



Utilização de películas incorporadas com extrato de própolis na conservação de bifes de frango embalados a vácuo e refrigerados

Célio António Ramos Rodrigues

Dissertação apresentada à Escola Superior Agrária de Bragança para obtenção do Grau de Mestre em Qualidade e Segurança Alimentar

Orientado por:

Professora Doutora Maria Leticia Miranda Fernandes Estevinho

Doutora Vanessa Marina Branco Paula

**Bragança
2025**

Agradecimentos

Em primeiro lugar, gostaria de expressar a minha gratidão a Deus e ao universo, pela força, coragem e perseverança que me permitiram enfrentar os desafios e superar os obstáculos inerentes a esta etapa acadêmica. Sem esta inspiração, teria sido muito mais difícil manter o foco, a motivação e a determinação necessários para concluir este trabalho.

À minha orientadora, Professora Doutora Leticia Estevinho, deixo um agradecimento profundo pela orientação, pelo entusiasmo contagiante e pelo rigor científico com que acompanhou cada fase desta dissertação. A sua sabedoria, dedicação e generosidade na partilha de conhecimento foram fundamentais para o desenvolvimento metodológico e científico deste trabalho, inspirando-me a superar limites e a crescer academicamente e pessoalmente.

À minha coorientadora, Doutora Vanessa Paula, agradeço de forma especial pela disponibilidade, paciência e apoio prestado nas técnicas laboratoriais, que se revelaram essenciais para ultrapassar os desafios práticos deste trabalho. A orientação clara e constante tornou cada experiência no laboratório mais estruturada, produtiva e enriquecedora.

Um reconhecimento especial vai ainda para a Natália e a Laís, cuja colaboração, partilha de saberes e apoio constante tornaram o trabalho em equipa mais harmonioso e motivador. Sem o contributo generoso de ambas, muitas das etapas desta investigação teriam sido mais complexas de realizar.

Agradeço igualmente a todos os colegas de laboratório e amigos que, de forma direta ou indireta, contribuíram para esta caminhada: João, Elena, Luana, Dona Fátima, Dona Isabel, entre muitos outros. O vosso apoio, amizade e incentivo tornaram os momentos mais exigentes mais leves e transformaram esta experiência num percurso de aprendizagem conjunta e gratificante.

À minha amiga Cacau, que foi o meu verdadeiro suporte emocional e a luz que me guiou nos momentos de maior incerteza, agradeço profundamente pela amizade incondicional e pela presença que me fortaleceu sempre que mais precisei.

À minha amiga Maira, expresso a minha sincera gratidão pelo companheirismo e incentivo ao longo desta jornada, tornando o caminho mais leve e repleto de partilha.

À minha mãe, Elza, dedico o meu mais profundo reconhecimento pelo amor incondicional, pelo incentivo constante e pelo apoio emocional ao longo de toda esta jornada. Mesmo à distância, esteve sempre presente, compreendendo os meus desafios, motivando-me a persistir e proporcionando-me uma base sólida de confiança e segurança que me permitiu avançar com determinação e serenidade.

Um agradecimento especial ao meu primo Rui, pela generosidade de me disponibilizar o seu computador em momentos cruciais, gesto que foi essencial para a continuidade deste trabalho.

À minha prima Nanie, agradeço pelo apoio emocional e pela presença amiga, cujo incentivo e carinho foram essenciais para me manter motivado ao longo deste percurso.

Ao Instituto Politécnico de Bragança, deixo o meu agradecimento pelo suporte técnico, logístico e académico, indispensável para a realização dos ensaios experimentais e para o desenvolvimento integral desta dissertação.

Aos meus amigos de Cabo Verde, que nunca deixaram de apoiar e encorajar, e aos amigos de Bragança, que partilharam momentos de alegria e descontração, deixo a minha sincera gratidão. A todos quantos, direta ou indiretamente, contribuíram para a concretização deste trabalho, manifesto a minha profunda estima e reconhecimento. Cada gesto, palavra ou ato de apoio teve um valor incalculável e permanecerá sempre na minha memória com grande carinho e apreço.

Índice

Índice de Figuras	vii
Índice de Tabelas	viii
Lista de Abreviaturas	ix
Resumo	x
Abstract.....	xi
Capítulo 1- Enquadramento.....	1
1.1. Enquadramento	2
1.2. Estrutura do trabalho	3
1.3. Objetivos.....	4
1.3.1. Objetivo geral	4
1.3.2. Objetivos específicos.....	4
Capítulo 2- Revisão Bibliográfica	5
2.1. Própolis.....	6
2.1.1. Breve história do própolis	6
2.1.2. Composição do própolis	8
2.1.3. Propriedades biológicas do própolis.....	11
2.1.3.1. Atividade antimicrobiana.....	11
2.1.3.2. Atividade Antioxidante	14
2.1.3.3. Atividade anti-inflamatória	17
2.1.3.4. Atividade anti-tumoral.....	17
2.3. Regulamentação, segurança e valorização económica do própolis.....	17
2.3.1. Regulamentação e segurança alimentar.....	17
2.3.2. Valorização económica e sustentabilidade	18
2.4. Carne de frango	19
2.4.1. Aplicação do própolis na conservação de carne de frango	21
Capítulo 3- Materiais e Métodos	23
3.1. Colheita do própolis e preparação do extrato etanólico de própolis.....	24
3.2. Análises químicas	25
3.2.1. Quantificação de fenóis totais	26
3.2.2. Quantificação dos flavonoides	26

3.2.3. Atividade antioxidante	27
3.2.4. Atividade antimicrobiana.....	27
3.3. Obtenção das películas	29
3.3.1. Análises químicas	29
3.3.2. Aplicação das películas.....	30
3.3.1. Análises microbiológicas.....	31
3.3.1.1. Contagem de aeróbios mesófilos totais	31
3.3.1.2. Contagem de bolores e leveduras	32
3.3.1.3. Contagem de coliformes totais e <i>E. coli</i>	32
3.3.1.4. Pesquisa e contagem de <i>Staphylococcus aureus</i>	33
3.3.1.5. Pesquisa de <i>Salmonella</i> spp.....	34
3.3.1.6. Pesquisa e contagem <i>Listéria monocytogenes</i>	35
3.3.2. Análises químicas	35
3.3.2.1. Quantificação das três classes de compostos fenólicos	36
3.3.3. Análise colorimétrica.....	37
3.4. Análise estatística	37
Capítulo 4- Resultados e Discussão	39
4. Resultados e discussão	40
4.1. Rendimento da extração do própolis	40
4.2. Composição fenólica e atividade antioxidante do própolis e de películas	42
4.3. Atividade antimicrobiana do extrato etanólico de própolis.....	46
4.4. Análises microbiológicas ao bife após aplicação da película.....	48
4.5. Quantificação das três classes fenólicas através do espectro UV-Vis	54
4.6. Análise colorimétrica.....	61
5. Conclusão	71
6. Perspetivas Futuras	72
Referências Bibliográficas.....	74

Índice de Figuras

Figura 1- Própolis na colmeia (fonte: depositphotos.com).....	7
Figura 2- Própolis à temperatura ambiente.....	8
Figura 3- Composição geral do própolis.	8
Figura 4-Processo de extração do própolis.....	25
Figura 5-Determinação da atividade antimicrobiana.....	28
Figura 6-Processo de obtenção das películas.	29
Figura 7-Aplicação das películas de própolis.....	30
Figura 8-Placas SimPlate.....	33
Figura 9-Deteção de <i>Salmonella</i> spp.....	34
Figura 10-Evolução das contagens de microrganismos mesófilos totais.	49
Figura 11- Evolução das contagens de <i>E. coli</i>	49
Figura 12-Evolução das contagens de Coliformes.	50
Figura 13-Evolução das contagens de Bolores e Leveduras	50
Figura 14-Evolução temporal dos ácidos hidroxibenzoicos.....	55
Figura 15-Evolução temporal dos ácidos hidroxicinâmicos.....	57
Figura 16-Evolução temporal dos flavonoides.....	58
Figura 17-Evolução temporal dos Fenóis totais.	60
Figura 18-Interação entre tempo e tratamento para variável L*.	63
Figura 19-Interação entre tempo e tratamento para variável a*.	64
Figura 20-Interação entre tempo e tratamento para variável b*.	66
Figura 21-Interação entre tempo e tratamento para variável C*.	67
Figura 22-Interação entre tempo e tratamento para variável h*.	69

Índice de Tabelas

Tabela 1- Principais classes de compostos presentes no própolis e suas funções biológicas e tecnológicas.	10
Tabela 2- Principais compostos com atividade antimicrobiana no própolis.	13
Tabela 3- Compostos bioativos do própolis e seus mecanismos de ação antioxidante. .	16
Tabela 4- Aplicações de própolis em revestimentos e formulações de conservação de carne de frango.	22
Tabela 5- Teor de fenóis totais, flavonoides, atividade antioxidante DPPH, do EEP e das películas.	42
Tabela 6- Atividade antimicrobiana do extrato etanólico de própolis.	46
Tabela 7- Comparação dos efeitos antimicrobianos de películas e revestimentos à base de própolis em diferentes matrizes alimentares.	53
Tabela 8- Teores médios de compostos fenólicos do extrato seco de própolis.	54
Tabela 9- Parâmetros cromáticos nas amostras ao longo dos 6 dias.	62

Lista de Abreviaturas

Mn - Manganês

Fe - Ferro

Si - Silício

Mg - Magnésio

Zn - Zinco

Se - Selênio

Ca - Cálcio

K - Potássio

Na - Sódio

Cu – Cobre

ANOVA - Análise de Variância

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

CAPE - Caffeic acid phenethyl ester

CAT - Catalase

CMC - Carboximetilcelulose

DPPH - 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl

EAG - Equivalente de Ácido Gálico

EFSA - Autoridade europeia para a Segurança dos Alimentos

EPE - Extrato Etanólico de Própolis

EQ - Equivalente de Quercetina

FAO - Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura

GPx - Glutathione peroxidase

HIV - Vírus da Imunodeficiência Humana

HPMC - Hydroxypropyl methylcellulose

HSV - Vírus Herpes Simplex

INE - Instituto Nacional de Estatística

NP - Norma Portuguesa

ODS - Objetivos de Desenvolvimento Sustentável

ONU - Organização das Nações Unidas

ROS - Espécies Reativas de Oxigênio

SOD - Superóxido dismutase

UE - União europeia

UFC - Unidades Formadoras de Colônias

USDA - Departamento de Agricultura dos Estados Unidos

Resumo

O própolis é uma substância resinosa produzida por abelhas da espécie *Apis mellifera L.*, utilizada na construção e defesa da colmeia. Apresenta diversas colorações (verde, vermelha, amarela ou acastanhada) e resulta da recolha de exsudatos de flores, botões de folhas e secreções de várias espécies botânicas. Na Europa, as principais fontes incluem resinas de choupo, bétula, pinheiro, amieiro, salgueiro, acácia e carvalho. As propriedades antimicrobianas e antioxidantes do própolis, aliadas à sua segurança como substância natural, conferem-lhe elevado potencial para aplicação na indústria alimentar, nomeadamente como agente de bio preservação. Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo avaliar o potencial do própolis proveniente da região de Trás-os-Montes como conservante natural e ingrediente funcional na preservação de bifes de frango embalados a vácuo, valorizando simultaneamente os produtos apícolas locais.

O extrato etanólico de própolis foi caracterizado, apresentando um teor de compostos fenólicos totais de $391,68 \pm 6,11$ mg EAG/g e de flavonoides totais de $107,99 \pm 3,01$ mg EQ/g, revelando elevada atividade antioxidante (ensaio DPPH) e atividade antimicrobiana contra *Cândida albicans*, *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, confirmando o seu potencial bioativo.

O extrato foi incorporado em películas de hidroxipropilmetilcelulose (HPMC) em diferentes concentrações (0 %, 2 % e 4 %) e aplicado como revestimento sobre bifes de frango embalados a vácuo. As análises físico-químicas e microbiológicas, foram realizadas ao longo dos dias de armazenamento (T0, T3 e T6). Ao nível da cor, verificou-se que as formulações contendo própolis apresentaram maior estabilidade cromática, mantendo valores mais consistentes de L*, a*, b*, C* e h°. Esses resultados indicam menor oxidação e melhor preservação do aspeto visual. As análises microbiológicas evidenciaram reduções significativas nas contagens de mesófilos totais, coliformes, *E. coli*, bolores e leveduras, e não tendo sido detetados patogénicos como *S. aureus* ou *Listéria monocytogenes*, confirmou-se a eficácia antimicrobiana do sistema ativo.

As películas de HPMC enriquecidas com própolis demonstraram ação antioxidante e antimicrobiana, contribuindo para a preservação e segurança dos bifes de frango durante o armazenamento.

Palavras-chave: própolis; antioxidante; antimicrobiano; enriquecidas; HPMC; bio preservação; carne de frango.

Abstract

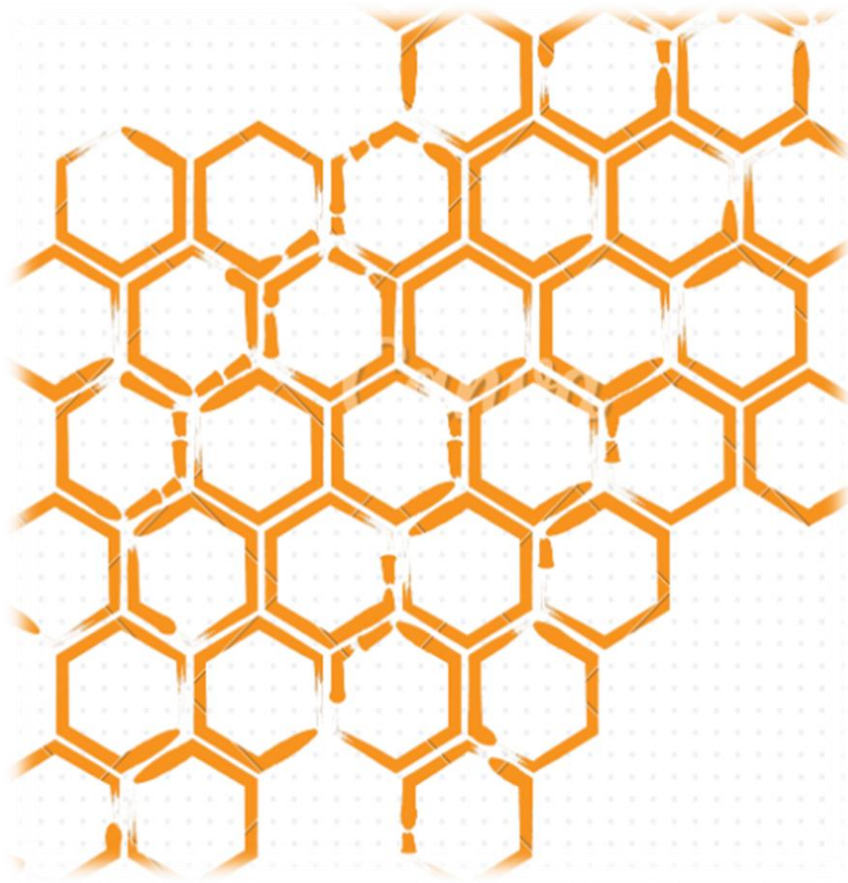
Propolis is a resinous substance produced by *Apis mellifera* L. bees and used in hive construction and defense. Its color may vary (green, red, yellow, or brownish), and it results from the collection of exudates from flowers, leaf buds, and secretions of various botanical species. In Europe, its main sources include resins from poplar, birch, pine, alder, willow, acacia, and oak. The antimicrobial and antioxidant properties of propolis, combined with its safety as a natural compound, confer high potential for its application in the food industry, particularly as a bio preservation agent. In this context, the present study aimed to evaluate the potential of propolis from the Trás-os-Montes region as a natural preservative and functional ingredient in the preservation of vacuum-packed chicken steaks, while simultaneously valorizing local beekeeping products.

The ethanolic extract of propolis was characterized and showed a total phenolic content of 391.68 ± 6.11 mg EAG/g and a total flavonoid content of 107.99 ± 3.01 mg QE/g, exhibiting strong antioxidant activity (DPPH assay) and antimicrobial activity against *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus*, and *Escherichia coli*, confirming its bioactive potential.

The extract was incorporated into hydroxypropyl methylcellulose (HPMC) films at different concentrations (0%, 2%, and 4%) and applied as a coating on vacuum-packed chicken steaks. Physico-chemical and microbiological analyses were carried out throughout the storage period (T0, T3 and T6). In terms of colour, the formulations containing propolis were found to show greater chromatic stability, maintaining more consistent L*, a*, b*, C* and h° values. These results suggest reduced oxidation and improved preservation of the product's appearance. Microbiological analyses revealed significant reductions in total mesophiles, coliforms, *E. coli*, molds, and yeasts, and the absence of pathogens such as *S. aureus* and *Listeria monocytogenes*, confirming the antimicrobial efficacy of the active system.

HPMC films enriched with propolis demonstrated antioxidant and antimicrobial activity, contributing to the preservation and safety of chicken steaks during storage.

Keywords: propolis; antioxidant; antimicrobial; enriched films; HPMC; bio preservation; chicken meat.



Capítulo 1

- Enquadramento
- Estrutura do trabalho
- Objetivos gerais
- Objetivos específicos

1.1. Enquadramento

A presente dissertação insere-se no âmbito da tese de mestrado em Qualidade e Segurança Alimentar, desenvolvida no Instituto Politécnico de Bragança.

A crescente consciencialização dos consumidores relativamente à saúde, ao bem-estar e à sustentabilidade, a procura de alternativas naturais que assegurem a qualidade e a segurança dos alimentos tem-se intensificado. Um dos principais desafios enfrentados pela indústria alimentar é o prolongamento da vida útil dos produtos, sem comprometer as suas propriedades sensoriais e nutricionais.

As alterações provocadas por microrganismos deteriorantes e patogénicos não só reduzem a qualidade dos alimentos como representam riscos para a saúde pública. Tradicionalmente, estas limitações têm sido contornadas através da utilização de aditivos sintéticos com funções conservantes e antioxidantes. Contudo, a sua aplicação está associada a potenciais efeitos adversos, como reações alérgicas, toxicidade acumulativa e consequências negativas para a saúde quando ingeridos em excesso. Acresce ainda uma crescente preocupação com o impacto ambiental destes compostos e com a sua rejeição por parte de consumidores mais informados e exigentes.

Neste contexto, o interesse por alternativas de origem natural tem vindo a aumentar. Entre estas, destaca-se o própolis, uma substância resinosa recolhida pelas abelhas a partir de exsudados vegetais e enriquecida com enzimas salivares e cera. Reconhecido desde a antiguidade pelas suas propriedades medicinais, o própolis apresenta uma composição rica em flavonoides, ácidos fenólicos e outros compostos bioativos, sendo amplamente descrita na literatura pelas suas atividades antimicrobiana, antioxidante, antifúngica e anti-inflamatória.

A aplicação de própolis em alimentos de origem animal, como a carne de frango, tem demonstrado resultados promissores, nomeadamente na inibição da oxidação lipídica e proteica, bem como no controlo da microbiota deteriorante, contribuindo para a extensão do tempo de prateleira. Assim, a utilização de própolis como conservante natural representa uma alternativa viável aos aditivos sintéticos, permitindo o desenvolvimento de produtos mais seguros, saudáveis e alinhados com as atuais exigências de sustentabilidade e qualidade alimentar.

O presente trabalho enquadra-se neste contexto, visando avaliar o potencial do própolis como ingrediente funcional e conservante natural em bifes de frango, contribuindo simultaneamente para a inovação na indústria alimentar e para a valorização de recursos naturais de elevado interesse bioativo.

