.C.C.; et al.

Chemical Characterization and Antioxidant, Antimicrobial, and Anti-Inflammatory Activities of South Brazilian Organic Propolis. **PLoS One**, 2016. DOI:<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0165588>.

WANG,K.; HU, L.; JIN, X-L.; MA, Q-X.; MARCUCCI, M.C.; NETTO, A.A.L.; SAWAYA, A.C.H.F.; HUANG, S.; REN, W-K. Polyphenol-rich propolis extracts from China and Brazil exert anti-inflammatory effects by modulating ubiquitination of TRAF6 during the activation of NF-Kb. **Journal of Functional Foods**, v.19, p. 464–478, 2015.

XUAN, H.; ZHAO, J.; MIAO, J.; LI, Y.; CHU, Y.; HU, F. Effect of Brazilian propolis on human umbilical vein endothelial cell apoptosis. **Food and Chemical Toxicology**, v.49, n.1, p.78-85, 2011.

ZABAIYOU, N.; FOUACHE,A.; TROUSSON, A.; BARON, S.; ZELLAGUI, A.; LAHOUEL, M.; LOBACCARO, J-M.A. Biological properties of propolis extracts Something new from an ancient product. **Chemistry and Physics of Lipids**. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2017.04.005>

5. CAPÍTULO II

Biopolímeros à Base de Amido Incorporados com Extrato Etanólico de Própolis

CUNHA, GIANA. FERREIRA. Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano – *Campus* Rio Verde – GO, agosto de 2017. **Filmes de Amido de Mandioca Incorporados com Extrato Etanólico de Própolis**. Orientadora: Dra Geovana Rocha Plácido. Coorientador: Dr. Celso Martins Belisário.

RESUMO

Foram desenvolvidos filmes de amido de mandioca incorporados com extrato etanólico de Própolis EEP nas concentrações de 0, 30 e 60 g /100g de amido a fim de se propor uma tecnologia de elaboração de embalagem bioativa com propriedades antioxidantes para aplicação em alimentos. O efeito da adição de EEP nas diferentes concentrações foi avaliado nas propriedades mecânicas (resistência à tração, elasticidade e alongamento) microscopia eletrônica de varredura, teor de compostos fenólicos e atividade antioxidante pelos métodos Folin-Ciocalteu e ABTS respectivamente. Os filmes apresentaram melhoria na flexibilidade, extensibilidade e diminuição na resistência mecânica causada pelo efeito plástico do EEP no polímero. A compatibilidade de compostos presentes no EEP com o amido pôde ser identificada através da microscopia eletrônica de varredura. Os filmes apresentaram compostos fenólicos e atividade antioxidante na matriz polimérica, demonstrando que as películas possuem potencial para contribuir com a redução da quantidade de antioxidantes sintéticos utilizados para conservação de alimentos.

Palavras-chave: polímero, embalagem bioativa, flexibilidade, extensibilidade, atividade antioxidante, conservação de alimentos.

Cassava Starch Films Incorporated with Ethanol Extract from Propolis

CUNHA, GIANA. FERREIRA. Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano (Goiano Federal Institute of Science, Education, and Technology) – Rio Verde *Campus* – Goiás State (GO), Brazil, August 2017. **Cassava Starch Films Incorporated with Ethanol Extract from Propolis**. Advisor: Dra. Plácido, Geovana Rocha. Co-advisor: Dr. Belisário, Celso Martins.

ABSTRACT

Cassava starch films with ethanolic extract of Propolis EEP were developed in the concentrations of 0, 30 and 60 g 100⁻¹ g of starch in order to propose a technology for the elaboration of bioactive packaging with antioxidant properties for food application. The effect of EEP addition of at different concentrations was evaluated in the mechanical properties (tensile strength, elasticity and elongation) scanning electron microscopy, phenolic compound content and antioxidant activity by the Folin-Ciocalteu and ABTS methods respectively. The films showed improvement in the flexibility and extensibility and decrease in the mechanical resistance caused by the plastic EEP effect on the polymer. The compatibility of compounds present in the EEP with the starch could be identified by scanning electron microscopy. The films presented phenolic compounds and antioxidant activity in the polymer matrix, demonstrating that the films have the potential to contribute to decrease the amount of synthetic antioxidants used for food preservation.

Key words: polymer, bioactive packaging, flexibility, extensibility, antioxidant activity, food preservation.

5.1. INTRODUÇÃO

O acúmulo de resíduos de plásticos sintéticos no meio ambiente tem impulsionado as pesquisas atuais na elaboração de materiais de embalagens biodegradáveis como estratégia ambientalmente amigável. Entretanto, o uso de materiais biodegradáveis para a produção de plásticos só se torna viável se forem

financeiramente e funcionalmente atrativos, quando comparados aos materiais sintéticos. Matérias-primas como subprodutos agroindustriais podem ser utilizadas para a produção de biopolímeros e esses ainda podem ser adicionados de compostos bioativos, permitindo a elaboração de filmes biodegradáveis bioativos que oferecem benefícios extras em relação aos materiais convencionais (MANIGLIA et al., 2017 e MORENO et al., 2017).