1.2.Estrutura do trabalho

No primeiro capítulo, “Enquadramento e Objetivos”, procede-se à contextualização do estudo, enquadrando a crescente procura de alimentos funcionais e seguros. Dá-se particular ênfase ao própolis, uma resina apícola de composição complexa, reconhecida pelas suas propriedades antioxidantes, antimicrobianas e anti-inflamatórias. A sua aplicação em produtos alimentares representa uma alternativa natural aos aditivos sintéticos, alinhada com as atuais exigências de sustentabilidade e segurança alimentar.

O segundo capítulo apresenta a “Revisão Bibliográfica “, reunindo informação científica sobre a origem, composição e variabilidade química do própolis, bem como os compostos bioativos de maior interesse. São igualmente abordados os mecanismos de ação na preservação da qualidade alimentar e os estudos prévios que descrevem a sua aplicação em diferentes matrizes alimentares.

No terceiro capítulo são descritos os “Materiais e Métodos” utilizados. Expõe-se o processo de extração e caracterização do própolis, bem como os procedimentos experimentais adotados para a sua aplicação nos bifes de frango. Detalham-se ainda as metodologias de avaliação microbiológica, físico-química que permitiram analisar os efeitos do própolis sobre a estabilidade e a qualidade dos produtos obtidos.

O quarto capítulo, “Resultados e Discussão”, contempla a apresentação dos resultados experimentais e a sua análise crítica, estabelecendo comparações com a bibliografia existente. Esta abordagem permitiu avaliar o contributo do própolis como agente conservante natural e potenciador de propriedades funcionais.

Por fim, o quinto capítulo, “Conclusão”, sintetiza os principais resultados alcançados, evidenciando o potencial e as limitações do própolis na indústria alimentar. São ainda propostas perspectivas de investigação futura, de forma a aprofundar o conhecimento e alargar as possibilidades de aplicação deste recurso natural.

1.3. Objetivos

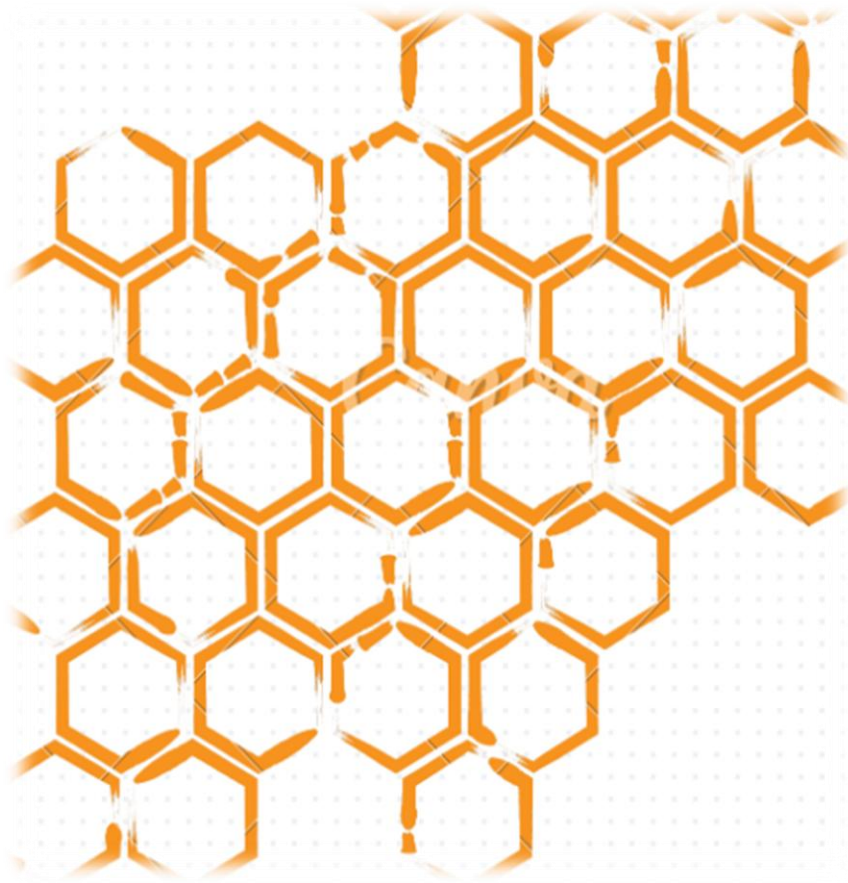
1.3.1. Objetivo geral

Este trabalho foi desenvolvido no âmbito da obtenção da tese de Mestrado em Qualidade e Segurança Alimentar e tem como objetivo principal testar películas com HPMC incorporados com extrato de própolis na conservação de bifes de frango refrigerados.

1.3.2. Objetivos específicos

Os objetivos específicos do presente trabalho consistem em:

- Preparar o extrato de própolis a utilizar nas diferentes etapas experimentais;
- Quantificar o teor de compostos fenólicos e de flavonoides totais presentes no extrato de própolis e nas películas desenvolvidas;
- Avaliar o potencial antioxidante do extrato etanólico de própolis pelo método do DPPH e determinar a sua atividade antimicrobiana através da técnica de diluição em tubo;
- Investigar possíveis efeitos sinérgicos entre o própolis e o agente gelificante (HPMC), mediante a realização de ensaios com própolis isolado e com a combinação própolis + HPMC;
- Incorporar o extrato de própolis em películas, com concentrações previamente definidas, e aplicar essas películas na conservação de bifes de frango;
- Avaliar o comportamento microbiológico dos bifes de frango durante o período de refrigeração, de forma a determinar se as películas contribuem para o aumento do tempo de prateleira;
- Determinar a eventual migração de compostos bioativos da película para a matriz alimentar, avaliando a capacidade de transferência dos mesmos.



Capítulo 2

- Revisão Bibliográfica

2.1. Própolis

2.1.1. Breve história do própolis

O termo *própolis* deriva do grego *prō* (“antes”) e *pólis* (“cidade”), significando literalmente “defesa da cidade”, numa clara alusão à função protetora desempenhada por esta substância na colmeia (Borba et al., 2015; Saelao et al., 2020; Simone-Finstrom, 2017). As abelhas *Apis mellifera* L. recolhem resinas de origem vegetal, que misturam com cera e secreções salivares, formando um material resinoso utilizado para selar, reparar e higienizar a colmeia (Borba et al., 2015; Simone-Finstrom, 2017).

O uso do própolis remonta a civilizações antigas. No Egito Antigo, cerca de 1700 a.C., substâncias de características semelhantes eram aplicadas no embalsamamento e conservação de múmias, como a denominada “cera negra” (Castaldo & Capasso, 2002; Pereira et al., 2003). Assírios, Gregos e Incas também recorreram a produtos resinosos com fins medicinais e religiosos. Na Grécia clássica, Hipócrates recomendava resinas apícolas para o tratamento de feridas e infeções, enquanto Plínio, o Velho, descreveu o seu uso no alívio de inflamações e dores (Ioirish, 1982). Durante a Idade Média, embora a sua utilização tenha diminuído, existem registos do século XII que mencionam a “cola de abelha” em preparações destinadas ao tratamento de infeções orais e faríngeas (Otręba et al., 2022).

O interesse científico pelo própolis foi reavivado no século XX, especialmente a partir da década de 1980, devido à identificação das suas propriedades farmacológicas e ao reconhecimento do seu potencial em cosméticos e suplementos alimentares (Lustosa et al., 2008). Historicamente, foi amplamente utilizado pelas suas propriedades cicatrizantes, nomeadamente durante conflitos como a Guerra dos Bóeres e a Segunda Guerra Mundial, em que extratos de própolis foram aplicados no tratamento de feridas (Marcucci & Custódio, 2018; Moreira et al., 2011).

Nas últimas décadas (2022–2025), a investigação científica tem consolidado o própolis como um produto natural multifuncional, dotado de propriedades terapêuticas, antioxidantes e antimicrobianas, com aplicações em biomateriais, alimentos funcionais e formulações farmacêuticas (Otręba et al., 2022; Simone-Finstrom, 2017). Esta evolução reflete a transição do uso empírico tradicional para uma abordagem científica baseada na padronização e caracterização química.

A literatura científica demonstra que o própolis atua como um elemento-chave na defesa da colmeia, promovendo a imunocompetência das abelhas e limitando a proliferação de microrganismos e parasitas, enquanto contribui para a integridade estrutural do ninho (Borba et al., 2015; Saelao et al., 2020; Simone-Finstrom, 2017) (Figura 1).

A cor e a consistência do própolis variam conforme a sua origem botânica, geográfica e sazonal, pode apresentar tonalidades que vão do verde ao vermelho, do amarelo aos diversos tons de castanho, incluindo variantes que se estendem do verde-escuro ao castanho-avermelhado (Irigoití et al., 2021; Lustosa et al., 2008; Marcucci & Custódio, 2018; Moise & Bobiş, 2020).



Figura 1- Própolis na colmeia (fonte: depositphotos.com).

Do ponto de vista físico-químico, o própolis encontra-se sólido à temperatura ambiente (Figura 2), tornando-se maleável acima dos 30°C. O seu ponto de fusão situa-se geralmente entre 60°C e 70°C, podendo, contudo, atingir valores próximos dos 100°C, dependendo da composição. Apresenta baixa solubilidade em água, sendo por isso, necessária a utilização de solventes orgânicos, como etanol, metanol ou acetona, para a extração dos seus compostos bioativos (Diallo, 2021; Moreira et al., 2011).



Figura 2- Própolis à temperatura ambiente.

2.1.2. Composição do própolis

O própolis é uma substância natural complexa composta principalmente por resinas e bálsamos vegetais ($\approx 50\%$), cera de abelha (30%), óleos essenciais e compostos aromáticos voláteis (10%), pólen (5%) e outros constituintes orgânicos e minerais (5%) (El-Sakhawy et al., 2023; Katiyar, 2023; Przybyłek & Karpiński, 2019; Rocha et al., 2023) (Figura 3).

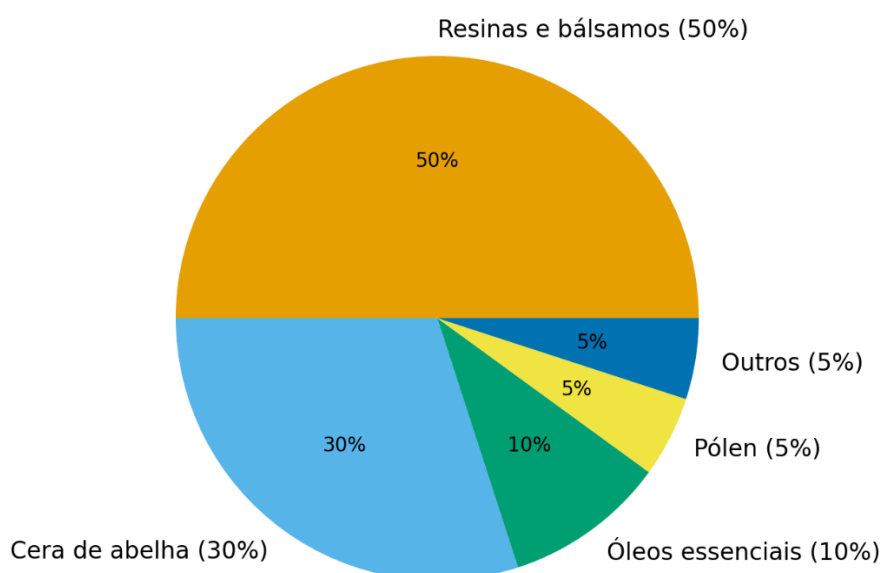


Figura 3- Composição geral do própolis.

Estudos fitoquímicos identificaram mais de 420 compostos no própolis de diferentes origens geográficas, incluindo flavonoides, ácidos fenólicos, terpenos, aldeídos, esteróis, aminoácidos, vitaminas e oligoelementos (Anjum et al., 2019; Drescher et al., 2017; Pobiega et al., 2019; Zabaiou et al., 2017).

Entre os minerais mais comuns encontram-se Mn, Fe, Mg, Zn, Se, Ca, K, Na e Cu, enquanto as vitaminas mais representativas pertencem ao complexo B, além das vitaminas C e E, associadas à atividade antioxidante (Bankova et al., 2000; Pasupuleti et al., 2017).

Os compostos fenólicos e flavonoides são os principais responsáveis pelas propriedades biológicas do própolis, nomeadamente pelas suas ações antioxidante, antimicrobiana e anti-inflamatória (Cauich-Kumul & Campos, 2019; Irigoiti et al., 2021).

Os constituintes voláteis, como monoterpenos e sesquiterpenos (terpinol, cânfora, geraniol, nerol, farnesol) e a artepilina C (marcador químico do própolis verde brasileiro) contribuem para o aroma característico e para parte da sua atividade antimicrobiana (El-Sakhawy et al., 2023; Moreira et al., 2011; Przybyłek & Karpiński, 2019).

Com base na origem botânica e geográfica, o própolis pode ser classificado em diferentes tipos:

- o europeu, derivado principalmente de espécies de *Populus*, rico em flavonas e ácidos aromáticos (Bankova et al., 2000);
- o verde, obtido de *Baccharis dracunculifolia*, caracterizado pela artepilina C (Irigoiti et al., 2021; Moise & Bobiş, 2020);
- o vermelho tropical, associado a espécies do género *Dalbergia*, contendo prenilflavonoides e isoflavonas (Irigoiti et al., 2021; Moise & Bobiş, 2020).

Esta diversidade fitoquímica reflete-se nas propriedades farmacológicas e tecnológicas do própolis, justificando a necessidade de uma padronização química rigorosa para garantir a reprodutibilidade e segurança dos extratos em aplicações alimentares, cosméticas e farmacêuticas (Bankova et al., 2000; Zuhendri et al., 2021).

Diversos autores descrevem a presença de flavonoides, ácidos fenólicos, terpenos e outros constituintes bioativos na matriz resinosa do própolis. A Tabela 1 resume esses grupos químicos e suas principais atividades relatadas na literatura.

Tabela 1- Principais classes de compostos presentes no própolis e suas funções biológicas e tecnológicas.

Classe de compostos	Exemplos principais	Funções biológicas e tecnológicas	Referências
Flavonoides	Crisina, pinocembrina, galangina, apigenina, quercetina, kaempferol, pinostrobina	Atividade antioxidante, anti-inflamatória e antimicrobiana; estabilização de radicais livres	Cauich-Kumul & Campos (2019); Przybyłek & Karpiński (2019); Irigoiti et al. (2021)
Ácidos fenólicos e derivados	Ácido caféico, ferúlico, cinâmico, p-cumárico, CAPE	Elevada capacidade antioxidante e modulação de vias metabólicas inflamatórias	Pasupuleti et al. (2017); Rocha et al. (2023)
Terpenos e compostos voláteis	Terpinol, cânfora, geraniol, nerol, farnesol, artemisina C	Aroma característico; atividades antifúngica, antiviral e cicatrizante	Przybyłek & Karpiński (2019); Moreira et al. (2011); El-Sakhawy (2023)
Vitaminas e oligoelementos	Vit. B (B ₁ , B ₂ , B ₆), C, E, Mn, Fe, Zn, Cu, Se	Ação antioxidante e enzimática; aumento da estabilidade dos extratos	Bankova et al. (2000); Pasupuleti et al. (2017); Zabaiou et al. (2017)
Ceras e ácidos gordos	Ésteres de ácidos gordos, palmítico e oleico	Função estrutural e estabilizadora; redução da volatilização	Katiyar (2023); Moise & Bobiş (2020)

2.1.3. Propriedades biológicas do própolis

O própolis apresenta um vasto leque de propriedades biológicas resultantes da sua composição complexa, rica em compostos fenólicos, flavonoides, ácidos aromáticos, terpenos e outros metabólitos secundários (Sforcin, 2016; Silva-Carvalho et al., 2015). Estas moléculas conferem-lhe uma notável atividade antimicrobiana, antioxidante, anti-inflamatória, imunomoduladora, cicatrizante, antiviral e antitumoral, o que justifica o seu crescente interesse em contextos biomédicos e farmacêuticos (Zabaiou et al., 2017; Zuhlendri et al., 2021).

2.1.3.1. Atividade antimicrobiana

A atividade antimicrobiana do própolis é uma das mais estudadas e reconhecidas, sendo atribuída principalmente à presença de flavonoides (tais como a galangina, pinocembrina e crisina), ácidos fenólicos e os seus ésteres, nomeadamente o éster fenílico do ácido cafeico (CAPE) e o ácido p-cumárico (Przybyłek & Karpiński, 2019; Silva-Carvalho et al., 2015). Estes compostos atuam de forma sinérgica, interferindo em múltiplos alvos celulares dos microrganismos.

Do ponto de vista molecular, os flavonoides e ácidos fenólicos provocam alterações na permeabilidade das membranas bacterianas, desorganizando a bicamada lipídica e provocando a lise celular. Adicionalmente, inibem enzimas essenciais envolvidas na síntese de ácidos nucleicos e proteínas, comprometendo o metabolismo bacteriano (Sforcin, 2016). O CAPE, em particular, demonstrou capacidade para se intercalar com o DNA bacteriano e impedir a replicação, além de inibir a atividade da RNA-polimerase (Cauich-Kumul & Campos, 2019).

Estudos *in vitro* demonstram que extratos etanólicos de própolis apresentam elevada eficácia contra bactérias Gram-positivas, especialmente *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans* e *Listeria monocytogenes*, devido à sua parede celular mais permeável a compostos lipofílicos. No entanto, também se verificou atividade relevante sobre bactérias Gram-negativas como *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosas*, embora em menor grau, em virtude da barreira conferida pela membrana externa rica em lipopolissacarídeos (Sforcin, 2016; Zabaiou et al., 2017).

Para além da ação antibacteriana, o própolis apresenta atividade antifúngica contra espécies de *Candida*, *Aspergillus* e *Trichophyton*, atribuída sobretudo aos terpenos e ácidos gordos presentes nas frações voláteis. Estes compostos alteram a integridade da membrana citoplasmática fúngica, levando à perda de iões e metabolitos essenciais (Przybyłek & Karpiński, 2019).

Vários estudos apontam ainda para a atividade antiviral do própolis, com inibição da replicação de vírus como *Herpes simplex*, *Influenza A* e SARS-CoV-2, sendo este efeito associado à presença de flavonoides e de compostos fenólicos que interferem na ligação do vírus aos recetores celulares e na replicação intracelular (Zulhendri et al., 2021).

Do ponto de vista aplicativo, a ação antimicrobiana do própolis tem motivado o seu uso em formulações de higiene oral, e em conservantes naturais de alimentos e biomateriais com propriedades antissépticas (Halboub et al., 2020; Silva-Carvalho et al., 2015).

O efeito sinérgico observado entre o própolis e antibióticos convencionais, como a amoxicilina e a oxacilina, revela o seu potencial como adjuvante terapêutico no combate à resistência antimicrobiana (Przybyłek & Karpiński, 2019; Sforcin, 2016).

A Tabela 2 apresenta as principais classes de compostos bioativos identificados no própolis, bem como seus mecanismos de ação e microrganismos-alvo.

Tabela 2- Principais compostos com atividade antimicrobiana no própolis.