O amido tem sido considerado uma matéria-prima ideal para a produção de polímeros biodegradáveis e utilização como embalagem e revestimento de produtos alimentares devido à sua capacidade de formar uma matriz contínua, sua baixa permeabilidade ao oxigênio, sua disponibilidade cíclica, baixo custo, além de ser inofensivo para o meio ambiente e metabolizado rapidamente por microrganismos presentes no solo quando dispostos no meio ambiente (MUKURUMBIRA et al., 2017 e COLUSSE et al., 2017; LIU et al., 2017).

A própolis, substância resinosa natural colhida pelas abelhas a partir das árvores, composta de resina (50%), que contém flavonoides e ácidos fenólicos; cera (30%); óleos essenciais (10%); pólen (5%) e outros compostos orgânicos (5%) como Fe e Zn, vitaminas (B 1, B 2, B 3 e B 6), ácido benzoico, ácidos graxos, ésteres, cetonas, lactonas, quinonas, esteroides e açúcares, e pigmentos naturais, tais como clorofila e carotenoides (PASTOR et al., 2010). Possui atividades antibacteriana, antifúngica, anticancerígena, anti-inflamatória, antioxidante, antiviral, anestésica, imunoestimulante e efeito citostático (YONAR et al., 2011).

Pesquisas que envolvam filmes de amido adicionados com extrato etanólico de própolis (EEP) como fonte de agentes bioativos com propriedades antioxidantes, ainda são escassas na literatura, no entanto, o potencial antioxidante do extrato etanólico de própolis incorporado a filmes biodegradáveis tem mostrado que os estudos sobre a incorporação deste composto a biopolímeros devem ser desenvolvidos e incentivados (KECHICHIAN et al., 2010).

A adição de antioxidantes ao material de embalagens, que possa migrar da embalagem para o alimento, pode ser vista como vantagem quando comparada à adição direta aos alimentos. Isso porque permite que a vida útil do produto seja estendida, ao mesmo tempo que reduz a adição direta de aditivos químicos em produtos alimentares (CIANNAMEA et al., 2016).

A fim de se propor uma tecnologia de desenvolvimento de embalagens bioativas com efeito antioxidante para alimentos, que auxilie na inibição da oxidação

de produtos alimentícios e diminua os impactos ambientais causados pelos polímeros usuais utilizados na elaboração de embalagens, o objetivo desse estudo foi avaliar o efeito da incorporação de extrato etanólico de própolis verde (0, 30 e 60g 100g⁻¹ de amido) em filmes biodegradáveis de amido de mandioca e estudar as propriedades mecânicas, microestruturais, presença de compostos fenólicos e atividade antioxidante.

5.2.MATERIAL E MÉTODOS

Os ensaios de espessura e propriedades mecânicas foram realizados no Laboratório Multiusuário de Análises, da Escola de Agronomia, *Campus* Samambaia, LabMult – Universidade Federal de Goiás e a análise de Microestrutura no Laboratório Multiusuário de Microscopia de Alta Resolução, do Instituto de Física, *Campus* Samambaia, LabMic – Universidade Federal de Goiás. Os ensaios teor de compostos fenólicos e eliminação de radicais livres ABTS foram realizados no Laboratório de Bioquímica e Análise Instrumental do Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição – ESALQ/Universidade de São Paulo.

5.2.1. Preparo do extrato etanólico de própolis

A própolis foi coletada no Estado de Minas Gerais, cidade de Nepomuceno (21° 12' 17,79"S/45° 13' 17,2" W), e *Baccharis dracunculifolia* é a principal fonte vegetal. O extrato etanólico de própolis foi preparado de acordo com BODINI et al., (2013). Triturou-se 30g de resina de própolis e essa foi misturada a 100 mL de álcool etílico (80%). A mistura foi mantida aquecida a 50°C e agitada durante 30 minutos. A mistura foi resfriada e armazenada a 10°C durante 24 horas sendo então filtrada.

5.2.2. Preparo dos filmes

Os filmes foram produzidos de acordo com a técnica de casting (LÓPEZ et al., 2011). Previamente foram realizados testes para se definir a concentração da solução filmogênica de amido mais adequada testando-se as concentrações 2, 3 e 5g de amido de mandioca em 100 mL de água destilada. As soluções filmogênicas foram obtidas pela mistura de 3g de amido de mandioca em 100 mL de água destilada. Após

a dispersão completa, foi adicionado o plastificante glicerol na proporção de 20 g 100 g⁻¹ de amido. A solução resultante foi aquecida a 70°C até a dissolução do plastificante e formação de gel pelo amido. Após essa etapa a solução foi resfriada até 40°C e o extrato etanólico de própolis (EEP) foi então adicionado nas concentrações de 0, 30 e 60g 100g⁻¹ de amido. Para facilitar a dissolução do EEP, foi adicionado álcool etílico na proporção de 15 g 100g⁻¹ de amido e para eliminar as bolhas formadas a solução mantida em ultrassom por 20 minutos. As soluções foram depositadas em placas de polietileno de 15×15 cm² e secas em BOD a 40°C durante 30 horas para formação dos filmes.



Figura 1: Filmes de amido incorporados com 0, 30 e 60g de extrato etanólico de própolis 100g⁻¹ de amido (a) $C_{EEP} = 0$ 100g⁻¹ g de amido; (B) $C_{EEP} = 30$ g 100g⁻¹ de amido; (C) $C_{EEP} = 60$ g 100g⁻¹ de amido.

Fonte: Arquivo pessoal

5.2.3. Caracterização dos filmes

Para realizar a caracterização, as películas foram equilibradas a 23°C ± 2° e 50% ± 10° de umidade relativa em dissecadores durante 48 horas.

5.2.4. Determinação da espessura

A espessura dos filmes foi determinada como a média aritmética de medidas de pontos aleatórios das extremidades e centro, realizado com um micrômetro digital (resolução de 0,0001 mm, Mitutoyo) e valores médios foram utilizados nos cálculos.

5.2.5. Análise de microestrutura (MEV)

A análise de microestrutura eletrônica de varredura dos filmes foi determinada utilizando um microscópio eletrônico Jeol, JSM – 6610, equipado com EDS, Thermo scientific NSS Spectral Imaging com tensão de aceleração de 3 kV. Os filmes foram colocados em fita de carbono condutor e pulverizados com uma fina camada de ouro antes da realização das imagens.

5.2.6. Propriedades mecânicas

A resistência à tração (RT), alongamento até a ruptura (AR) e módulo de Young (MY) foram realizadas usando um analisador de textura Instron, 3367 (Grove City, USA) de acordo com norma ASTM D882-02 (ASTM, 2002). Os filmes foram cortados em tiras de 10 cm de comprimento e 1,5 cm de largura e acondicionados a 50% \pm 10 de UR a uma temperatura de 23°C \pm 2 durante 48 horas. A espessura das tiras foi obtida antes do teste. Foi utilizada uma célula de carga de 500 N. A força de tração foi registrada durante a extensão das tiras a 0,2 mm s⁻¹ até a ruptura. Os valores de resistência à tração (RT), alongamento até a ruptura (% A) e módulo de Young (MY) foram determinados a partir de curvas de tensão-deformação, estimadas a partir de dados de deformação da força. Foram executadas 10 repetições de cada amostra de teste.

5.2.7. Teor de compostos fenólicos

O ensaio de polifenóis foi realizado utilizando ácido gálico como padrão. Para a análise as películas foram preparadas (BODINI et al., 2013) previamente 11 mg de cada amostra de película foram solubilizadas em 6 mL de água destilada (50 °C, 50 min) com posterior adição de 4 mL de álcool etílico (80%). Mantendo-se a solução final aquecida a 50°C durante 10 min. Após este período a solução foi novamente agitada e resfriada à temperatura ambiente e reservada para posterior análise. As películas sobrenadantes foram então removidas e alíquotas de 0,5 mL das soluções foram transferidas para tubos de ensaio que receberam 2,5 mL do reagente Folin-Ciocalteu diluído em água destilada (1:10). Após agitação, os tubos foram deixados em repouso por 5 min e 2,0 mL de solução de carbonato de sódio (4%) foram adicionados. Os tubos foram deixados em

repouso, ao abrigo da luz, durante 2 horas. A absorbância foi medida a 740 nm em leitora de 96 microplacas (SpectraMax M3, Molecular Devices), o ensaio foi realizado conforme metodologia descrita por AL-DUAIS et al. (2009). Todos os testes foram realizados em triplicata e os resultados da concentração de polifenóis foram expressos em mg de ácido gálico g^{-1} (mg GAE g^{-1}) de filme.

5.2.8. Atividade de eliminação de radicais ABTS

Para a análise da atividade de eliminação de radical ABTS as películas foram preparadas (BODINI et al., 2013) previamente pesando-se 11 mg de cada amostra e solubilizadas em 6 mL de água destilada (50°C, 50 min) com posterior adição de 4 mL de álcool etílico (80 mL 100 mL⁻¹ de solução) para favorecer a extração dos compostos antioxidantes. Mantendo-se a solução final durante 10 min a 50°C. As películas sobrenadantes foram então removidas e a solução reservada para análise.