Classe de compostos	Exemplos principais	Mecanismo de ação	Microrganismos-alvo	Referências
Flavonoides	Galangina, pinocembrina, crisina, quercetina	Aumento da permeabilidade da membrana; inibição da síntese de ácidos nucleicos e proteínas	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Streptococcus mutans</i> , <i>Listeria monocytogenes</i>	Przybyłek & Karpiński (2019); Sforcin (2016)
Ácidos fenólicos e ésteres	Ácido caféico, CAPE (éster fenético do ácido caféico), ácido p-cumárico	Intercalação no DNA bacteriano; inibição da RNA-polimerase; modulação de enzimas oxidativas	<i>E. coli</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Candida albicans</i>	Cauich-Kumul & Campos (2019); Silva-Carvalho et al. (2015)
Terpenos e compostos voláteis	Terpinol, geraniol, nerol, farnesol, cânfora	Desorganização da membrana citoplasmática fúngica; perda de iões e metabolitos	<i>Aspergillus niger</i> , <i>Trichophyton mentagrophytes</i>	Przybyłek & Karpiński (2019); Zabaïou et al. (2017)
Ácidos gordos e ceras	Ácido palmítico, ácido oleico, ésteres de ácidos gordos	Efeito sinérgico com flavonoides; barreira física e estabilizadora	Bactérias Gram-positivas e Gram-negativas	Silva-Carvalho et al. (2015); Sforcin (2016)
Compostos específicos (marcadores)	Artepilina C, prenilflavonoides	Indução de permeabilidade seletiva; interferência na replicação celular	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Candida spp.</i> , <i>Influenza A vírus</i>	Zulhendri et al. (2021); Zabaïou et al. (2017)

2.1.3.2. Atividade antioxidante

O própolis é amplamente reconhecido pelo seu elevado potencial antioxidante, propriedade diretamente relacionada com a sua riqueza em compostos fenólicos, flavonoides e ácidos aromáticos, tais como a galangina, pinocembrina, quercetina, crisina, ácido caféico, ácido ferúlico e o seu éster fenetílico (CAPE) (Anjum et al., 2019; Pasupuleti et al., 2017). Estes compostos são capazes de neutralizar espécies reativas de oxigênio (ROS) e radicais livres, protegendo os constituintes celulares (lípidos, proteínas e ácidos nucleicos) contra a oxidação e o consequente dano oxidativo (Silva-Carvalho et al., 2015; Zabaïou et al., 2017).

Do ponto de vista molecular, os flavonoides e os ácidos fenólicos atuam como doadores de elétrons ou hidrogênio, estabilizando os radicais livres e impedindo a propagação de reações em cadeia oxidativas. Paralelamente, exibem capacidade quelante de íons metálicos (Fe^{2+} e Cu^{2+}), prevenindo a geração de radicais hidroxilo (Cauch-Kumul & Campos, 2019).

Estudos comparativos demonstram que o poder antioxidante do própolis varia de acordo com a sua origem botânica e geográfica, refletindo diferenças no perfil fitoquímico. O própolis verde brasileiro, derivado de *Baccharis dracunculifolia*, é particularmente rico em artemilina C e ácido p-cumárico, apresentando uma das mais elevadas capacidades redutoras registradas entre os tipos de própolis (Bankova et al., 2000; Moise & Bobiş, 2020). Por outro lado, o própolis europeu, de origem *Populus*, contém maior proporção de flavonas e flavonóis o que se traduz numa ação antioxidante mais prolongada, embora menos intensa (Zabaïou et al., 2017).

A avaliação da atividade antioxidante é frequentemente realizada através de ensaios in vitro, nomeadamente DPPH• (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo), ABTS•⁺ (ácido 2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico), FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) e ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity). Resultados obtidos em diferentes estudos mostram que extratos etanólicos de própolis apresentam valores de inibição de radicais livres superiores a 80%, comparáveis aos de antioxidantes sintéticos como o BHT (butil-hidroxitolueno) e o BHA (butil-hidroxianisol) (Anjum et al., 2019; El-Sakhawy et al., 2023).

Além da neutralização direta de ROS (Espécies Reativas de Oxigênio), o própolis modula a resposta antioxidante endógena das células, estimulando a expressão de enzimas como a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPx). Este efeito cito protetor tem sido demonstrado em modelos celulares e animais, sugerindo um papel relevante do própolis na prevenção de doenças associadas ao stress oxidativo crônico, incluindo *diabetes mellitus*, doenças cardiovasculares, neurodegenerativas e cancro (Pasupuleti et al., 2017; Sforcin, 2016).

A sinergia entre os diferentes compostos fenólicos e flavonoides confere ao própolis um efeito antioxidante multifatorial, que não depende de um único componente isolado, mas sim de uma interação complexa entre os seus constituintes. Esta característica reforça a importância da padronização química dos extratos para garantir eficácia e reprodutibilidade nas aplicações farmacêuticas e alimentares (Bankova et al., 2000; Zuhlendri et al., 2021).

As principais classes de compostos antioxidantes do própolis e seus mecanismos de ação estão resumidas na Tabela 3.

Tabela 3- Compostos bioativos do própolis e seus mecanismos de ação antioxidante.

Classe de compostos	Exemplos representativos	Mecanismos de ação antioxidante	Referências
Flavonoides	Galangina, quercetina, crisina, pinocebrina, apigenina, kaempferol	Doação de elétrons e hidrogênio; neutralização direta de ROS (espécies reativas de oxigênio); inibição da peroxidação lipídica; aumento da atividade das enzimas SOD, CAT e GPx	Cauich-Kumul & Campos, 2019; Pasupuleti et al., 2017; Zabaïou et al., 2017
Ácidos fenólicos e derivados	Ácido caféico, ferúlico, <i>p</i> -cumárico, cinâmico, CAPE (éster fenético do ácido caféico)	Neutralização de radicais peróxidos e hidroxilo; modulação das vias inflamatórias mediadas por NF-κB e COX-2; regeneração de antioxidantes endógenos	Anjum et al., 2019; Pasupuleti et al., 2017; Zülhendri et al., 2021
Terpenos e compostos voláteis	Artepilina C, farnesol, geraniol, nerol	Ação sinérgica com flavonoides na inibição da oxidação lipídica; proteção de membranas celulares contra danos oxidativos	Moise & Bobiş, 2020; Bankova et al., 2022
Vitaminas	Vitaminas C, E, B ₁ , B ₂ , B ₆	Regeneração de tocoferóis e glutatona; proteção contra oxidação de lípidos e proteínas; estabilização dos extratos	Bankova et al., 2000; Zabaïou et al., 2017
Oligoelementos e minerais	Se, Zn, Mn, Cu, Fe	Cofatores enzimáticos das principais enzimas antioxidantes (SOD, CAT, GPx); reforço da defesa redox celular	Zabaïou et al., 2017; Pasupuleti et al., 2017
Polifenóis totais	Mistura complexa de flavonoides e ácidos fenólicos	Efeito sinérgico global de captação de radicais; estabilização química de outros antioxidantes e preservação da matriz bioativa	El-Sakhawy, 2023; Zülhendri et al., 2021

2.1.3.3. Atividade anti-inflamatória

Os constituintes do própolis modulam diversas vias inflamatórias, inibindo enzimas como a cicloxigenase (COX-2) e a lipoxigenase (LOX), e suprimindo a produção de citocinas pró-inflamatórias (IL-6, TNF- α e IL-1 β) (Cauich-Kumul & Campos, 2019; Sforcin, 2016). O CAPE e os flavonoides exercem ainda efeitos imunomoduladores, estimulando a fagocitose e a atividade dos linfócitos, reforçando a resposta imunitária (Silva-Carvalho et al., 2015).

2.1.3.4. Atividade anti-tumoral

Do ponto de vista oncológico, compostos como o CAPE e a artepilina C induzem apoptose em células tumorais e bloqueiam o ciclo celular, demonstrando potencial como adjuvantes em terapias anticancerígenas (Sforcin, 2016; Silva-Carvalho et al., 2015).

2.3. Regulamentação, segurança e valorização económica do própolis

A utilização do própolis em produtos alimentares, farmacêuticos e cosméticos requer um enquadramento regulamentar rigoroso, que assegure a qualidade, a segurança e a rastreabilidade do produto. Apesar do seu uso tradicional, a normalização internacional do própolis ainda é limitada, sobretudo devido à sua variabilidade química, influenciada pela origem botânica, geográfica e pelo método de extração (Bankova et al., 2000; Irigoiti et al., 2021).

2.3.1. Regulamentação e segurança alimentar

Na União Europeia, o própolis é classificado pela Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos (EFSA) como um ingrediente natural de origem apícola, e não como aditivo alimentar, dado que não possui número “E” atribuído. No entanto, o seu uso é permitido em suplementos alimentares e produtos com alegações funcionais, desde que cumpram os requisitos de segurança química, microbiológica e toxicológica previstos

pela legislação comunitária (EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies (NDA), 2010)

As principais referências legais incluem a Diretiva 2002/46/CE relativa à aproximação das legislações dos Estados-Membros sobre suplementos alimentares, e o Regulamento (CE) n.º 1924/2006, que regula as alegações nutricionais e de saúde alimentos. Estes documentos exigem que o própolis utilizado em suplementos demonstre segurança toxicológica comprovada, ausência de contaminantes (como metais pesados, pesticidas e micotoxinas) e padronização dos compostos ativos.

No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) reconhece o própolis como alimento funcional e ingrediente autorizado em suplementos alimentares. A Instrução Normativa n.º 28/2018 estabelece os critérios de identidade, qualidade e pureza para o própolis in natura e para os seus extratos, incluindo limites máximos de impurezas e padrões físico-químicos (ANVISA, 2018).

Estudos toxicológicos indicam que o própolis apresenta baixa toxicidade aguda e crónica, sendo considerado seguro para consumo humano dentro de limites moderados (Pasupuleti et al., 2017; Moise & Bobiş, 2020). No entanto, indivíduos com alergias a produtos apícolas devem evitar o seu uso, dado o potencial de reações alérgicas a compostos fenólicos e cerosos presentes no produto (Burdock, 1998; Toreti et al., 2013).

A dose diária recomendada de extrato etanólico de própolis situa-se entre 1 e 3 g/dia para adultos, considerada segura e eficaz para uso contínuo (Moise & Bobiş, 2020). Contudo, a ausência de padrões internacionais unificados justifica a necessidade de investigação adicional e padronização global, a fim de garantir a consistência e a reprodutibilidade dos produtos comerciais (Irigoití et al., 2021; Toreti et al., 2013).

2.3.2. Valorização económica e sustentabilidade

A valorização económica do própolis representa uma oportunidade estratégica para o setor apícola e para a bioeconomia regional, especialmente em territórios rurais como Trás-os-Montes, onde a apicultura tem forte relevância socioeconómica.

A produção mundial de própolis é estimada entre 2 000 e 3 000 toneladas anuais, com Brasil, China, Argentina e países da Europa de Leste entre os principais produtores

(Bankova et al., 2000; Irigoiti et al., 2021). O mercado global de própolis vem apresentando crescimento contínuo, impulsionado pela procura crescente por produtos naturais e funcionais. Em 2024, o valor do mercado foi estimado em mais de 900 milhões de dólares, com uma taxa de crescimento anual composta (CAGR) próxima de 5,5% até 2030 (*Propolis Market Size, Trends & Drivers | Industry Forecast 2030*, 2025).

Este crescimento é sustentado pela expansão das aplicações do própolis em suplementos alimentares, cosméticos naturais, produtos farmacêuticos e embalagens ativas. O desenvolvimento de películas biodegradáveis e revestimentos com própolis contribui simultaneamente para a sustentabilidade ambiental e para a inovação tecnológica na conservação de alimentos (El-Sakhawy et al., 2023; Tumbarski et al., 2022).

A valorização do própolis alinha-se com os Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS) das Nações Unidas, especialmente o ODS 12 (Consumo e Produção Responsáveis) e o ODS 15 (Vida Terrestre), ao promover o uso eficiente de recursos naturais, a biodiversidade e a renda rural sustentável (ONU, 2015).

Neste contexto, o própolis afirma-se não apenas como produto natural de elevado valor biológico, mas também como recurso estratégico para a transição para uma economia circular e verde, baseada em princípios de sustentabilidade, inovação e responsabilidade ambiental.

2.4. Carne de frango

A carne de frango é atualmente a principal fonte de proteína animal consumida no mundo, resultado do seu baixo custo de produção, aceitabilidade cultural e perfil nutricional favorável. Segundo a Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (FAO, 2023), a produção mundial de carne de aves ultrapassou 138 milhões de toneladas em 2022, sendo o frango responsável por cerca de 90% desse total. A expansão tem sido contínua, com crescimento médio anual acima de 2%, consolidando o setor avícola como o mais dinâmico da pecuária global.

O relatório OECD-FAO Agricultural Outlook 2023–2032 projeta que o consumo mundial de carne de frango atingirá cerca de 155 milhões de toneladas até 2032, superando o consumo de carne suína e bovina. Esse aumento é impulsionado pela urbanização, pela mudança de hábitos alimentares e pela percepção de que a carne branca é mais saudável,

devido ao seu baixo teor de gordura saturada e elevado teor proteico (OECD/FAO, 2023). O frango é também uma das carnes com menor pegada ambiental, necessitando de menos ração, água e área de pastagem por quilo de carne produzida, em comparação com ruminantes (FAO, 2022).

No cenário produtivo, Estados Unidos, China e Brasil lideram a produção global, respondendo por mais de 50% da carne de frango mundial (USDA, 2024).

Em Portugal, a carne de Frango continua a ser a mais consumida pela população, representando cerca de 45% do consumo total de carnes no país. De acordo com o Instituto Nacional de Estatística (INE, 2024), o consumo total de carne atingiu 124,3 kg por habitante em 2024, dos quais aproximadamente 40 kg correspondem à carne de aves, valor que coloca Portugal entre os maiores consumidores de frango da União Europeia. Esses números confirmam uma tendência de preferência crescente por carnes brancas, associada a custos mais acessíveis, versatilidade culinária (Euromeat News, 2024; INE, 2024).

Apesar de seu sucesso econômico, a carne de frango é altamente perecível, o que impõe desafios à indústria e ao comércio global. Devido ao seu alto teor de água e nutrientes, constitui um meio ideal para o crescimento microbiano e o desenvolvimento de reações de oxidação lipídica e proteica, responsáveis pela perda de cor, odor e sabor (Dave & Ghaly, 2011). Mesmo sob refrigeração, a vida útil da carne fresca raramente ultrapassa sete dias, sendo limitada por microrganismos psicrotróficos (Katiyo et al., 2020; Mahdavi-Roshan et al., 2022). A deterioração pode ser acelerada por falhas na cadeia de frio, manuseio inadequado ou contaminação cruzada.

Por esses motivos, a conservação da carne de frango exige estratégias tecnológicas integradas, incluindo embalagens a vácuo, atmosferas modificadas, e o uso de agentes naturais antimicrobianos e antioxidantes, como extratos vegetais e própolis, que vêm ganhando destaque como alternativas seguras aos conservantes sintéticos (Mahdavi-Roshan et al., 2022)

Em síntese, a carne de frango combina alta relevância socioeconômica e importância nutricional com grandes desafios tecnológicos e sanitários. O seu papel central na segurança alimentar global requer contínuos avanços em processamento, armazenamento e controlo microbiológico, para garantir qualidade, inocuidade e sustentabilidade da cadeia produtiva.

2.4.1. Aplicação do própolis na conservação de carne de frango

A carne de frango é um alimento altamente perecível devido ao seu elevado teor de água, pH próximo da neutralidade e abundância de nutrientes que favorecem o crescimento microbiano. Mesmo sob refrigeração, microrganismos como, *Pseudomonas spp.*, *Enterobacteriaceae* e *Brochothrix thermosphacta* podem proliferar, conduzindo à deterioração e à perda de qualidade sensorial (Katiyo et al., 2020).

Nos últimos anos, diversos estudos demonstraram que o uso de revestimentos com biopolímeros incorporados com extratos de própolis constitui uma estratégia promissora para prolongar a vida útil da carne de frango. Revestimentos de quitosano enriquecidos com extrato etanólico de própolis (EEP) mostraram elevada eficácia na inibição de *Staphylococcus aureus*, coliformes totais e bactérias lácticas, mantendo a estabilidade microbiológica e físico-química durante o armazenamento refrigerado (Jonaidi Jafari et al., 2018).

Outras formulações combinam óleo essencial de *Zataria multiflora* com própolis, apresentando uma redução significativa da carga microbiana e das alterações físico-químicas em peito de frango refrigerado (Mehdizadeh & Mojaddar Langroodi, 2019). De forma semelhante, a aplicação de extrato aquoso de própolis retardou o aumento do pH e do azoto volátil total em kebabs de frango, além de melhorar as propriedades sensoriais e a estabilidade oxidativa do produto (Mahdavi-Roshan et al., 2022).

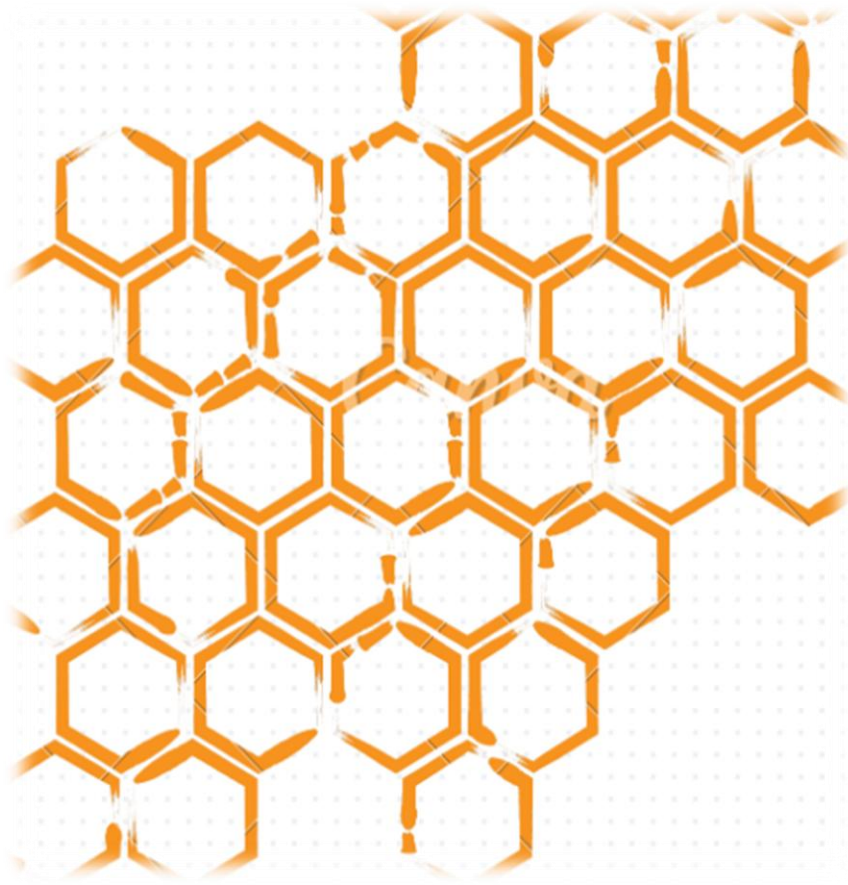
Revestimentos baseados em carboximetilcelulose contendo até 4% de EEP também demonstraram reduzir significativamente a oxidação lipídica e a formação de metamioglobina, preservando a coloração, o aroma e a aceitação sensorial da carne durante 16 dias a 2 °C (El Sheikha et al., 2022; El-Sakhawy et al., 2023).

De forma geral, o uso de própolis na conservação de carne de frango oferece benefícios duplos: melhora a segurança microbiológica e prolonga a estabilidade físico-química, reforçando o potencial deste produto natural como conservante bioativo eficaz e sustentável para a indústria de carnes e produtos prontos a consumir.

Na Tabela 4 estão sumariadas as diferentes formulações e revestimentos contendo própolis, utilizados na conservação de produtos alimentares.

Tabela 4- Aplicações de própolis em revestimentos e formulações de conservação de carne de frango.