O ensaio de atividade de eliminação de radical ABTS, que se baseia na redução do cátion 2,2-azinobis - (3-etilbenzotiazolin-6-ácido sulfônico), foi realizado conforme metodologia descrita por AL-DUAIS et al. (2009). O radical ABTS $\cdot+$ foi formado pela reação de 140 mM de persulfato de potássio com 7 mM de ABTS e, armazenado no escuro sob a temperatura ambiente, por 16 horas. Uma vez formado, o radical foi diluído em tampão fosfato de potássio 7,5 mM (pH= 7,4) até a obtenção do valor de absorbância de 0,700 + 0,020 nm em comprimento de onda de 734 nm, a absorbância foi feita em leitora de 96 microplacas (SpectraMax M3, Molecular Devices). Em ambiente escuro, foram adicionados às microplacas, alíquotas de 20 μ L de cada solução das amostras e adicionou-se 220 μ L de solução do radical ABTS $\cdot+$. As absorbâncias foram medidas a 734 nm, após 6 minutos de reação, utilizando tampão fosfato de potássio 7,5 mM (pH= 7,4) como branco. Como referência, utilizou-se o Ácido Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcorman-2-carboxílico), um antioxidante sintético análogo a vitamina E, nas concentrações de 12,5M a 200 μ M. Todos os testes foram realizados em triplicata. Os resultados foram expressos em μ mol de Trolox g^{-1} de filme (ET) (atividade antioxidante = capacidade antioxidante equivalente de Trolox).

5.2.9. Análise estatística

A análise estatística foi realizada com o programa SISVAR (versão 5.6). Os dados

foram submetidos ao teste de Tukey ($p < 0,05$).

5.3.RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.3.1. Análise de microestrutura

As micrografias de superfície dos filmes (Figura 2) revelaram a presença de partículas insolúveis dispersas, tanto no filme controle como nos demais tratamentos, caracterizados pela presença de amido residual dispersos na matriz da película, revelando que não houve completa dissolução das moléculas de amido durante o processo. No entanto, a quantidade de grânulos de amidos não fundidos na superfície das películas que tiveram a adição de EEP diminuiu quando comparada à película controle e o aumento da concentração de EEP diminuiu o número de partículas não solubilizadas.

A adição de EEP à matriz polimérica conferiu maior homogeneidade aos filmes. A presença de grupos hidroxilas no EEP conferidos pelos compostos fenólicos pode ter contribuído para melhorar a homogeneidade das películas. Compostos fenólicos são caracterizados pela presença de pelo menos um grupo hidroxila ligados diretamente ao anel aromático (SHAHIDI et al., 1992). Esses grupos hidroxila podem formar ligações de hidrogênio com grupos hidroxila presentes no amido, e conseqüentemente, reduzir as interações intermoleculares e emaranhados entre as cadeias poliméricas melhorando a homogeneidade da película (ZHAI et al., 2017). O aumento da concentração de EEP também tornou a película menos áspera refletindo a compatibilidade de compostos presentes no EEP com o amido.

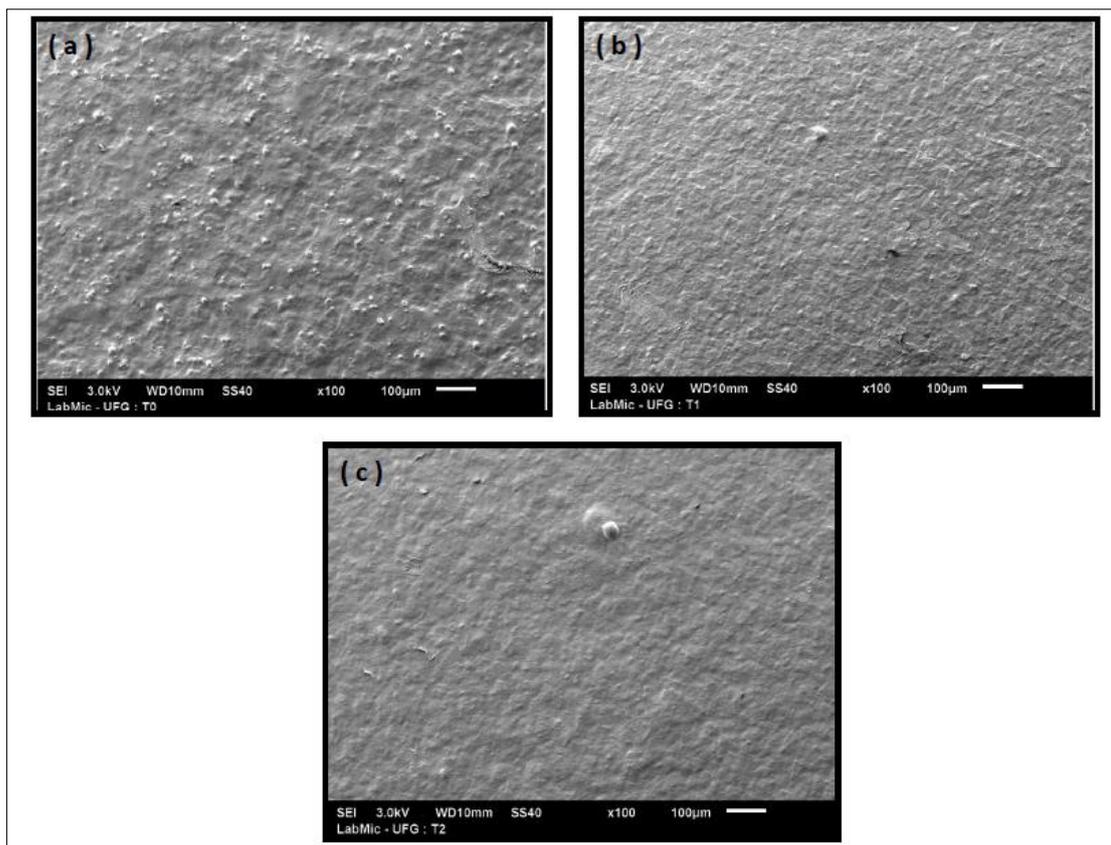


Figura 2: Micrografias de superfície de filmes de amido incorporados com 0, 30 e 60g de extrato etanólico de própolis 100g^{-1} de amido (a) $C_{\text{EEP}} = 0 \text{ g } 100\text{g}^{-1}$ de amido; Imagem de superfície; (B) $C_{\text{EEP}} = 30 \text{ g } 100\text{g}^{-1}$ de amido; Imagem de superfície; (C) $C_{\text{EEP}} = 60 \text{ g } 100\text{g}^{-1}$ de amido; Imagem de superfície.

5.3.2. Espessura e propriedades mecânicas

Não houve diferença na espessura dos filmes em função da adição e aumento da concentração de EEP quando comparada aos filmes controle, e indica que a quantidade de extrato utilizada não alterou a quantidade de sólidos nas soluções filmogênicas e o controle da espessura em função da relação de massa de solução filmogênica/placa foi eficiente para todos os tratamentos.

Os resultados dos ensaios mecânicos como a resistência máxima à tração (RT), o alongamento até a ruptura (%A) e o módulo de Young (MY) para filmes de amido de mandioca incorporados com EEP são mostrados na Tabela 1.

Os ensaios de MEV demonstraram que adição de EEP aumentou a homogeneidade da matriz. Desta forma, esperava-se aumento da resistência mecânica

das películas uma vez que uma matriz mais homogênea resulta em filmes mecanicamente mais resistentes (MANIGLIA et al., 2017). No entanto, a resistência máxima à tração dos filmes diminuiu em função da adição de EEP (Tabela 1). O alongamento até a ruptura aumentou em função da adição e aumento da concentração de EEP quando comparados aos filmes controle e o módulo de Yong diminuiu em função da adição e aumento da concentração de EEP resultando em películas mais flexíveis.

Tabela 1. Concentração de extrato etanólico de própolis (C_{CEE}), espessura, resistência à tração (RT), alongamento até a ruptura (AR) e módulo de yong (MY) de filmes de amido incorporados com extrato etanólico de própolis.

C_{CEE} EEP 100 g ⁻¹ amido	Espessura (mm)	RT (MPa)	AR (%)	MY (MPa)
0	0,072 a	13,66 a	1,61 c	1196,21 a
30	0,071 a	6,47 b	20,58 b	471,94 b
60	0,070 a	4,55 b	28,39 a	277,41c
CV (%)	8,360	12,190	15,280	11,740

Médias seguidas de letras diferentes minúsculas na mesma coluna indicam diferenças pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

A incorporação de EEP aos filmes de amido (30 e 60%) nesse estudo aumentou a flexibilidade, elasticidade e a capacidade de o alongamento das películas, mas diminuiu a resistência mecânica.

Os filmes desenvolvidos nesse estudo para as aplicações como empacotamento ou coberturas de bandejas de armazenamento de alimentos ou afins, poderiam ser bem vistos, já que, em aplicações como as citadas, maior capacidade de alongamento pode

ser vista como vantagem. Embora a elevada resistência à tração em materiais de embalagens seja apreciada, por permitir que os materiais de embalagem tolerem o estresse típico encontrado durante o manuseio e transporte de alimentos, os valores de deformação devem ser ajustados de acordo com a aplicação pretendida dos filmes (MUKURUMBIRA et al., 2017; REN et al., 2017).

Os resultados desse estudo foram opostos ao de SIRIPATRAWAN et al. (2016) que verificaram que a resistência à tração aumentou com a adição de EEP à matriz polimérica de quitosana nas concentrações de 5 a 20%.

No entanto, esses resultados estão de acordo com o estudo de CHANG-BRAVO et al. (2014) que verificaram que a adição de extrato etanólico de própolis vermelha em diferentes concentrações à matriz polimérica de carragena e amido de milho, resultou em menores valores de resistência à tração e maior porcentagem de alongamento quando comparado ao tratamento controle. Os autores atribuíram tal comportamento a forte interação entre o EEP e à matriz polimérica de carragena e amido.