Tipo de revestimento / formulação	Tipo de própolis e concentração	Análises realizadas	Efeitos observados	Referência
Quitossano + extrato etanólico de própolis (EEP)	1–3% (v/v) EEP	<i>Staphylococcus aureus</i> , coliformes totais, bactérias lácticas	Redução significativa da carga microbiana; atraso na oxidação lipídica; manutenção da cor e odor durante 15 dias a 4 °C	Jonaidi Jafari et al. (2018)
Óleo essencial de <i>Zataria multiflora</i> + própolis	1% EEP + 0,5% óleo essencial	Contagem total aeróbia, <i>Pseudomonas</i> <i>spp.</i> , <i>Enterobacteriaceae</i>	Sinergismo antimicrobiano; redução da deterioração microbiológica; manutenção da textura e cor	Mehdizadeh & Mojaddar Langroodi (2019)
Extrato aquoso de própolis (AEP)	2% (m/v)	pH, azoto volátil total (TVB-N), oxidação lipídica	Redução do TVB-N; melhoria da estabilidade oxidativa e sensorial durante 10 dias a 4 °C	Mahdavi-Roshan et al. (2022)
Carboximetilcelulose (CMC) + EEP	2–4% (v/v) EEP	Metamioglobina, oxidação lipídica, coloração	Menor formação de metamioglobina e produtos de oxidação; conservação da cor e aroma por 16 dias a 2 °C	El Sheikha et al. (2022)
Biopolímeros com extrato de própolis	1–4% EEP	Oxidação lipídica, parâmetros sensoriais	Prolongamento da vida útil e preservação da qualidade sensorial até 18 dias a 2 °C	El-Sakhawy et al. (2024)



Capítulo 3

- **Materiais e Métodos**

3.1. Colheita do própolis e preparação do extrato etanólico de própolis

O presente estudo foi realizado no Laboratório de Microbiologia da Escola Superior Agrária (ESA) do Instituto Politécnico de Bragança, situado na cidade de Bragança, em Portugal. O própolis foi fornecido por apicultores da cidade de Bragança, Portugal. A colheita foi feita em setembro de 2023.

Em laboratório, a amostra foi congelada a -20°C , triturada mecanicamente (Moulinex La Moulinette 1, 2, 3 AD560120, 800 W), e de seguida, foi feita a extração etanólica através do método otimizado por Paula et al., 2017.

A extração (Figura 4) foi realizada através da adição de 500 ml de etanol a 80% (v/v) a 100 g de pó de própolis, num goblé, sob agitação contínua num agitador magnético Fisherbrand™ (Thermo Fisher Scientific, Waltham) à temperatura ambiente overnight. A suspensão obtida foi filtrada em papel de filtro para um erlenmeyer e, em seguida, concentrada num evaporador rotativo (IKA® RV8) a 40°C , de modo a remover a fase etanólica. Para calcular o rendimento registou-se o peso do erlenmeyer vazio, bem como o peso do erlenmeyer com o extrato concentrado (Equação 1).

$$\text{Rend. prop. \%} = \frac{\text{Peso balão com propolis(g)} - \text{Peso balão vazio(g)}}{\text{Peso inicial propolis (g)}} \times 100 \quad \text{Eq.1}$$

Posteriormente, foram adicionados 100 ml de éter dietílico e 100 ml de água destilada a cerca de 30 g do extrato evaporado, para purificação. O recipiente foi agitado vigorosamente até homogeneização. Após a separação de fases, o sobrenadante, correspondente ao própolis, foi cuidadosamente retirado com auxílio de uma pipeta para um gobelé. O processo de purificação foi repetido três vezes, com o objetivo de extrair todos os compostos do própolis. Finalmente, devido à elevada volatilidade do éter dietílico, este foi eliminado por evaporação à temperatura ambiente.

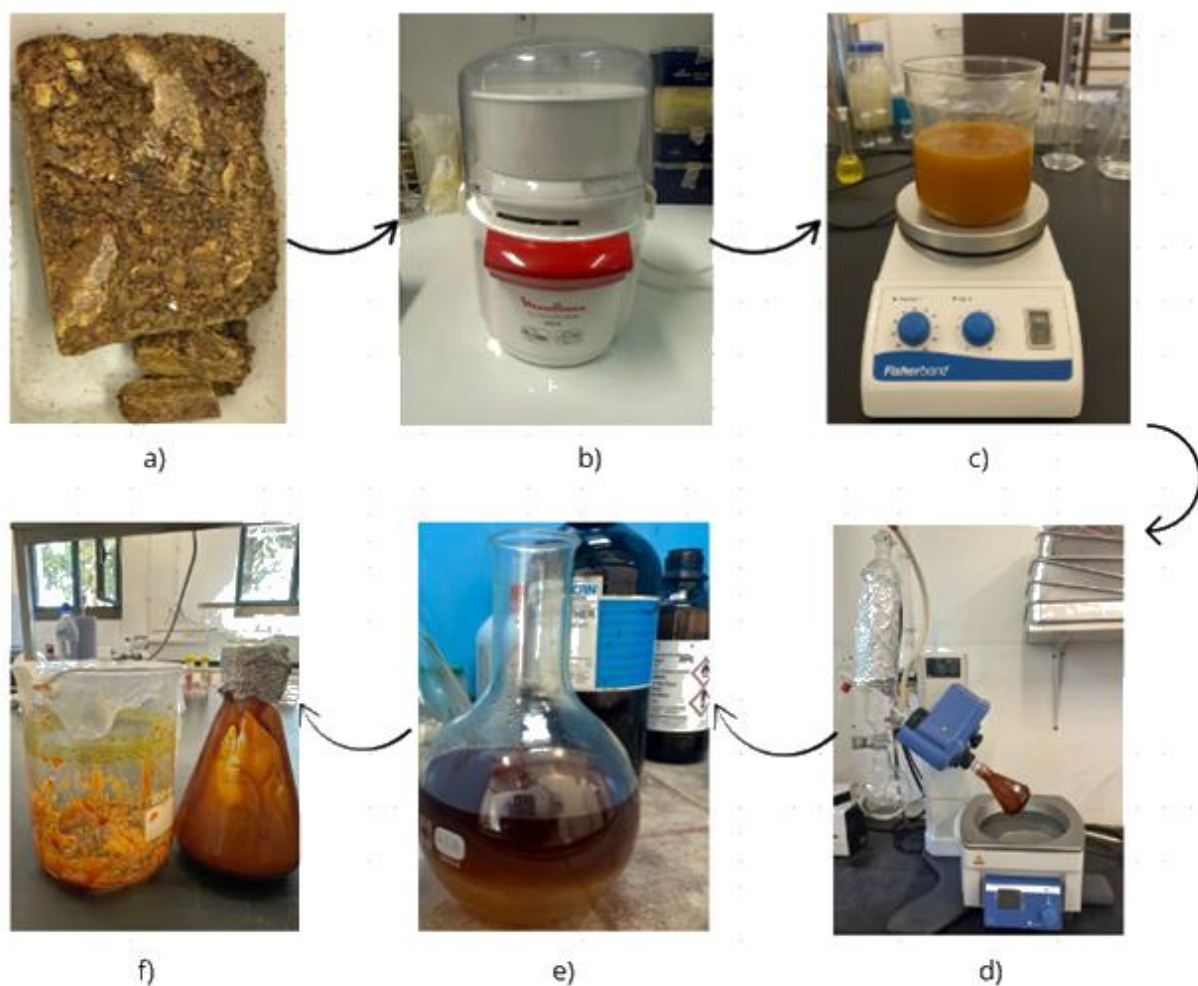


Figura 4- Processo de extração do própolis: a) própolis bruto; b) tritadora; c) extração etanólica; d) evaporação do etanol; e) purificação; f) extrato de própolis.

Seguidamente calculou-se o rendimento com base no peso inicial do própolis antes da purificação (30g) e o peso do própolis obtido após purificação, segundo a Equação 2.

$$Rend. prop \% = \frac{(\text{Peso do goblé com própolis} - \text{Peso do goblé vazio})}{\text{Massa inicial de própolis usada para purificação}} \times 100 \quad \text{Eq.2}$$

3.2. Análises químicas

Para a caracterização do extrato de própolis procedeu-se à quantificação dos teores de fenóis, flavonoides totais e à determinação da atividade antioxidante. Para a preparação

da amostra, dissolveram-se 0,2 g de própolis em 25 ml de etanol a 80% (v/v) num balão volumétrico. A partir desta solução, retirou-se 1 ml, que foi transferido para um balão volumétrico de 25 ml e aferido com água desionizada. Todas as análises químicas foram realizadas em triplicado.

3.2.1. Quantificação de fenóis totais

A determinação dos compostos fenólicos totais foi efetuada pelo método de Folin-Ciocalteu, de acordo com Singleton et al. (1999), com adaptações.

Para o ensaio, adicionaram-se 0,5 ml da solução de própolis previamente preparada, 2,5 ml do reagente de Folin-Ciocalteu a 10% (v/v) e 2,0 ml de solução de carbonato de sódio (Na_2CO_3) a 7,5 % (m/v). A mistura foi mantida em repouso, no escuro e à temperatura ambiente, durante 2 horas. Decorrido este período, a absorvância foi medida a 760 nm num espectrofotómetro (UV-3100PC, VWR).

A quantificação foi efetuada com base numa curva de calibração construída a partir de soluções padrão de ácido gálico (AG), com concentrações compreendidas entre 20 e 160 mg/L, sendo os resultados expressos em miligramas de equivalentes de ácido gálico por grama de amostra.

3.2.2. Quantificação dos flavonoides

A análise dos flavonoides foi realizada de acordo com o método descrito por Woisky & Salatino (1998). Em tubos de ensaio, adicionaram-se 2,5 ml da solução de própolis e 2,5 ml de solução de cloreto de alumínio (AlCl_3) a 2% (m/v). Os tubos foram agitados em vórtex (vortex LBX Instruments V05) e deixados em repouso no escuro, à temperatura ambiente, durante 1 hora. Posteriormente, a absorvância foi medida em cuvete de quartzo, utilizando um espectrofotómetro, a 420 nm.

A quantificação foi realizada com base numa curva de calibração construída a partir de soluções padrão de quercetina (Q), com concentrações compreendidas entre 1 e 50 mg/L, sendo os resultados expressos em miligramas de equivalentes de quercetina por grama de amostra.

3.2.3. Atividade antioxidante

O método utilizado foi o DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo), conforme descrito por Hatano et al. (1988). Para a análise, transferiram-se 0,3 ml da solução de própolis e 2,7 ml da solução de DPPH ($6,0 \times 10^{-5}$ M) para tubos de ensaio. As misturas foram mantidas no escuro, à temperatura ambiente, durante 60 minutos. Decorrido esse período, a absorvância foi medida num espectrofotômetro a 517 nm.

A quantificação foi realizada com base numa curva de calibração construída com o padrão Trolox, utilizando concentrações compreendidas entre 12,8 e 128 mg/L, sendo os resultados expressos em miligramas de equivalentes de Trolox por grama de amostra.

3.2.4. Atividade antimicrobiana

A atividade antimicrobiana (Figura 5), foi avaliada pelo método de diluição em caldo, adaptado de Sahn & Washington (1991) e Zgoda & Porter (2001), autores referenciados por Ostrosky et al. (2008), com modificações. Como indicador de viabilidade microbiana utilizou-se o corante redox cloreto de trifeniltetrazólio (TTC) (Souza et al., 2024; Shinu et al., 2016; Lee et al., 2007 e Mohammadzadeh et al., 2006).

Os microrganismos avaliados neste ensaio foram as bactérias *Staphylococcus aureus* (Gram-positiva), *Escherichia coli* (Gram-negativa) e a levedura *Cândida albicans*. As estirpes foram previamente cultivadas em aproximadamente 50 ml de meio líquido. Para *S. aureus* e *E. coli* utilizou-se o Meio Mueller-Hinton (MH), enquanto para *Cândida*, utilizou-se o meio líquido de leveduras, preparado de acordo com o comerciante. As culturas foram incubadas a 37°C com agitação durante 24 h.

Após este período, pequenas quantidades das suspensões foram transferidas para tubos contendo 5 ml de solução salina a 0,85% (m/v), até atingir uma turbidez equivalente a 0,5 na escala de McFarland ($\sim 1 \times 10^8$ UFC/ml).

O extrato de própolis foi previamente diluído em solvente alimentar 38% (v/v) a fim de obter uma concentração de 10% m/v, solvente considerado adequado devido à natureza da amostra e que também foi utilizado a posteriori na preparação da película.

O procedimento para a determinação da atividade antimicrobiana foi realizado em tubo de ensaio. Inicialmente, 1 ml de meio de cultura foi adicionado a cada tubo, seguido de 1 ml do extrato de própolis, no primeiro tubo, sendo este diluído em série até atingir a menor concentração testada. Posteriormente, foram adicionados 100 µl da suspensão microbiana a cada tubo.

Para o controlo do ensaio, incluíram-se: um controlo positivo, constituído por meio de cultura com inóculo; um controlo negativo, constituído apenas por meio de cultura, destinado à deteção de contaminações; e um controlo adicional, contendo aguardente e HPMC a 2% (m/v), com o objetivo de avaliar potenciais efeitos antimicrobianos.

Os tubos foram incubados em incubadora orbital (SI500) a 37 °C com agitação contínua durante 24 h. Após este período, adicionou-se o corante TTC a 2% (m/v) e a incubação prosseguiu nas mesmas condições por mais 4 h. Esta etapa destinou-se à determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI), definida como a menor concentração do extrato capaz de inibir visivelmente o crescimento do microrganismo.

Posteriormente, os tubos que não apresentaram alteração de coloração foram inoculados em placas com meio MH e meio de leveduras, a fim de determinar a Concentração Mínima Bactericida (CMB), definida como a menor concentração do antimicrobiano capaz de eliminar $\geq 99,9\%$ da população microbiana inicial.



Figura 5- Determinação da atividade antimicrobiana.

3.3. Obtenção das películas

Para obtenção das películas (Figura 6), foi utilizado os métodos descritos por El Sheikha et al. (2022) e por Dashipour et al. (2015), adaptados.

Começou-se por dissolver o HPMC (hidroxipropilmetilcelulose) em solvente alimentar 38% (v/v), obtendo uma concentração de 2% (m/v). Após dissolução total, adicionou-se o glicerol (20% do peso do HPMC seco), e a mistura ficou sob agitação contínua durante 20 minutos. Seguidamente incorporaram-se diferentes percentagens (0, 2 e 4%) de extrato de própolis na solução de HPMC, sob agitação contínua. Passados 10 minutos, 35 ml de cada mistura foram transferidos para travessas de vidro e levados a estufa com ventilação a 40°C, durante 24 h, para evaporação do solvente alimentar. Passado esse tempo procedeu-se a desmoldagem e a selagem de duas folhas da película de própolis de modo a obter sacos. Esses sacos foram ainda introduzidos dentro de sacos de vácuo. A esses revestimentos foram atribuídos os nomes HPMC, P2% e P4% respetivamente e foi feito, ainda um controlo só com o saco de vácuo ao qual foi atribuída a letra C.

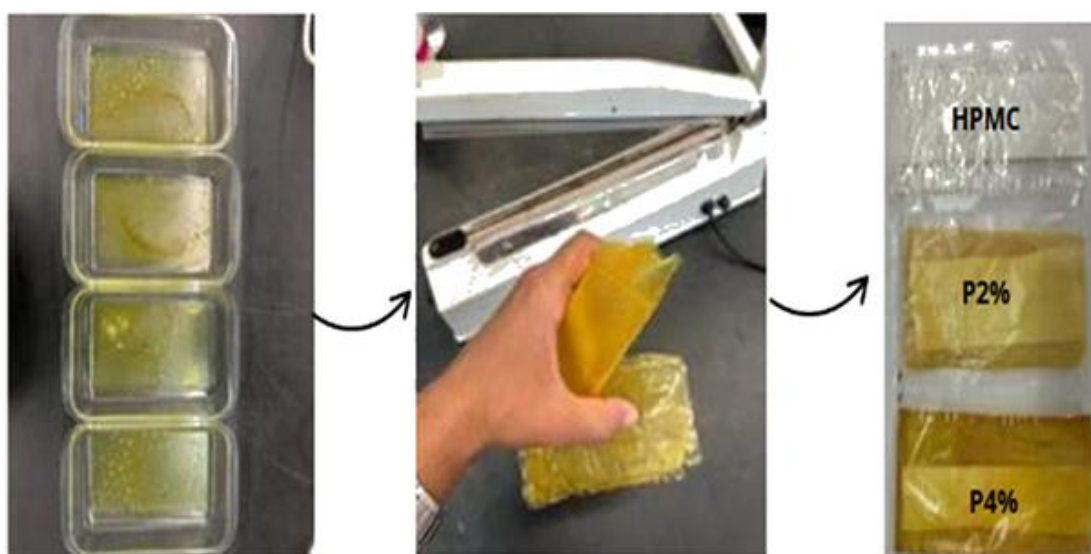


Figura 6- Processo de obtenção das películas.

3.3.1. Análises químicas

As análises foram feitas em triplicado nas amostras HPMC, P2% e P4%. Para a preparação das amostras, foram efetuadas diluições de 1/50 e 1/100 em solvente alimentar 38% (v/v) nas amostras P2% e P4%, respetivamente, de modo a garantir que as leituras se encontrassem dentro do intervalo de calibração.

As análises químicas realizadas foram:

- A quantificação de fenóis totais, tal como descrito no ponto 3.2.1.
- A quantificação de flavonoides, tal como descrito no ponto 3.2.2.
- A atividade antioxidante, tal como descrito no ponto 3.2.3.

3.3.2. Aplicação das películas

Inicialmente, foram adquiridos bifes de frango num supermercado local, os quais foram transportados para o laboratório em condições de refrigeração.

Para aplicação das películas (Figura 7), procedeu-se à desinfeção da câmara de fluxo laminar (Microflow Biological Safety Cabinet,) com álcool a 70% (v/v), posteriormente, as películas foram colocados no interior da câmara e expostos à radiação ultravioleta (UV) durante 1 hora (Barry, 2024), sendo invertidos a cada 30 minutos, de forma a assegurar uma exposição uniforme à radiação em ambos os lados.

Em condições assépticas, porções de 150 g de bifes de frango, foram preparadas, acondicionadas em sacos apropriados e seladas a vácuo com recurso a uma seladora. As amostras foram armazenadas a 4°C. As correspondentes ao Tempo 0 (T0) foram mantidas durante 1 hora, enquanto as restantes foram armazenadas durante 3 (T3) e 6 (T6) dias, respetivamente.

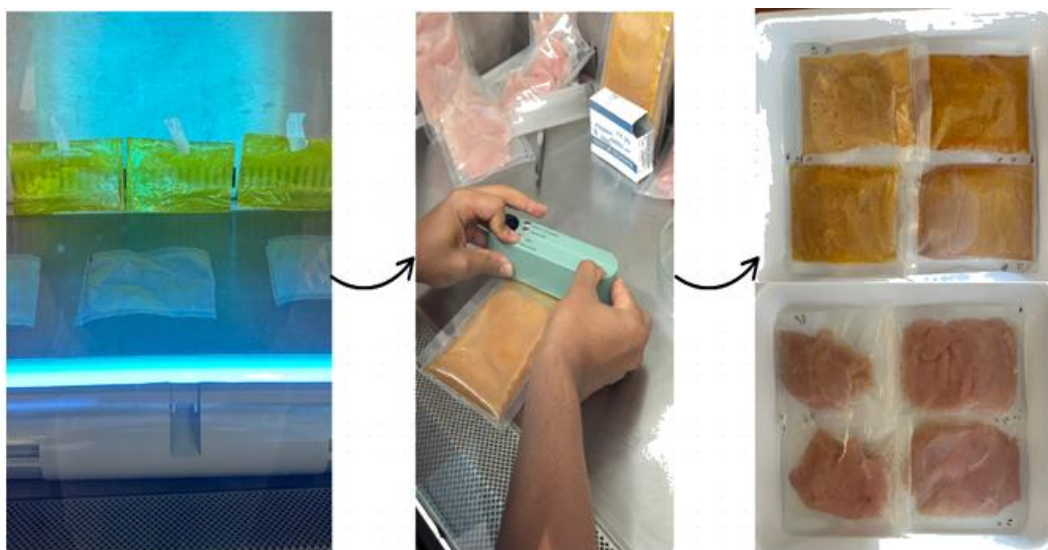


Figura 7- Aplicação das películas de própolis.