O EEP adicionado à matriz polimérica pode ter tido um comportamento plastificante, os compostos (ácidos fenólicos e seus ésteres) que possuem características polares podem ter formado interações moleculares com os grupos hidroxilas das moléculas de amido substituindo as interações que antes se formavam apenas entre as moléculas de amido.

Já que a adição de plastificantes como o glicerol à matriz polimérica também resulta em maiores valores de alongamento, porque esses compostos são capazes de diminuir as interações intermoleculares aumentando a mobilidade da cadeia dos biopolímeros e conseqüentemente melhorando a flexibilidade e capacidade de alongamento das películas, através da formação de ligações de hidrogênio com o amido durante o processo de plastificação (CHAMBI et al., 2006; YANG et al., 2017). Uma estrutura de filmes menos densa formada pelo aumento de volume livre entre os polímeros resulta em menor resistência à tração e maior flexibilidade (SABERI et al., 2017).

Os filmes de amido de mandioca adicionados à EEP nas concentrações de 30 e 60 g EEP 100g⁻¹ comportaram-se mecanicamente como filmes com elevada quantidade de plastificantes (menor resistência à tração e maior capacidade de alongamento) quando comparado ao estudo de RODRÍGUEZ et al. (2006) que testaram a adição de diferentes concentrações do plastificante glicerol a filmes de amido e o efeito nas

propriedades mecânicas dos mesmos. Os autores demonstraram que à medida que o teor de glicerol adicionado aos filmes de amido foi aumentado, os filmes com maiores teores de plastificantes, resultaram em filmes com menor resistência à tração e maior capacidade de alongamento.

Os resultados desse estudo podem estar relacionados à quantidade de EEP adicionados à matriz polimérica que pode ser ajustada em estudos complementares, de acordo com a pretensão de utilização dos filmes já que do ponto de vista industrial, diferentes aplicações podem ser encontradas para cada tipo de filme.

5.3.3. Teor fenólico total e atividade antioxidante

O ensaio de fenólicos totais e atividade antioxidante (ABTS) das películas revelaram que as películas adicionadas a EEP apresentaram polifenóis na matriz polimérica e atividade antioxidante quando comparadas ao tratamento controle (Tabela 2).

Tabela 2. Concentração de extrato etanólico de própolis (C_{CEE}), teor fenólico e atividade antioxidante (ABTS) dos filmes.

C_{CEE} EEP 100 g ⁻¹ amido	ABTS ($\mu\text{mol TE g}^{-1}$ de filme)	Teor Fenólico (mg GAE g ¹ de filme)
0	0 c	0 b
30	38,183 b	4,183 a
60	44,070 a	5,525 a
CV (%)	20,860	14,080

* Valor TE expresso como μmol de Trolox com a capacidade antioxidante equivalente a um grama da amostra de teste ($\mu\text{mol de TE g}^{-1}$ de filme).

Médias seguidas de letras diferentes minúsculas na mesma coluna indicam diferenças pelo teste de Tukey ($p < 0,05$)

A capacidade antioxidante aumentou com o aumento da concentração de EEP. Já a quantidade de compostos fenólicos totais presentes não apresentou aumento com o aumento da concentração de EEP. Embora o teor de compostos fenólicos se relacione intimamente com a capacidade antioxidante (BITTENCOURT et al., 2015), MACHADO et al. (2016) demonstraram que a concentração total de compostos fenólicos ou flavonoides não é o único fator responsável pelas propriedades antioxidantes de extratos de própolis. A natureza química dos compostos fenólicos e presença de outros compostos podem contribuir para a atividade antioxidante total dos extratos.

SIMÕES et al. (2004), investigaram a atividade antioxidante da própolis verde e sua capacidade de sequestrar espécies reativas de oxigênio e observaram uma correlação entre a atividade antioxidante e a composição química de frações de diferentes extratos de própolis verde, e atribuíram essa atividade à presença de flavonoides e derivados de ácido *p*-cumárico. A própolis verde brasileira contém altos níveis de derivados de ácido *p*-cumárico (artepelin C e bacarina), ácido cafeico e ácidos cafeoilquínicos, ácidos cinâmicos e os flavonoides pinobanksina e kaempferol (MARCUCCI et al., 2000; SFORCIN e BANKOVA, 2011). Desta forma, esses compostos, podem ser os principais responsáveis pela atividade antioxidante verificada nos filmes de amido contendo EEP.

Compostos com capacidade antioxidante podem aumentar a vida de prateleira de produtos alimentícios, retardando o processo de peroxidação lipídica, um dos principais motivos para a deterioração dos produtos alimentares durante o processamento e o armazenamento (MOREIRA et al., 2008).

Devido às propriedades antioxidantes verificadas nas películas de amido incorporadas com EEP nesse estudo, espera-se que as películas auxiliem na inibição da reação prejudicial à oxidação lipídica que pode ocorrer em vários tipos de alimentos e desta forma, contribuam para diminuir a quantidade de antioxidantes sintéticos utilizados para conservação de alimentos.

5.4.CONCLUSÃO

A incorporação de EEP aos filmes de amido resultou em filmes mais homogêneos e menos ásperos, refletindo a compatibilidade de compostos presentes no EEP com o amido.

A adição de EEP aos filmes de amido diminuiu a resistência mecânica, porém melhorou a flexibilidade e extensibilidade das películas, indicando que a quantidade de EEP adicionado à matriz polimérica levou os filmes a se comportarem mecanicamente como filmes com grande quantidade de plastificante. No entanto, a quantidade de EEP pode ser ajustada em estudos complementares, de acordo com a pretensão de utilização dos filmes.

Os filmes apresentaram atividade antioxidante, demonstrando que as películas podem contribuir para diminuir a quantidade de antioxidantes sintéticos utilizados para conservação de alimentos, auxiliando na inibição da oxidação com potencial para uso em embalagens de alimentos ativos.

5.5.REFERÊNCIAS

AL-DUAIS, M.; MULLER, L.; BOHM, V.; JETSCHKE, G. Antioxidant capacity and total phenolics of *Cyphostemma digitatum* before and after processing: use of different assays. **European of Food Research and Technology**, v. 228, p. 813-821, 2009.

ASTM Standard D882-02. Standard test method for tensile properties of thin plastic sheeting Annual book of ASTM standards, **ASTM International**, West Conshohocken, PA (2002).

BITTENCOURT, M.L.F., RIBEIRO, P.R.; FRANCO, R.L.P.; HILHORST, H.W.M.; CASTRO, R.D; FERNANDEZ, L.G. Metabolite profiling, antioxidant and antibacterial activities of Brazilian propolis: use of correlation and multivariate analyses to identify potential bioactive compounds. **Food Research International**, v. 76, p. 449-457, 2015.

BODINI, RB . SOBRAL, PJA. FAVARO-TRINDADE, CS. CARVALHO, RA. Properties of gelatin-based films with added ethanol–propolis extract. **LWT - Food Science and Technology**, V. 51, n. 1, p. 104-110, 2013.

CHAMBI, H.; GROSSO, C. Edible films produced with gelatin and casein cross-linked with transglutaminase. **Food Research International**, v.39, n.4, p. 458-466, 2006.

CHANG-BRAVO, L.; LÓPEZ-CÓRDOBA, A.; MARTINO, M. Biopolymeric matrices made of carrageenan and corn starch for the antioxidant extracts delivery of Cuban red propolis and yerba mate. **Reactive and Functional Polymers**, La Habana, v.85, p. 11-19, 2014.

CIANNAMEA, E.M.; STEFANI, P.M.; RUSEACKAIT, R.A. Properties and antioxidant activity of soy protein concentrate films incorporated with red grape extract processed by casting and compression. **LWT - Food Science and Technology**, v.74, p.353-362, 2016.

COLUSSE, R.; PINTO, V.Z.; HALAI, S.L.M.; BIDUSKI, B. PRIETTO, L, et al. Acetylated rice starches films with different levels of amylose: Mechanical, water vapor barrier, thermal, and biodegradability properties. **Food Chemistry**, V.221, p.1614–1620, 2017.

KECHICHIAN, V.; DITCHFIELD, C.; VEIGA-SANTOS, P.; TADINI, C. C. Natural antimicrobial ingredients incorporated in biodegradable films based on cassava starch. **LWT - Food Science and Technology**, v. 73, p. 1088- 1094, 2010.

LIU, D.; DONG, Y.; BHATTACHARYYA, D.; SUI, G. Novel sandwiched structures in starch/cellulose nanowhiskers (CNWs) composite films. **Composites Communications**, v.4, p.5-9, 2017.

LÓPEZ, O. V.; LECOT, C. J.; ZARITZKY, N. E.; GARCÍA, M. A. Biodegradable packages development from starch based heat sealable films. **Journal of Food Engineering**, v. 105, n. 02, p. 254-263, 2011.

MACHADO, B.A.S.; SILVA, R.P.D.; BARRETO, G.A.; COSTA, S.S.; SILVA, D.F; et al. Chemical Composition and Biological Activity of Extracts Obtained by Supercritical Extraction and Ethanolic Extraction of Brown, Green and Red Propolis Derived from Different Geographic Regions in Brazil. **PLOS ONE**, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0145954>

MANIGLIA, B.C.; TESSARO, L.; LUCAS, A.A.; TAPIA-BLÁCIDO, D.R. Bioactive films based on babassu mesocarp flour and starch. **Food Hydrocolloids**, v.70, p. 383–391, 2017.

MARCUCCI, M.C., FERRERES, F., CUSTÓDIO, A.R., FERREIRA, M.M.C., BANKOVA, V.S., GARCÍA-VIGUERA, C., BRETZ, W.A. Evaluation of Phenolic Compounds in Brazilian Propolis from Different Geographic Regions, **Zeitschrift fur Naturforschung**, v.55C, p.76-81, 2000.