3.3.1. Análises microbiológicas

Para a avaliação da qualidade microbiológica das amostras, foram considerados os seguintes parâmetros: contagem total de microrganismos aeróbios mesófilos, contagem de bolores e leveduras, contagem de coliformes totais e *Escherichia coli*, pesquisa e contagem de *Staphylococcus aureus*, pesquisa de *Salmonella* spp. e pesquisa e contagem de *Listéria monocytogenes*.

Para a preparação inicial, procedeu-se à pesagem de 25 g de bife de frango, que foram transferidos para 225 ml de água peptonada estéril. A mistura foi homogeneizada num stomacher (Seward Stomacher® Lab System 400) e, posteriormente, vertida para um frasco de Schott, correspondendo à diluição 10^{-1} .

A partir da suspensão inicial em água peptonada, procederam-se a diluições decimais sucessivas, até a 10^{-6} , ajustadas de acordo com os microrganismos alvo. Todas as análises microbiológicas foram realizadas em duplicado, garantindo maior fiabilidade dos resultados.

No caso específico da análise de *Listéria monocytogenes*, utilizou-se o mesmo procedimento de preparação da amostra, substituindo, a água peptonada pelo meio de pré-enriquecimento Half Fraser Broth.

3.3.1.1. Contagem de aeróbios mesófilos totais

A contagem de microrganismos aeróbios mesófilos totais foi efetuada em conformidade com a Norma Portuguesa NP 4405:2002, recorrendo ao método de contagem em placa por incorporação do inóculo. Para a execução do ensaio, de cada diluição considerada foram inoculados 1 ml em placas de Petri estéreis, aos quais se adicionaram 15 a 20 ml de Plate Count Agar (PCA) fundido e previamente arrefecido. Após homogeneização por movimentos circulares suaves, o meio foi deixado solidificar.

As placas foram posteriormente incubadas em posição invertida, a 30°C durante 72 horas. Concluído o período de incubação, foram selecionadas as placas que apresentavam contagens compreendidas entre 15 e 150 colónias, procedendo-se então ao respetivo registo.

Os resultados foram expressos em Unidades Formadoras de Colónias por grama de amostra (UFC/g), de acordo com a equação definida na NP 4405:2002, considerando o número total de colónias obtidas, o número de placas analisadas, o fator de diluição correspondente e o volume inoculado (Equação 3).

$$\frac{UFC}{g} = \frac{\Sigma c}{v \cdot (n1+n2) \cdot d \cdot m} \quad \text{Eq.3}$$

- Σc - soma das colónias em todas as placas contadas;
- v- volume de inóculo semeado em cada placa;
- n1- número de placas da primeira diluição contada;
- n2- número de placas da segunda diluição contada;
- d- diluição a partir da qual se obtiveram as primeiras contagens.

3.3.1.2. Contagem de bolores e leveduras

Foi feita através do método de espalhamento em placa segundo a ISO 21527-2; 2008. A metodologia basou-se na aplicação do meio de cultura seletivo e diferencial Ágar Rosa Bengala, previamente esterilizado e distribuído em placas de Petri estéreis. Seguidamente foram inoculados 0,1 ml de cada diluição, nas placas contendo o meio de cultura, e o inóculo foi distribuído uniformemente na superfície utilizando um espalhador de vidro.

As placas foram incubadas a 25°C, sendo o período de incubação de 48 horas para leveduras e até 120 horas para bolores.

Os resultados foram expressos em Unidades Formadoras de Colónias por grama de amostra (UFC/g), calculados de acordo com a Equação 3, permitindo a quantificação precisa da carga microbiana presente nas amostras.

3.3.1.3. Contagem de coliformes totais e *E. coli*

Para a realização desta análise foi utilizado o kit SimPlate, desenvolvido pela empresa Bio Control aprovado pelo método AOAC 2005.03 (2005). O meio desidratado foi previamente reconstituído em 100 ml de água destilada estéril. Em seguida, 9 ml deste meio foram transferidos para tubos de ensaio estéreis, aos quais se adicionou 1 ml de cada

diluição selecionada das amostras. Após homogeneização, a solução de cada tubo foi vertida numa placa SimPlate, distribuindo-se o líquido pelos 84 poços através de movimentos circulares, sendo o excesso absorvido pela esponja lateral da placa.

As placas foram incubadas a 37°C durante 24 horas. Após incubação, a presença de coliformes totais foi identificada pela alteração de cor do meio nos poços (de azul para rosa). Posteriormente, as placas foram expostas a radiação UV de 365 nm, para a pesquisa da *E. coli*, através da contagem dos poços que apresentavam fluorescência (Figura 8).

Os resultados obtidos foram convertidos em Unidades Formadoras de Colônias por grama de amostra (UFC/g) com base na tabela de conversão fornecida pelo fabricante, permitindo a quantificação da carga microbiana presente nas amostras.

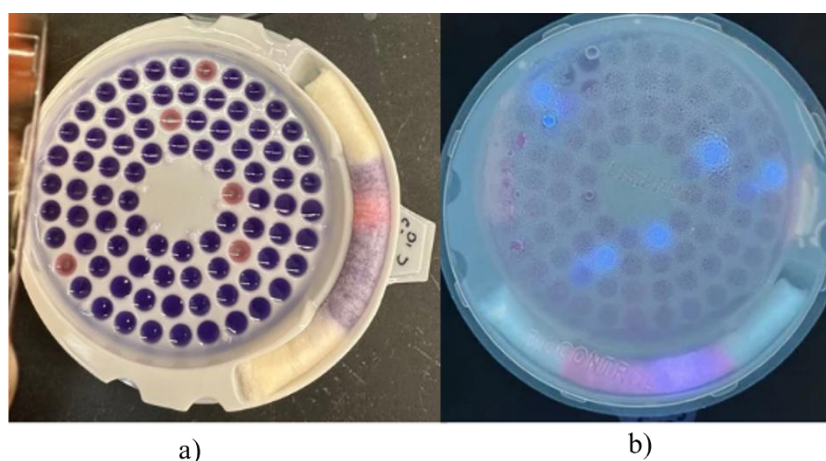


Figura 8- Placas SimPlate, a) contagem de coliformes; b) contagem de *E. coli*.

3.3.1.4. Pesquisa e contagem de *Staphylococcus aureus*

A quantificação de *Staphylococcus aureus* coagulase-positiva foi realizada de acordo com a metodologia NP 4400-1 (2002), utilizando o meio de cultura Baird-Parker (BP) enriquecido com gema de ovo. Inoculou-se 0,1 ml de cada diluição em placas de Petri contendo o meio de cultura. As placas foram incubadas a 37°C durante 24 a 48 horas.

Após a incubação, procedeu-se à contagem das colônias, permitindo a determinação do número de Unidades Formadoras de Colônias (UFC). As colônias de *S. aureus* apresentam características morfológicas específicas, incluindo coloração preta com um halo claro circundante, permitindo a sua identificação visual.

Para a identificação de *S. aureus* coagulase-positiva, uma pequena amostra de cada colônia foi transferida para tubos contendo caldo Brain Heart Infusion (BHI), que foram incubados a 37 °C durante 24 horas. Posteriormente, 0,1 ml de cada cultura foi transferido para um novo tubo estéril, ao qual foram adicionados 0,3 ml de plasma de coelho. Os tubos foram incubados novamente a 37°C por 4 a 6 horas, após as quais se avaliou a coagulação do plasma. A presença de coagulase positiva é confirmada quando o coágulo formado ocupava mais de três quartos do volume inicial do líquido.

3.3.1.5. Pesquisa de *Salmonella* spp.

Para a detecção de *Salmonella* spp., recorreu-se ao método 1-2TEST, homologado pelo AOAC 989.13 (2000) e desenvolvido pelas empresas Bio Control e Ambifood. A análise incluiu um pré-enriquecimento das amostras (25 g) em água peptonada (225 ml), incubadas a 37°C durante 24 horas. Posteriormente, procedeu-se à preparação do kit 1-2TEST de acordo com as instruções do fabricante (Figura 9). O resultado do teste foi considerado positivo quando se observou a formação de uma banda de imunoprecipitação, indicando a interação específica entre os anticorpos presentes no teste e os antígenos de *Salmonella* spp.

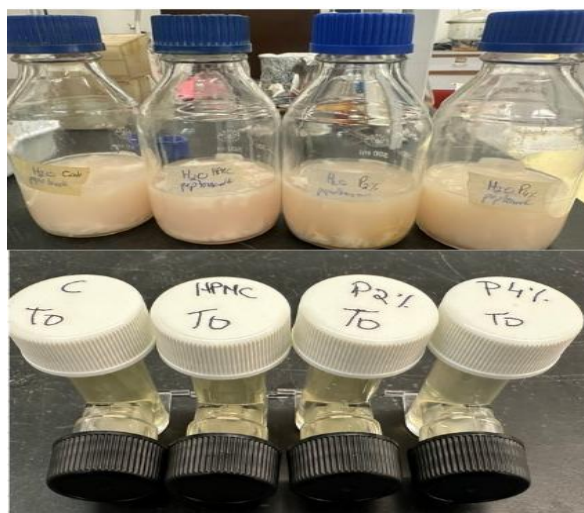


Figura 9- Detecção de *Salmonella* spp.

3.3.1.6. Pesquisa e contagem *Listéria monocytogenes*

A pesquisa de *Listéria* spp. foi realizada de acordo com o método horizontal de detecção e quantificação ISO 11290-1 e 2 (2017).

Após a preparação das amostras, conforme descrito na seção 3.3.1, os frascos foram incubados a 20°C durante 1 hora. Seguidamente, para a quantificação de *Listéria monocytogenes* 100 µl da suspensão foram transferidos para placas contendo Oxford Listéria Chromogenic Agar (OCLA), meio utilizado para isolamento seletivo e diferenciado de *Listéria* spp., em particular *Listéria monocytogenes*. As placas foram incubadas a 37°C durante 48 horas, sendo efetuada a quantificação das colônias típicas sempre que presentes.

Posteriormente, os frascos foram suplementados com Fraser Broth Selective Supplement e incubados a 30°C durante 24 horas. Após incubação, com uma ansa foi feito o estriamento por esgotamento em placa com meio OCLA (primeira detecção) e foram transferidos 100 µl da suspensão para tubos contendo 10 ml de caldo Fraser suplementado (meios CM895- Fraser Broth Base e SR156- Fraser Broth Seletive Supplement). Ambos foram incubados a 37 °C por 48 horas. De seguida foi feito estriamento por esgotamento em meio OCLA (segunda detecção) a partir dos tubos, e as placas incubadas a 37 °C durante 48 horas. O resultado foi considerado positivo quando se observaram colônias típicas de *Listéria monocytogenes*, apresentando coloração azul-esverdeada com halo circundante.

3.3.2. Análises químicas

Realizaram-se análises químicas, com o propósito de investigar a ocorrência de transferência de compostos bioativos das películas de própolis para os bifés. Procedeu-se igualmente à quantificação das três classes fenólicas (ácidos hidroxibenzoicos, hidroxicinâmicos e flavonoides) e do conteúdo fenólico total das películas de própolis, através do espectro UV-Vis, bem como a análise colorimétrica. nos períodos de 0, 3 e 6 dias.

Todas as análises foram efetuadas em triplicado, garantindo a reprodutibilidade e fiabilidade dos resultados.

3.3.2.1. Quantificação das três classes de compostos fenólicos

O método utilizado para este ensaio foi o descrito por Paula et al. 2017, com adaptações às matrizes analisadas (películas de própolis e bifes revestidos). O procedimento permite a quantificação simultânea de diferentes classes de compostos fenólicos (ácidos hidroxibenzóicos, ácidos hidroxicinâmicos e flavonoides), bem como a estimativa do teor fenólico total, a partir de um único espectro de absorção UV-Vis, em conjugação com modelos de calibração multivariada. Estes compostos apresentam espectros de absorção característicos, ainda que parcialmente sobrepostos, na região do ultravioleta (240–400 nm).

As amostras de películas e bifes revestidos foram previamente cortadas em fragmentos homogêneos e pesadas em balança analítica com precisão de $\pm 0,0001$ g. Os pesos registrados, da película e do bife revestido foram, $0,05 \pm 0,004$ g e $1,07 \pm 0,003$ g, respectivamente.

A extração dos compostos fenólicos foi efetuada pela adição de 5 ml de aguardente a 38% (v/v) a cada amostra, mantendo-se o solvente em contacto com as mesmas durante 1 hora, à temperatura ambiente.

Após o período de extração, procedeu-se à preparação das diluições experimentais. Para a amostra designada P2%, adicionaram-se 0,5 ml do extrato a 10 ml de aguardente. Para a amostra P4%, utilizou-se 0,25 ml do extrato, adicionando igualmente 10 ml de aguardente. De seguida, transferiu-se 1 ml dos extratos diluídos para balões volumétricos de 10 ml. A cada balão, adicionou-se 1 ml de uma mistura de HCl a 0,1% (v/v) com etanol a 95% (v/v) e completou-se o volume até 10 ml com uma solução de HCl a 2% (v/v) (Mazza et al., 1999; Obied et al., 2005).

As absorvâncias registadas foram inseridas no modelo de calibração para estimar as concentrações das três classes fenólicas expressas em mg/L dos respetivos padrões (ácido gálico, ácido ferúlico e quercetina).

Para efeitos de acerto dos cálculos foram retirados os efeitos dos interferentes presentes no bife e na película (Anthis & Clore, 2013; Hassoun et al., 2020; Swatland, 1989).

3.3.3. Análise colorimétrica

As análises de cor das amostras dos bifes foram realizadas com um colorímetro Konica Minolta, modelo CR-400. Os resultados obtidos foram expressos nos sistemas CIELAB. Foram avaliadas as coordenadas L^* , a^* , b^* , C^* e $h(C)$ (CIELAB). A coordenada L^* (ou L) representa a luminosidade, a^* indica o conteúdo de vermelho (+) a verde (-), e b^* refere-se ao conteúdo de amarelo (+) a azul (-), o C^* que indica a intensidade ou pureza da cor e o parâmetro h que indica a tonalidade ou a cor propriamente dita e fornece uma visão tridimensional da cor. O aparelho foi previamente calibrado com um padrão branco de referência.

3.4. Análise estatística

A análise estatística dos dados foi realizada com recurso ao software R (R Core Team, 2025), versão 4.5.1. Os dados foram organizados em estruturas *data frame*, procedendo-se à codificação das variáveis independentes (tratamento (C, HPMC, P2 % e P4 %) e tempo de armazenamento (T0, T3 e T6)) como fatores, assegurando a correta parametrização dos modelos lineares. Para a avaliação dos efeitos principais e da interação entre fatores nas variáveis físico-químicas, cromáticas e microbiológicas, foi aplicada uma Análise de Variância bifatorial (ANOVA two-way).

Antes da aplicação dos modelos, verificaram-se os pressupostos paramétricos através da análise dos resíduos. A normalidade foi avaliada pelo teste de Shapiro–Wilk, enquanto a homogeneidade das variâncias entre grupos foi analisada pelo teste de Levene, implementado no pacote *car*. Adicionalmente, os resíduos foram inspecionados graficamente por meio dos diagramas de diagnóstico gerados pelo modelo *aov*, de modo a confirmar a adequação dos pressupostos inerentes aos métodos paramétricos.

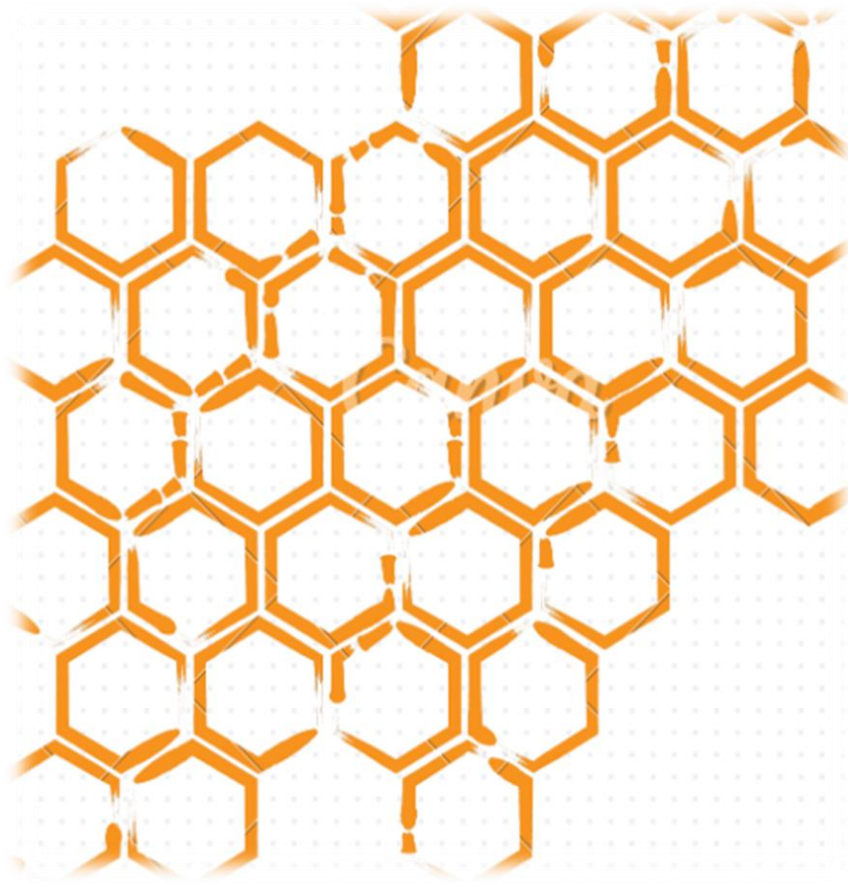
Como abordagem complementar, foi utilizada uma Análise de Variância Permutacional (PERMANOVA) através da função *adonis2* (pacote *vegan*), empregando matrizes de distância euclidiana e Bray–Curtis. Esta abordagem multivariada, baseada em permutações, permitiu reforçar a robustez da análise sempre que a homogeneidade das dispersões não se encontrava totalmente assegurada pelos testes clássicos.

Para a comparação entre níveis específicos dos fatores foram realizadas comparações múltiplas pós-hoc utilizando o procedimento *pairwise.adonis* (pacote *pairwiseAdonis*), aplicando-se a correção de Holm para controle do erro do tipo I associado a múltiplos testes. Este procedimento permitiu identificar contrastes relevantes entre tratamentos e momentos de armazenamento.

A representação gráfica dos dados foi efetuada com o pacote *ggplot2*, incluindo gráficos de interação, diagramas de barras com erro padrão, gráficos de pontos e boxplots, facilitando a visualização das tendências gerais e a interpretação complementar dos modelos estatísticos.

Adicionalmente, para as variáveis associadas à caracterização do extrato e das películas nomeadamente compostos fenólicos totais, flavonoides e atividade antioxidante (DPPH) foi aplicada uma ANOVA unifatorial (one-way ANOVA), antecedida dos testes de normalidade (Shapiro–Wilk) e homogeneidade de variâncias (Levene). As diferenças entre grupos foram posteriormente avaliadas através do teste de Tukey (Tukey HSD) e do agrupamento de médias pelo método *HSD.test* (pacote *agricolae*), cujos resultados foram utilizados para a construção de gráficos com indicação das letras estatísticas correspondentes.

Esta abordagem integrada, combinando métodos paramétricos e não paramétricos, assegurou rigor na avaliação dos efeitos experimentais e permitiu a caracterização estatística completa e robusta das variáveis analisadas.



Capítulo 4

- Resultados e Discussão

4. Resultados e discussão

Nesta secção, apresentam-se os resultados obtidos ao longo do presente estudo, cujo objetivo principal foi testar películas incorporadas com extrato de própolis na conservação de bifes de frango refrigerados. Os resultados são organizados de forma a responder aos objetivos específicos definidos, permitindo uma análise sequencial desde a caracterização do extrato até à avaliação da sua aplicação prática na matriz alimentar.

Inicialmente, apresentam-se os dados referentes à preparação e caracterização do extrato etanólico de própolis, incluindo a quantificação dos compostos fenólicos e flavonoides totais, bem como a determinação da sua atividade antioxidante (método DPPH) e antimicrobiana (técnica de diluição em tubo). Em seguida, são expostos os resultados relativos ao efeito sinérgico entre o própolis e o agente gelificante HPMC, analisando as propriedades dos sistemas individuais e combinados.

Posteriormente, descrevem-se os resultados da incorporação do extrato de própolis nas películas em diferentes concentrações e a sua aplicação na conservação de bifes de frango refrigerados. Por fim, são apresentados os dados referentes à evolução microbiológica e à transferência de compostos bioativos para a matriz alimentar, de modo a avaliar a eficácia das películas na preservação da qualidade e aumento do tempo de prateleira dos produtos.

Os resultados são apresentados de forma objetiva e estruturada, servindo de base para a discussão subsequente, onde serão interpretados à luz dos fundamentos teóricos e de estudos prévios sobre o uso de compostos naturais na conservação de alimento.

4.1. Rendimento da extração do própolis

A primeira etapa experimental deste estudo consistiu na extração do própolis, uma vez que o rendimento obtido influencia diretamente a concentração de compostos bioativos disponíveis para incorporação nas películas. Assim, a determinação do rendimento de extração permite avaliar a eficácia do método utilizado e a qualidade do extrato produzido.

A otimização realizada por Paula et al., (2017) que serviu de base para este estudo, evidenciou que o etanol a 80% constitui a condição mais eficiente para a extração de compostos fenólicos do própolis, maximizando o rendimento e a capacidade antioxidante dos extratos. No mesmo estudo, verificou-se que o pH do solvente não exerceu influência significativa sobre o processo extrativo, pelo que a eficiência da extração depende essencialmente da proporção etanol/água.

O rendimento obtido na extração da própolis foi de 83,3%, utilizando etanol a 80%, enquanto o rendimento alcançado após a purificação de 30 g de extrato foi de 95,45%, recorrendo ao éter dietílico como solvente.

No caso do própolis proveniente de *Apis mellifera*, os rendimentos de extração descritos na literatura apresentam uma ampla variação, resultante tanto da diversidade da origem botânica como das condições operatórias aplicadas. De acordo com a revisão de Contieri et al. (2022), as extrações convencionais com etanol ou misturas hidroalcoólicas podem originar rendimentos de extrato seco que, em condições moderadas, se situam frequentemente entre 5% e 15%, podendo atingir valores substancialmente superiores, na ordem dos 30% – 40%, quando se utilizam concentrações elevadas de etanol ou parâmetros mais favoráveis ao processo. Por sua vez, métodos de extração avançados, como a extração com CO₂ supercrítico, tendem a apresentar rendimentos globais inferiores quando se recorre apenas a CO₂ puro, situando-se geralmente entre 3% e 10%, embora possam aumentar significativamente com a utilização de co-solventes alcoólicos, conforme demonstrado por Paviani et al., (2012).

O rendimento de 83,3% obtido neste estudo foi substancialmente superior aos valores relatados na literatura, o que indica elevada eficiência do processo extrativo. Essa diferença pode estar relacionada às características da amostra, como o teor de resinas e compostos fenólicos, substâncias altamente solúveis em solventes hidroalcoólicos, e às condições experimentais adotadas, especialmente o uso de etanol 80% e a maceração sob agitação constante por 24 horas, que favorecem a difusão dos compostos bioativos para o solvente.

De modo geral, confirma-se que soluções hidroalcoólicas entre 70 e 80% de etanol são as mais eficientes para a extração dos compostos fenólicos, resultando em rendimentos elevados e composição química estável.

Em síntese, os resultados obtidos confirmam a eficiência do processo extrativo adotado, garantindo um elevado rendimento e, conseqüentemente, uma maior concentração de compostos bioativos no extrato final. Estes dados sustentam a continuidade do estudo, permitindo avançar para a quantificação dos fenóis e flavonoides totais, parâmetros essenciais para avaliar a qualidade química e o potencial funcional do própolis obtido

4.2. Composição fenólica e atividade antioxidante do própolis e de películas

Um dos objetivos centrais deste estudo consistiu em comparar a bioatividade das formulações de própolis incorporadas em HPMC (P2% e P4%) com o extrato etanólico de própolis (EEP), de forma a avaliar o efeito da incorporação polimérica sobre o teor de compostos fenólicos, flavonoides totais e a capacidade antioxidante determinada pelo ensaio DPPH.

A ANOVA one-way demonstrou que o fator “tratamento” exerceu um efeito altamente significativo ($p < 0,001$) sobre as três variáveis analisadas (fenóis totais, flavonoides e DPPH). Por isso, os valores de F foram elevados ($F(2,6) = 189,2$ para fenóis totais, $F(2,6) = 421,4$ para flavonoides e $F(2,6) = 3021$ para DPPH), confirmando uma forte influência da concentração de própolis sobre a bioatividade, sendo todos os valores médios significativamente diferentes.

A Tabela 5 apresenta o teor fenólico total, flavonoides e atividade antioxidante do EEP e das películas a 2% e 4% de extrato.

Tabela 5- Teor de fenóis totais, flavonoides, atividade antioxidante DPPH, do EEP e das películas.

Amostra	Fenóis Totais mg EAG/g de extrato seco \pm dp	Flavonoides mg EQ/g de extrato seco \pm dp	DPPH mg ETrolox/g de extrato seco \pm dp
EEP	391,68 \pm 6,11 ^a	107,99 \pm 3,01 ^a	217,19 \pm 0,90 ^a
P2%	276,20 \pm 8,15 ^c	63,63 \pm 0,88 ^c	173,73 \pm 0,42 ^c
P4%	329,53 \pm 7,43 ^b	78,62 \pm 1,02 ^b	176,56 \pm 0,88 ^b

DPPH- 2,2-Difenil-1-picril-hidrazila; EAG- equivalente ácido gálico; EQ- equivalente Quercetina; ETrolox- equivalente a Trolox; EEP- extrato etanólico de própolis; P2%- película com 2% de própolis; P4%- película com 4% de própolis.

O teor de compostos fenólicos totais determinado para o EEP foi de $391,68 \pm 6,11$ mg EAG/g, valor expressivamente elevado quando comparado a diversas amostras relatadas na literatura. Este resultado demonstra que o extrato analisado é rico em metabólitos secundários de natureza fenólica, reconhecidos por sua ampla gama de atividades biológicas, especialmente propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias e antimicrobianas (Bankova et al., 2000; Shehata et al., 2020). Os compostos fenólicos atuam como potentes doadores de hidrogênio e elétrons, neutralizando espécies reativas de oxigênio (ROS) e outros radicais livres, além de estabilizarem sistemas biológicos por meio de mecanismos de quelagem de metais de transição (Nazari-Bonab et al., 2023; Pietta, 2000).

A elevada concentração de fenóis observada neste estudo sugere que a matéria-prima utilizada apresenta origem botânica com grande potencial bio sintético, possivelmente relacionado à composição resinífera predominante nas plantas visitadas pelas abelhas. A variação no conteúdo fenólico total do própolis tem sido amplamente atribuída à diversidade florística e às condições edafoclimáticas de cada região, as quais influenciam a produção e a natureza química das resinas vegetais (Bankova et al., 2000). Essa variabilidade fitoquímica determina o perfil de compostos ativos e, conseqüentemente, a intensidade da resposta antioxidante e terapêutica.

O teor de flavonoides determinado para o EEP ($107,99 \pm 3,01$ mg EQ/g) também se mostrou elevado, situando-se entre os valores superiores descritos para o própolis de diferentes origens geográficas, particularmente brasileiras e portuguesas, que variam entre 90 e 120 mg EQ/g (Falcão et al., 2013; Zuhendri et al., 2021). A combinação de altos teores de compostos fenólicos e flavonoides confere ao extrato uma acentuada atividade antioxidante, expressa por um valor de $217,19 \pm 0,90$ mg ETrolox/g no ensaio de DPPH. Essa magnitude confirma a contribuição sinérgica entre ambos os grupos de compostos bioativos, cujo mecanismo envolve transferência de elétrons e sequestro de radicais livres, protegendo estruturas celulares contra danos oxidativos. A forte correlação entre o conteúdo fenólico e a atividade antioxidante já foi demonstrada por Hossain et al., (2022) que observaram uma relação positiva entre esses parâmetros em amostras de própolis com diferentes origens botânicas.

Os resultados obtidos neste estudo também corroboram com os dados descritos por Falcão et al., (2013) e Moreira et al., (2008) para própolis portuguesas, nas quais foram quantificados teores de fenóis totais de 329 mg EAG/g e 151 mg EAG/g, respetivamente,

associados a expressiva capacidade antioxidante, avaliada por ensaios de sequestro do radical DPPH e poder redutor. O EEP aqui avaliado apresentou valores ainda mais elevados, indicando uma composição particularmente rica em compostos fenólicos e flavonoides. Essa diferença pode estar associada à predominância de determinadas espécies vegetais resiníferas na flora local, capazes de fornecer compostos precursores mais reativos e estruturalmente diversificados. Além disso, variações na sazonalidade, temperatura e regime de precipitação também afetam a biossíntese de metabólitos secundários, justificando as diferenças inter-regionais observadas (Bankova et al., 2000; Zuhlendri et al., 2021).

Quando analisadas as formulações preparadas a partir do extrato, observou-se que a amostra P4%, apresentou o perfil bioativo mais próximo do EEP, em termos quantitativos. Mas por outro lado, em termos estatísticos, os intervalos de confiança mais estreitos e os valores de p mais elevados ($p > 0,05$) obtidos na comparação EEP–P4%, indicam diferenças estatisticamente significativas entre os dois grupos. Este resultado sugere que a concentração de 4% mantém a integridade estrutural e funcional dos compostos fenólicos e flavonoides, preservando a atividade antioxidante característica do extrato original. Assim, a formulação P4% conserva a matriz química essencial responsável pela neutralização de radicais livres e pela estabilização de espécies oxidantes, demonstrando viabilidade tecnológica sem perda substancial de eficácia biológica.

A formulação P2% apresentou diferenças estatisticamente significativas em relação ao EPE ($p < 0,05$), caracterizadas por redução pouco acentuada nos teores de compostos fenólicos e flavonoides, bem como na capacidade antioxidante. Essa ligeira queda de desempenho está associada à diluição do extrato, que reduz a concentração de metabólitos ativos e, portanto, a disponibilidade de grupos funcionais reativos envolvidos na captura de radicais livres. A diminuição da capacidade antioxidante observada em P2% confirma a dependência direta entre concentração de compostos fenólicos e desempenho biológico, em concordância com estudos prévios (Hossain et al., 2022; Zuhlendri et al., 2021).

Importa salientar que a película formulada exclusivamente com HPMC não apresentou qualquer atividade mensurável nos parâmetros bioativos avaliados (compostos fenólicos totais, flavonoides e DPPH). Este comportamento era expectável, uma vez que o HPMC é amplamente reconhecido como um polímero não iónico, quimicamente inerte e desprovido de propriedades bioativas intrínsecas (Sahoo et al., 2015).

De forma geral, os resultados evidenciam que tanto a composição química quanto a concentração do própolis influenciam diretamente sua bioatividade. A formulação P4% destacou-se por preservar os níveis de compostos fenólicos e flavonoides em proporções semelhantes às do EEP, garantindo manutenção da capacidade antioxidante global. Por outro lado, reduções acentuadas na concentração, como no caso da P2%, comprometem significativamente a eficiência biológica, demonstrando a importância de otimizar a concentração dos extratos na formulação final. Esses achados reforçam a hipótese de que a atividade antioxidante da própolis resulta de um efeito sinérgico entre seus constituintes polifenólicos e que variações quantitativas podem impactar fortemente seu potencial funcional.

Assim, pode-se concluir que a composição fenólica e flavonoídica constitui um marcador fundamental da qualidade e eficácia biológica do própolis. A elevada concentração desses compostos no EEP e na formulação P4% explica a alta atividade antioxidante observada, enquanto a diluição excessiva compromete a bioatividade. Estes resultados, em conjunto com evidências na literatura (Bankova et al., 2000; Falcão et al., 2013; Hossain et al., 2022; Zuhendri et al., 2021), confirmam que a preservação do equilíbrio fitoquímico é determinante para a estabilidade e o desempenho funcional dos produtos derivados de própolis.

Estudos anteriores demonstraram que a incorporação de extrato etanólico de própolis em matrizes de HPMC melhora as propriedades funcionais e a conservação de alimentos, atuando simultaneamente como barreira antioxidante e antimicrobiana (Paula et al., 2024). Estas complementam os resultados obtidos neste estudo, indicando que a incorporação em HPMC promove alterações quantitativas e qualitativas na bioatividade, sem eliminar as propriedades funcionais do extrato, sendo o efeito fortemente dependente da concentração do própolis. Nesse contexto, a formulação P4% demonstra o melhor equilíbrio entre estabilidade físico-química, maneabilidade e manutenção da capacidade antioxidante, retendo uma proporção significativa dos compostos fenólicos e flavonoides do extrato bruto. Essa formulação assegura a conservação parcial, mas funcionalmente relevante, da matriz polifenólica, tornando-a a opção mais adequada para aplicações biotecnológicas ou farmacêuticas que explorem as propriedades antioxidantes e antimicrobianas do própolis.

Os resultados relativos à atividade antioxidante e à composição fenólica do própolis e das películas incorporadas evidenciaram a presença de compostos bioativos com elevado

potencial redutor, responsáveis pela capacidade de neutralizar espécies reativas e, conseqüentemente, conferir propriedades de preservação ao material desenvolvido. Contudo, para compreender de forma mais aprofundada a relação entre a atividade antioxidante observada e a composição química efetiva das películas e da matriz alimentar, torna-se necessário proceder à quantificação das principais classes fenólicas e à determinação do conteúdo fenólico total.

Assim, na seção 4.5, são apresentados os resultados da análise espectrofotométrica UV-Vis, que permitiu identificar e quantificar as diferentes classes de compostos fenólicos presentes tanto nas películas de própolis quanto nos bifés revestidos, possibilitando correlacionar a composição química com o desempenho antioxidante e antimicrobiano observado.

4.3. Atividade antimicrobiana do extrato etanólico de própolis.

De acordo com os resultados apresentado na Tabela 6, o extrato etanólico de própolis demonstrou ampla e significativa atividade antimicrobiana, atuando de forma eficaz contra *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Cândida albicans*. Os valores determinados para a Concentração Inibitória Mínima (CIM) e para Concentração Bactericida/Fungicida Mínima (CBM/CFM) demonstram uma forte atividade antimicrobiana do extrato, com particular eficácia sobre *S. aureus* (0,078/0,625 mg/ml) e *C. albicans* (0,156 mg/ml), enquanto *E. coli* apresentou maior resistência (2,5/5,0 mg/ml), refletindo o comportamento típico das bactérias Gram-negativas.

Tabela 6- Atividade antimicrobiana do extrato etanólico de própolis.

Microrganismo alvo	CIM (mg/ml)	CBM (mg/ml)
<i>E. coli</i>	2,5	5,0
<i>S. aureus</i>	0,078	0,625
<i>C. albicans</i>	0,156	0,156

Esses resultados estão de acordo com o perfil biológico amplamente relatado para o própolis, que apresenta maior eficácia contra bactérias Gram-positivas quando comparado a Gram-negativas (Sforcin, 2016; Przybyłek & Karpiński, 2019; Rocha et al.,

2023). Essa diferença decorre da estrutura da parede celular das Gram-negativas, composta por uma camada externa de polissacarídeos que dificulta a penetração de compostos bioativos, além da presença de enzimas hidrolíticas capazes de degradar flavonoides e ácidos fenólicos (Pasupuleti et al., 2017; Zuhendri et al., 2021)

No que se refere à *Cândida albicans*, a sensibilidade observada (CIM = CFM = 0,156 mg/ml) evidencia efeito fungicida direto, concordando com estudos que descrevem elevada suscetibilidade das leveduras aos compostos fenólicos e flavonoides presentes no própolis (Saeed et al., 2016; Zuhendri et al., 2021).

Zuhendri et al., (2021) relataram ainda que o própolis apresenta atividade contra várias espécies de *Cândida*, incluindo *C. tropicalis*, *C. krusei* e *C. guilliermondii*.

Bouchelaghem (2022) desenvolveu um trabalho onde os extratos da maioria dos tipos de própolis apresentaram maior atividade antibacteriana contra bactérias Gram-positivas, particularmente sobre *Staphylococcus aureus*, bem como atividade antifúngica frente a *Cândida albicans*, quando comparados aos patógenos Gram-negativos.

Al-Ani et al., (2018) relatou, efeito antibacteriano moderado contra microrganismos Gram-positivos, com valores de CIM variando de 0,08 a 2,5 mg/ml. Além disso, o extrato etanólico de própolis (EEP) exibiu atividade moderada contra bactérias Gram-negativas, com CIM entre 0,6 e 5,0 mg/ml. Adicionalmente, o EEP demonstrou atividade antifúngica moderada, com valores de CIM entre 0,6 e 2,5 mg/ml.

Gomes et al., (2024) observaram que os valores de CIM (0,06 a 0,2 mg/ml) e CBM (0,2 a 0,5 mg/ml) para as bactérias Gram-negativas foram superiores aos observados para as bactérias Gram-positivas (CIM entre 0,001 e 0,2 mg/ml e CBM entre 0,02 e 0,5 mg/ml).

Por outro lado, a ausência de atividade antimicrobiana no controlo contendo solvente alimentar e HPMC demonstra que o efeito inibitório é específico do extrato de própolis. O teor alcoólico residual do solvente alimentar (38% v/v) é insuficiente para causar lise microbiana. E o HPMC, sendo um polímero inerte, não apresenta ação antimicrobiana (Barroso et al., 2024; Sahoo et al., 2015; Vlad et al., 2025).

Assim, confirma-se que os compostos fenólicos e flavonoides do própolis são os principais responsáveis pela atividade observada.

4.4. Análises microbiológicas ao bife após aplicação da película

A avaliação microbiológica dos bifes de frango revestidos com as diferentes películas teve como objetivo determinar o efeito do extrato de própolis na inibição do crescimento de microrganismos indicadores de qualidade e segurança alimentar durante o armazenamento refrigerado. Para esse efeito, foram quantificadas as contagens de microrganismos mesófilos totais, *Escherichia coli*, coliformes totais, bolores e leveduras, bem como a presença de *Listéria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* coagulase positiva e *Salmonella* spp., nos três momentos de amostragem (T0, T3 e T6). O comportamento microbiológico observado foi posteriormente comparado entre as diferentes formulações estudadas (controlo (C), HPMC puro (HPMC), P2% e P4%).