MOREIRA, L.; DIAS, L.G.; PEREIRA, J.A.; ESTEVINHO, L. Antioxidant properties, total phenols and pollen analysis of propolis samples from Portugal. **Food and Chemical Toxicology**, v.46, n.11, p. 3482-3485, 2008.

MORENO, O.; GIL, A.; ATARÉS, L.; CHIRALT, A. Active starch-gelatin films for shelf-life extension of marinated salmon, **LWT - Food Science and Technology**, v.84, p.189–195, 2017.

MUKURUMBIRA, A.R.; MELLEM, J.J.; AMONSOU, E.O. Effects of amadumbe starch nanocrystals on the physicochemical properties of starch biocomposite films. **Carbohydrate Polymers**, v.165, p.142–148, 2017.

PASTOR, C.; SÁNCHEZ-GONZÁLEZ, L.; CHÁFER, M.; CHIRALT, A. GONZÁLIZ-MARTÍNEZ, C. Physical and antifungal properties of hydroxypropylmethylcellulose based films containing propolis as affected by moisture content, **Carbohydrate Polymers**, v.82, n.4, p.1174-1183, 2010.

REN, L.; YAN, X.; ZHOU, J.; TONG, J.; SU, X. Influence of chitosan concentration on mechanical and barrier properties of corn starch/chitosan films. **International Journal of Biological Macromolecules**, 2017.

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.02.008>.

RODRÍGUEZ, M.; OSÉS, J.; ZIANI, K.; MATÉ, J.I. Combined effect of plasticizers and surfactants on the physical properties of starch based edible films. **Food Research International**, v.39, n.8, p.840-846, 2006.

SABERI, B.; CHOCKCHAIWASDEE, S.; GOLDING, J.; SCARLETT, C.; STATHOPOULOS, C. Physical and mechanical properties of a new edible film made of pea starch and guar gum as affected by glycols, sugars and polyols. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.104, p. 345–359, 2017.

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

SHAHIDI, F.; JANITHA, P.K.; WANASUNDARA, P. D. Phenolic antioxidants. **Critical Review in Food Science and Nutrition**, v.32, n.1, p.67-103, 1992.

SIRIPATRAWAN, U., VITCHAYAKITTI, W. Improving functional properties of chitosan films to be used as active food packaging by incorporation with propolis. **Food Hydrocolloids**, 2016. DOI <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.06.001>

SIMÕES, L.M.C.; GREGÓRIO, L.E.; DA SILVA FILHO, A.A.; DE SOUZA, M.L.; AZZOLINI, A.E.C.S.; BASTOS, J.K. ; LUCISANO-VALIM, Y.M. Effect of Brazilian green propolis on the production of reactive oxygen species by stimulated neutrophils, **Journal of Ethnopharmacology**, v. 94, p. 59-65, 2004.

YANG, J.; TANG, K.; QIN, G.; CHEN, T.; PENG,L.; et al. Hydrogen bonding energy determined by molecular dynamics simulation and correlation to properties of thermoplastic starch films. **Carbohydrate Polymers**, v.166, p. 256–263, 2017.

YONAR, M.E.; YONAR, S.M.; SILI,S. Protective effect of propolis against oxidative stress and immunosuppression induced by oxytetracycline in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, W.). **Fish & Shellfish Immunology**, v.31, n. 2, p. 318-325, 2011.

ZHAI, X.; SHI, J.; ZOU, X.; WANG, S.; JIANG, C.; et al. Novel colorimetric films based on starch/polyvinyl alcohol incorporated with roselle anthocyanins for fish freshness monitoring. **Food Hydrocolloids**, v.69, p.308–317, 2017.

6. CONCLUSÃO GERAL

O extrato etanólico de própolis (EEP) verde da região de Minas Gerais, Sudeste brasileiro estudado revelou ter grande valor biológico com potencial para ser utilizado para melhorar a saúde humana e em aplicações alimentícias pelas propriedades antioxidante, bactericida e bacteriostático contra microrganismos Gram-positivos e Gram-negativos. Além de ter revelado grande potencial para utilização como composto bioativo no desenvolvimento de embalagens ativas elaboradas com amido de mandioca.

Os filmes produzidos a partir de amido de mandioca incorporados com EEP mostraram ser compatíveis com compostos presentes no EEP e se comportaram mecanicamente como filmes com grande quantidade de plastificante (maior flexibilidade e extensibilidade), características que podem ser apreciadas em aplicações como empacotamento ou coberturas de bandejas de armazenamento de alimentos.

Os filmes revelaram potencial para uso em embalagens de alimentos ativos por apresentarem atividade antioxidante, demonstrando que podem contribuir para diminuir a quantidade de antioxidantes sintéticos utilizados para conservação de alimentos.