A análise estatística indicou que quer o tipo de tratamento quer o tempo de armazenamento exerceram influência altamente significativa ($p < 0,001$) sobre os parâmetros microbiológicos avaliados, demonstrando que o crescimento microbiano depende simultaneamente da composição das películas e da duração do armazenamento. A interação significativa entre esses fatores evidencia que a evolução microbiana ao longo do tempo não foi uniforme entre as formulações.

Em termos gerais, observou-se um aumento progressivo das contagens microbianas com o tempo de armazenamento ($T0 < T3 < T6$), comportamento típico de produtos cárneos refrigerados. No entanto, esta progressão foi atenuada nas formulações contendo própolis, particularmente na P4%, sugerindo efeito inibitório dependente da concentração. A análise estatística via teste de Tukey ($p < 0,05$) indicou diferenças significativas entre os tratamentos, sendo a P4% a formulação mais eficaz, enquanto HPMC puro e controlo não diferiram significativamente, e P2% apresentou efeito intermediário. Estes resultados confirmam que a atividade antimicrobiana é proporcional à concentração de própolis, como descrito em revisões de películas bioativas (Segueni et al., 2023).

As contagens de microrganismos mesófilos totais (Figura 10) aumentaram gradualmente ao longo do armazenamento, mas a P4% manteve valores significativamente inferiores aos demais tratamentos, indicando que a matriz enriquecida com própolis atua como sistema de liberação controlada de compostos fenólicos, retardando o crescimento microbiano. Esse padrão é consistente com estudos prévios em que películas HPMC/própolis aplicadas a queijo curado e filetes de frango reduziram

significativamente microrganismos mesófilos e coliformes ao longo de períodos de armazenamento prolongados (El Sheikha et al., 2022; Paula et al., 2024).

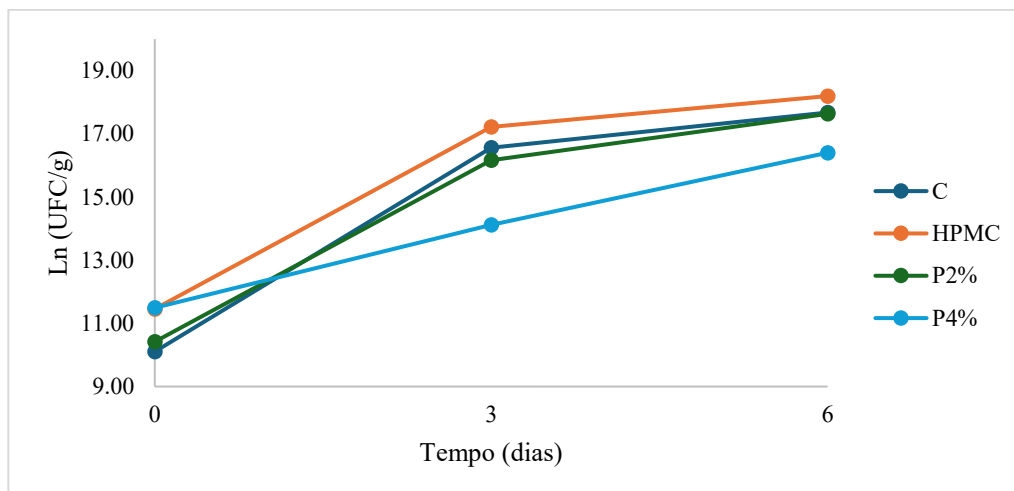


Figura 10-Evolução das contagens de microrganismos mesófilos totais (Ln UFC/g) nos diferentes tratamentos (C, HPMC, P2% e P4%) ao longo do tempo de armazenamento (T0, T3 e T6).

No caso da *E. coli* (Figura 11), a P4% apresentou redução mais acentuada, especialmente entre T3 e T6, sugerindo efeito antimicrobiano prolongado. Este resultado é relevante, pois muitos estudos relatam menor eficácia do própolis sobre bactérias Gram-negativas, sendo o efeito geralmente mais pronunciado em Gram-positivas. A atividade observada sobre *E. coli* no presente estudo provavelmente deve-se à combinação da matriz HPMC com a superfície do bife, que favorece a difusão de compostos fenólicos, corroborando evidências de que a interação entre película e alimento pode potencializar o efeito antimicrobiano (Torlak & Sert, 2013).

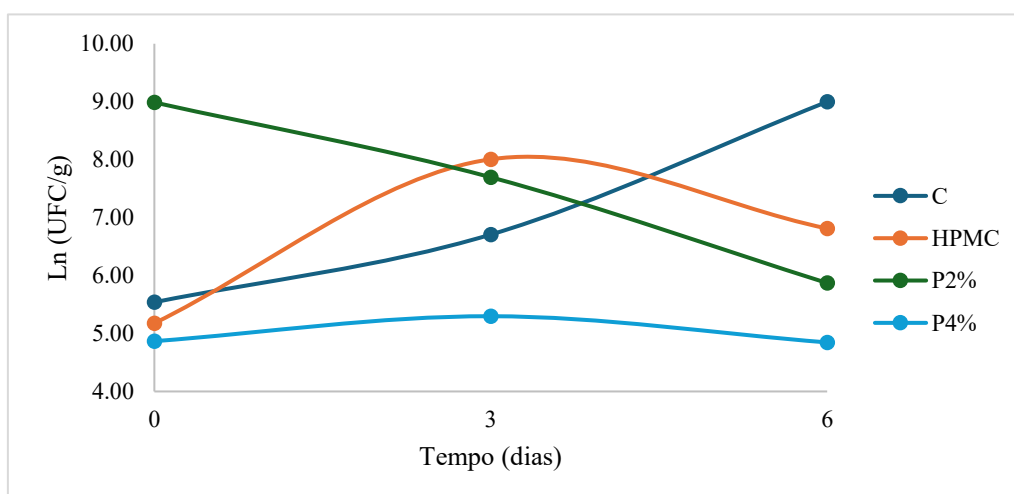


Figura 11- Evolução das contagens de *E. coli* (Ln UFC/g) nos diferentes tratamentos (C, HPMC, P2% e P4%) ao longo do tempo de armazenamento (T0, T3 e T6).

O comportamento dos Coliformes (Figura 12) seguiu padrão idêntico ao de *E. coli*, com aumento contínuo nas amostras controle e HPMC e redução nas formulações com própolis. Na P4%, observou-se estabilização das contagens entre T3 e T6, indicando atividade antimicrobiana significativa, consistente com o conceito de liberação gradual de bioativos.

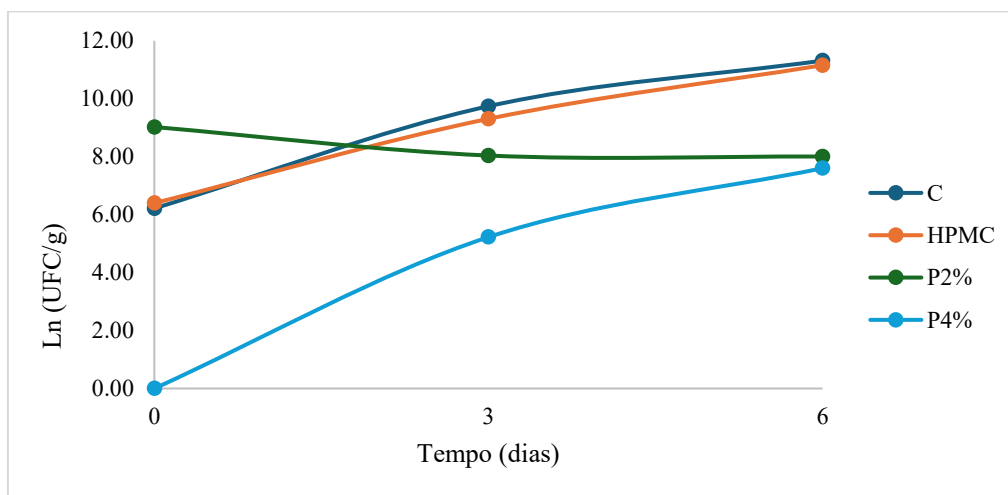


Figura 12-Evolução das contagens de Coliformes (Ln UFC/g) nos diferentes tratamentos (C, HPMC, P2% e P4%) ao longo do tempo de armazenamento (T0, T3 e T6).

Os Bolores e leveduras (Figura 13) apresentaram aumento contínuo nas amostras controle e HPMC, redução temporária na P2% e redução contínua na P4%, evidenciando que a maior concentração de própolis garante liberação prolongada de compostos fenólicos e flavonoides, mantendo níveis inibitórios eficazes ao longo do tempo.

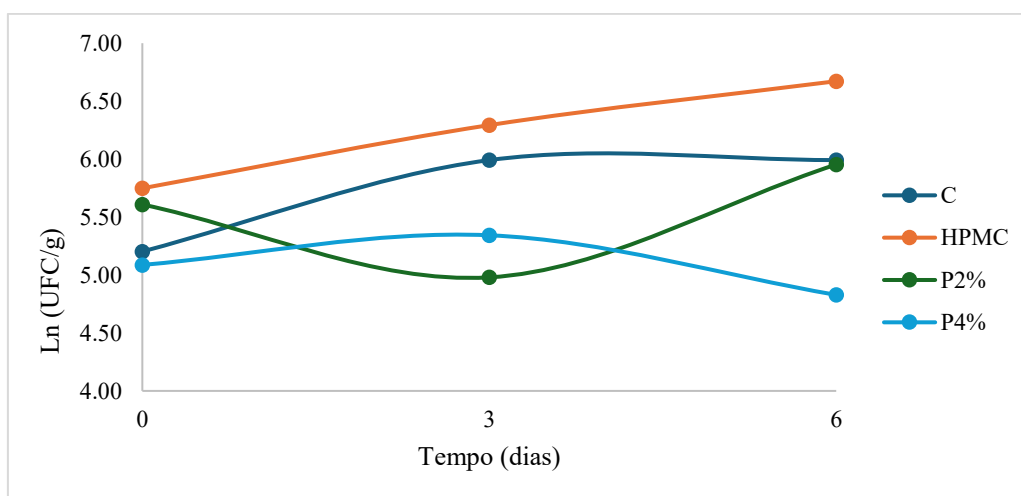


Figura 13-Evolução das contagens de Bolores e Leveduras (Ln UFC/g) nos diferentes tratamentos (C, HPMC, P2% e P4%) ao longo do tempo de armazenamento (T0, T3 e T6).

Listéria monocytogenes, *Staphylococcus aureus* coagulase positiva e *Salmonella* spp. estavam ausentes em 25 g de todas as amostras analisadas, sugerindo inexistência de contaminação inicial e eficácia das condições assépticas; entretanto, a literatura recomenda ensaios de desafio controlados para comprovar a atividade direta das películas sobre patogénicos (Torlak & Sert, 2013).

Os resultados obtidos neste estudo demonstram que o revestimento com 4% de própolis (P4%) apresenta uma eficácia antimicrobiana particularmente elevada, alcançando reduções significativas de mesófilos totais, coliformes, *E. coli* e bolores/leveduras ao fim de apenas seis dias de armazenamento. Comparativamente, estudos realizados noutras matrizes alimentares reportam reduções relevantes, mas geralmente após períodos mais prolongados ou com comportamento menos consistente. Em queijo curado, Paula et al., (2024) descreveram diminuições microbianas significativas ao longo da maturação, mas com efeitos mais graduais e dependentes da libertação lenta de compostos fenólicos pelas películas HPMC-própolis. De forma semelhante, El Sheikha et al., (2022) observaram reduções importantes de microrganismos deteriorantes em filetes de frango revestidos com própolis, embora estas se tornassem mais pronunciadas apenas entre os 7 e os 10 dias de armazenamento. Nos produtos cárneos, Gedikoğlu, (2022) também relataram reduções superiores a 2 log em almôndegas de carne bovina tratadas com extrato de própolis, confirmando o potencial antimicrobiano da substância; contudo, estas reduções ocorreram após 7–9 dias de armazenamento e com concentrações inferiores (0,1–1%). A evidência proveniente de estudos *in vitro*, como os de Queiroga et al., (2023) e Stanicka et al., (2021), reforça ainda mais a elevada atividade antimicrobiana do extrato de própolis contra bactérias patogénicas e formadoras de biofilme, embora estes trabalhos não avaliem diretamente o comportamento do própolis em matrizes alimentares durante o armazenamento. Em conjunto, a literatura disponível demonstra que a formulação P4% utilizada no presente estudo promove um efeito antimicrobiano rápido, consistente e superior ao observado em diferentes tipos de alimentos, destacando o própolis como um agente de conservação natural particularmente promissor para produtos cárneos frescos.

Além disso, o efeito observado em *E. coli*, uma bactéria Gram-negativa, é mais acentuado do que frequentemente reportado, indicando que a combinação da matriz HPMC com a superfície do bife favorece a difusão dos compostos ativos, proporcionando efeito bacteriostáticos/bactericidas mesmo em alvos menos sensíveis.

Os resultados confirmam a dose-dependência do efeito antimicrobiano: P2% proporcionou redução moderada, P4% apresentou efeito elevado e sustentado, enquanto HPMC puro não alterou significativamente as contagens microbianas, evidenciando que a barreira física isoladamente não é responsável pela inibição microbiana. Estes achados reforçam a importância de considerar matriz, concentração e tempo de armazenamento ao aplicar películas ativas em alimentos perecíveis.

Em síntese, a incorporação de própolis em películas de HPMC aplicadas a bifes frescos demonstrou eficácia significativa e fundamentada na redução de microrganismos indicadores e de deterioração, com potencial para prolongar a vida útil e garantir segurança alimentar, especialmente quando a concentração do extrato ativo é adequada ($\geq 4\%$). Estes resultados estão em consonância com a literatura e acrescentam evidência sobre a aplicabilidade de películas HPMC/própolis em carne fresca, incluindo efeito acentuado sobre microrganismos Gram-negativos, um aspecto ainda pouco explorado.

Para uma melhor compreensão da eficácia antimicrobiana observada e do desempenho das diferentes formulações, os resultados obtidos neste estudo foram comparados com dados previamente reportados na literatura.

A Tabela 7 apresenta um resumo comparativo dos principais trabalhos que avaliaram o efeito de filmes ou revestimentos incorporados com extrato de própolis em diferentes matrizes alimentares.

Tabela 7- Comparação dos efeitos antimicrobianos de filmes e revestimentos à base de própolis em diferentes matrizes alimentares.

Estudo	Matriz / Alimento	Concentração (%)	Microrganismos analisados	Redução média (log UFC/g)	Tempo de armazenamento	Observações principais
Este estudo	Bife fresco	2% (P2%)	Mesófilos totais	0,0 – 0,2 log	T0–T6 dias	Efeito moderado da redução dependente da concentração
Este estudo	Bife fresco	4% (P4%)	Mesófilos totais	0,5 – 1,1 log	T0–T6 dias	Maior efeito, causado pela liberação controlada de compostos fenólicos.
Este estudo	Bife fresco	4% (P4%)	<i>E. coli</i>	0,6 – 1,8 log	T0–T6 dias	Redução significativa efeito prolongado sobre Gram-negativas
Este estudo	Bife fresco	4% (P4%)	Coliformes	1,6 – 2,0 log	T0–T6 dias	Estabilização das contagens entre T3–T6
Este estudo	Bife fresco	4% (P4%)	Bolores e leveduras	0,3 – 0,5 log	T0–T6 dias	Redução contínua e sustentada, efeito antifúngico prolongado
Paula et al., 2024	Queijo curado	2–5%	Mesófilos totais, coliformes, bolores/leveduras, <i>Enterobacteriaceae</i>	Redução Significativa	14 dias	Redução significativa atribuída à liberação gradual de fenólicos.
El Sheikha et al., 2022	Filetes de frango	0–2%	Mesófilos, <i>Enterobacteriaceae</i> , psicrófilos	Reduções significativas	10 dias	Efeito dependente da concentração e difusão de compostos bioativos
Stanicka et al., 2021	Filmes de quitosano (in vitro)	1–10%	<i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i> , <i>L. monocytogenes</i>	atividade avaliada por halos	—	Maior efeito em Gram-positivas; difusão controlada; prolonga atividade antimicrobiana
Gedikoğlu, 2022	Almôndegas de carne bovina	0,1–1%	Mesófilos totais, <i>Enterobacteriaceae</i>	≈2,2 – 2,4 log	7–9 dias	Efeito dose-dependente; menor eficácia em Gram-negativas quando comparadas às Gram-positivas

4.5. Quantificação das três classes fenólicas através do espectro UV-Vis

Esta análise permite compreender o comportamento fenólico global do sistema e avaliar o efeito da incorporação de extrato e do contacto com o alimento na estabilidade e migração dos compostos bioativos.

A Tabela 8 e as Figuras 17 a 20 apresentam a evolução temporal dos principais grupos de compostos fenólicos (ácidos hidroxibenzóicos, ácidos hidroxicinâmicos, flavonoides e fenóis totais) determinados nas diferentes formulações de película (P2F e P4F) e nas amostras de bife em contacto com essas matrizes (P2FB e P4FB), analisadas nos momentos T0 e T6.

Tabela 8- Teores médios de compostos fenólicos do extrato seco de própolis.

Composto	Amostra	T0 (mg /L \pm dp)	T6 (mg /L \pm dp)
Ácidos hidroxibenzóicos	P2F	17,63 \pm 1,23	10,03 \pm 1,12
	P2FB	26,89 \pm 1,34	16,80 \pm 1,19
	P4F	34,28 \pm 1,60	20,09 \pm 1,35
	P4FB	32,30 \pm 1,49	22,98 \pm 1,28
Ácidos hidroxicinâmicos	P2F	37,55 \pm 0,98	24,88 \pm 0,95
	P2FB	45,00 \pm 1,01	31,44 \pm 0,97
	P4F	59,68 \pm 1,09	42,34 \pm 1,01
	P4FB	54,52 \pm 1,05	36,94 \pm 0,99
Flavonoides	P2F	9,32 \pm 0,07	9,75 \pm 0,06
	P2FB	10,43 \pm 0,05	10,27 \pm 0,05
	P4F	17,05 \pm 0,03	14,50 \pm 0,03
	P4FB	13,26 \pm 0,03	11,35 \pm 0,03
Teor Fenólico Total	P2F	42,78 \pm 2,74	24,61 \pm 2,15
	P2FB	103,31 \pm 4,94	75,86 \pm 3,95
	P4F	111,73 \pm 5,21	67,26 \pm 3,59
	P4FB	116,59 \pm 5,41	97,36 \pm 4,73

P2% e P4% referem-se às formulações com diferentes proporções de extrato fenólico incorporado à película; F = Película; FB = película+ bife.; T0 = tempo inicial; T6 = após seis dias de armazenamento.

A análise estatística revelou um padrão consistente entre todos os conjuntos de dados. Os resíduos apresentaram distribuição normal, cumprindo o pressuposto de normalidade (Shapiro–Wilk, $p > 0,05$), no entanto, a homogeneidade de variâncias foi violada, como

indicado pelo teste de Levene ($p < 0,05$). Em todas as classes, o tratamento foi o fator com maior influência, apresentando diferenças altamente significativas entre as formulações, com P4F e P4FB a exibirem sistematicamente os valores mais elevados enquanto o P2F e o P2FB os mais baixos. A PERMANOVA confirmou estes resultados, indicando que a maior parte da variabilidade observada é explicada pelo tipo de formulação.

O tempo também mostrou efeito significativo na maioria das classes, com reduções claras de T0 para T6. Em todos os casos, a interação entre tratamento e tempo não foi significativa, indicando que a redução (quando existente) ocorre de forma semelhante nas diferentes formulações.

Os resultados relativos aos ácidos hidroxibenzoicos (Figura 14) demonstram uma redução significativa dos teores entre os tempos T0 e T6 em todas as formulações avaliadas. Nas amostras de película, verificou-se uma diminuição clara dos ácidos hidroxibenzoicos, passando de $17,63 \pm 1,23$ para $10,03 \pm 1,12$ mg EAG/L em P2F e de $34,28 \pm 1,60$ para $20,09 \pm 1,35$ mg EAG/L em P4F. Tendência semelhante foi observada nas amostras do bife em contacto com a película (P2FB e P4FB), onde os teores decresceram de $26,89 \pm 1,34$ para $16,80 \pm 1,19$ mg EAG/L, e de $32,30 \pm 1,49$ para $22,98 \pm 1,28$ mg EAG/L, respetivamente.

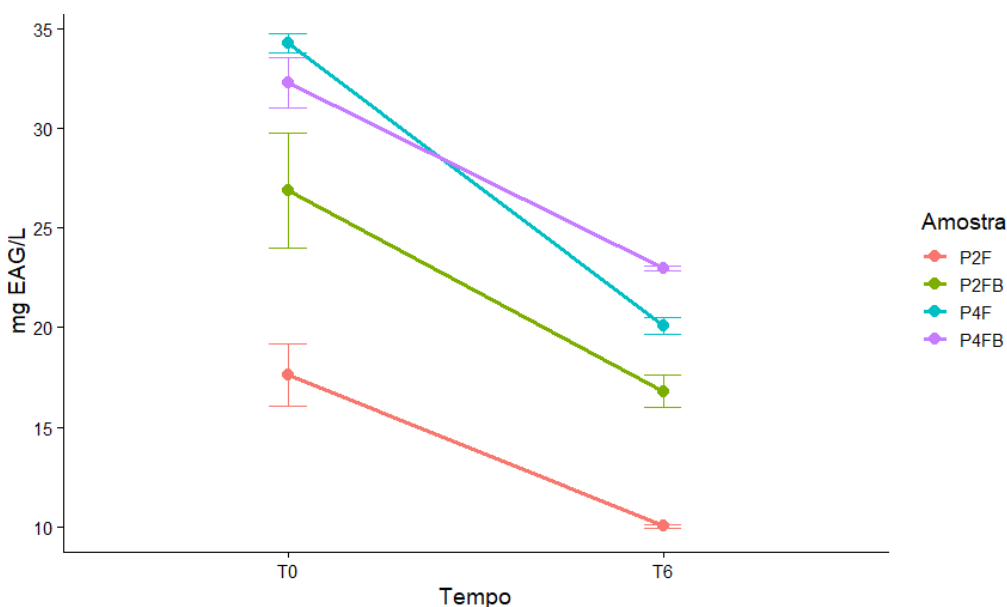


Figura 14-Evolução temporal dos ácidos hidroxibenzoicos, interação entre tempo e tratamento.

A descida observada nos teores de ácidos hidroxibenzoicos indica que estes compostos são altamente suscetíveis à oxidação e apresentam elevada mobilidade dentro da matriz polimérica, favorecendo a sua migração para o alimento durante o armazenamento. Os ácidos hidroxibenzoicos correspondem a moléculas fenólicas simples e polares, derivadas do ácido benzoico, o que lhes confere maior solubilidade e difusibilidade através da película. Devido à sua maior complexidade molecular e maior peso, bem como maior reatividade perante fatores ambientais, como o oxigénio, a luz e a temperatura. Esta combinação de estrutura simples, baixa massa molecular e polaridade acentuada explica a sua rápida libertação e a consequente redução dos teores detetados ao longo do tempo (Gangadharan et al., 2024; Kaczmarek-Szczepańska et al., 2023; Singh et al., 2022).

Assim, a diminuição registada nas amostras com bife (P2FB e P4FB) poderá ser interpretada não como uma simples perda, mas como resultado da migração efetiva de compostos antioxidantes para o alimento, reforçando o papel da película como embalagem ativa com capacidade de libertação controlada de fenóis durante o armazenamento.

A menor percentagem de redução observada em P4FB sugere que a maior incorporação de extrato fenólico conferiu maior estabilidade e retenção, promovendo uma libertação mais controlada dos compostos bioativos para o bife.

Os resultados ilustrados na Figura 15 mostram que os ácidos hidroxicinâmicos apresentaram os maiores teores entre todas as classes fenólicas específicas analisadas, com valores variando entre $37,55 \pm 0,98$ e $59,68 \pm 1,09$ mg EAF/L em T0, e entre $24,88 \pm 0,95$ e $42,34 \pm 1,01$ mg EAF/L em T6.

Estes dados confirmam o papel destacado dos ácidos hidroxicinâmicos como principais contribuintes para o perfil fenólico das formulações avaliadas. Tal como observado nos restantes parâmetros, verificou-se uma redução clara e consistente dos teores de ácidos hidroxicinâmicos entre T0 e T6 em todas as formulações, tanto nas películas como nas amostras de bife em contacto com a película.

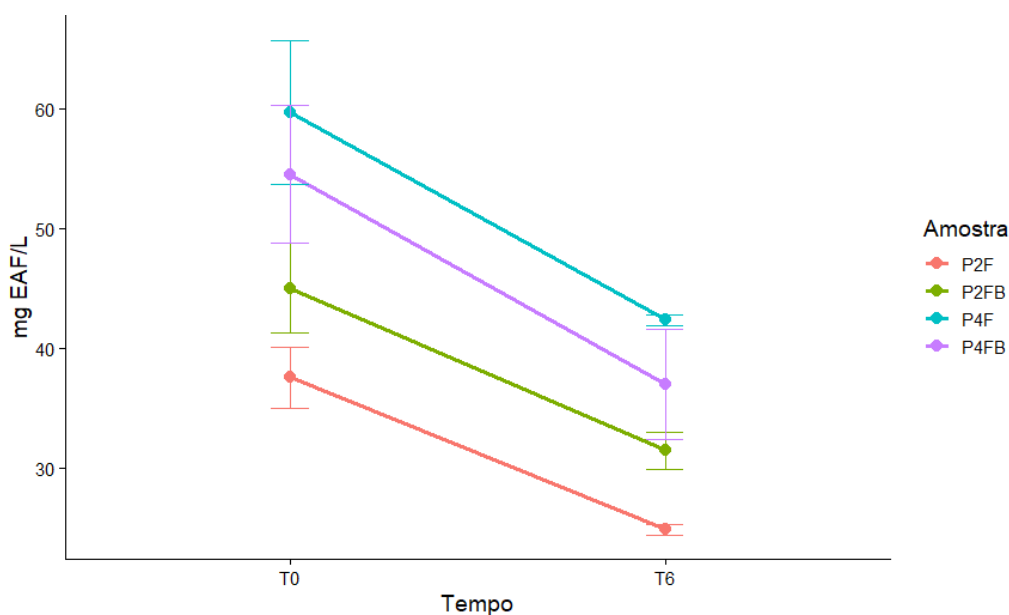


Figura 15-Evolução temporal dos ácidos hidroxicinâmicos, interação entre tempo e tratamento.

Os ácidos hidroxicinâmicos, como o ácido cafeico, o ácido ferúlico e o ácido p-cumárico, possuem uma cadeia lateral insaturada conjugada com o anel aromático, estrutura que promove deslocalização eletrônica e estabilização do radical fenóxido, conferindo maior resistência à oxidação e forte capacidade antioxidante (Shahidi & Ambigaipalan, 2015; Singh et al., 2022).

A interação entre os ácidos hidroxicinâmicos e a matriz polimérica parece desempenhar um papel determinante na estabilidade e retenção destes compostos ao longo do armazenamento.

Estudos recentes demonstram que ácidos como o ferúlico, o cafeico e o p-cumárico estabelecem pontes de hidrogénio e interações π - π com os grupos hidroxilo e as cadeias do amido ou do HPMC, o que contribui para uma estrutura mais coesa e menor difusão dos compostos fenólicos através da matriz.

De acordo com Zheng et al. (2025), estas interações moleculares reforçam a estabilidade química e reduzem a taxa de migração, promovendo uma libertação controlada e sustentada dos antioxidantes ao longo do tempo.

Este comportamento é consistente com os resultados obtidos para as amostras P4F e P4FB, nas quais a maior incorporação de extrato fenólico (4%) resultou em teores residuais mais elevados e menor variação entre T0 e T6, indicando uma retenção mais

eficiente dos compostos hidroxicinâmicos e manutenção prolongada da atividade antioxidante da película.

Assim, a menor degradação verificada em comparação com os hidroxibenzoicos é atribuída a essa maior estabilidade estrutural.

De acordo com Kaczmarek-Szczepańska et al., 2023 esta classe de compostos apresenta maior hidrofobicidade relativa, o que reduz a sua difusibilidade imediata, mas assegura liberação sustentada e resistência a degradação oxidativa.

Os resultados ilustrados na Figura 16 mostram que os flavonoides apresentaram os teores mais baixos entre as classes fenólicas analisadas, variando entre $9,32 \pm 0,07$ e $17,05 \pm 0,03$ mg EQ/L em T0, e entre $9,75 \pm 0,06$ e $14,50 \pm 0,03$ mg EQ/L em T6.

Entre as formulações avaliadas, a P4F apresentou o valor máximo em T0 ($17,05 \pm 0,03$ mg EQ/L), enquanto a P2F exibiu o teor mais baixo ($9,32 \pm 0,07$ mg EQ/L). Após seis dias (T6), observou-se uma ligeira diminuição em todas as formulações, sendo mais acentuada em P4F e P4FB, que reduziram para $14,50 \pm 0,03$ e $11,35 \pm 0,03$ mg EQ/L, respectivamente.

Apesar desta variação, os teores mantiveram-se relativamente estáveis, evidenciando a resistência dos flavonoides à degradação oxidativa e à migração para o alimento.

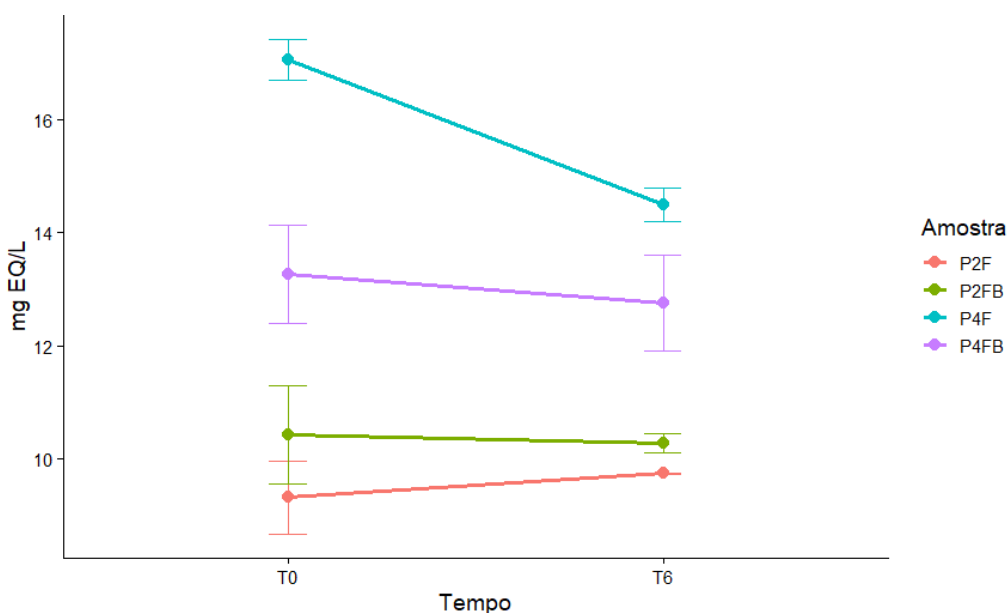


Figura 16-Evolução temporal dos flavonoides, interação entre tempo e tratamento.

Os flavonoides constituem um grupo de polifenóis estruturados, caracterizados pela presença de duas unidades fenólicas ligadas por uma cadeia heterocíclica (anel C). Esta estrutura confere-lhes elevada estabilidade química, baixa solubilidade em água e carácter hidrofóbico acentuado, o que reduz a sua difusão na matriz e a sua migração para o alimento (Heim et al., 2002; Singh et al., 2022).

De acordo com Pérez-Jiménez et al. (2010), a atividade antioxidante dos flavonoides está associada à presença de múltiplos grupos hidroxilo, que atuam como doadores de hidrogénio, neutralizando espécies reativas de oxigénio e estabilizando radicais livres. Esta característica explica o seu papel protetor e a contribuição indireta para a estabilidade global do sistema, mesmo após a migração parcial de outros compostos fenólicos mais simples.

Embora se tenha registado uma ligeira redução após o armazenamento, a retenção significativa dos flavonoides demonstra que estes compostos permanecem predominantemente na matriz da película, atuando como barreira antioxidante interna e contribuindo para a prolongação da estabilidade oxidativa do material e do alimento.

Em comparação com os ácidos fenólicos, os flavonoides apresentaram maior resistência à degradação, menor mobilidade e um papel essencial na preservação da integridade estrutural e funcional da película.

O seu comportamento está de acordo com observações anteriores em películas bio poliméricas contendo extratos naturais, onde os flavonoides atuam como antioxidantes de libertação lenta e estável, assegurando proteção prolongada (Heim et al., 2002; Pérez-Jiménez et al., 2010; Singh et al., 2022).

Os resultados ilustrados na Figura 17 mostram que o conteúdo fenólico total variou significativamente entre as formulações, com valores entre $42,78 \pm 2,74$ e $116,59 \pm 5,41$ mg EAG/L em T0, e entre $24,61 \pm 2,15$ e $97,36 \pm 4,73$ mg EAG/L em T6. As maiores concentrações foram observadas nas formulações com maior teor de extrato fenólico (P4F e P4FB), enquanto as amostras P2F e P2FB apresentaram valores inferiores, refletindo a diferença na incorporação inicial de compostos fenólicos.

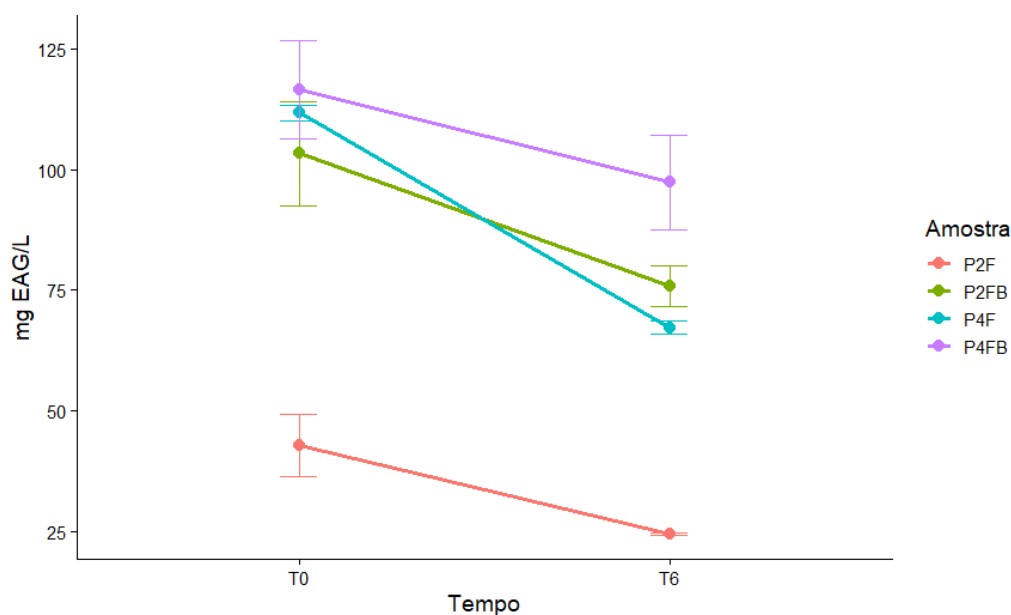


Figura 17-Evolução temporal dos Fenóis totais, interação entre tempo e tratamento.

As formulações com maior concentração de extrato (P4F e P4FB) apresentaram valores residuais mais elevados, sugerindo maior capacidade de retenção e liberação controlada dos fenóis totais. Este comportamento está em consonância com o observado para as classes fenólicas individuais. A variação observada no conteúdo fenólico total está diretamente relacionada com o comportamento das três classes fenólicas principais analisadas, uma vez que o mesmo representa a soma global destas frações.

Segundo Singh et al. (2022), as películas ativas enriquecidas com extratos fenólicos apresentam uma liberação progressiva de compostos antioxidantes durante o armazenamento, garantindo atividade antioxidante sustentada.

De forma semelhante, Kaczmarek-Szczepańska et al., (2023) referem que a interação entre os compostos fenólicos e a matriz polimérica pode retardar a difusão e aumentar a estabilidade química, favorecendo a preservação parcial do conteúdo fenólico total.

A amostra P4FB destacou-se por manter o maior teor residual em T6 ($97,36 \pm 4,73$ mg EAG/L), confirmando o efeito benéfico da maior carga de extrato na proteção antioxidante do sistema. Este resultado demonstra que, embora parte dos compostos fenólicos migra para o alimento, uma fração significativa permanece na película, contribuindo para a atividade antioxidante prolongada da película e reforçando o potencial funcional do material como embalagem ativa.

De acordo com Shahidi e Ambigaipalan (2015), os fenóis totais representam a soma das diferentes subclasses de compostos fenólicos (ácidos fenólicos e flavonoides), sendo o seu valor um indicador global da capacidade antioxidante.

Assim, as diferenças observadas entre formulações e tempos de armazenamento refletem o equilíbrio entre migração, degradação e retenção, fenômenos característicos de sistemas de liberação controlada de antioxidantes naturais.

4.6. Análise colorimétrica

Os resultados obtidos para os parâmetros cromáticos L^* (luminosidade), a^* (componente vermelho-verde), b^* (componente amarelo-azul), C^* (cromaticidade) e h° (ângulo de tonalidade) encontram-se apresentados na Tabela 9. Estes parâmetros permitem descrever de forma objetiva a aparência visual e estabilidade cromática dos bifes durante o período de armazenamento, refletindo as alterações físico-químicas associadas à incorporação de extrato de própolis e às interações entre os seus compostos fenólicos e a matriz de HPMC.

A análise estatística aplicada aos parâmetros de cor (L^* , a^* , b^* , C^* e h°) evidenciou um comportamento consistente entre todas as variáveis avaliadas. Em todos os casos, os resíduos dos modelos ajustados apresentaram distribuição normal segundo o teste de Shapiro-Wilk ($p > 0,05$), confirmando o cumprimento do pressuposto de normalidade. Contudo, o pressuposto de homogeneidade das variâncias foi violado em todas as análises, sendo detetada heterocedasticidade pelo teste de Levene ($p < 0,001$ para todos os parâmetros), indicando variabilidade desigual entre os grupos fatorialmente combinados. Dada a violação da homogeneidade de variâncias, foi empregue a PERMANOVA como método mais robusto para interpretação dos efeitos. Os resultados demonstraram de forma clara que todos os parâmetros de cor apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre tratamentos ($p \leq 0,001$) e tempos de ensaio ($p \leq 0,01$), bem como interações altamente significativas entre ambos os fatores ($p \leq 0,001$). Tal comportamento indica que a resposta cromática do material depende da combinação entre ambos os fatores, revelando uma dinâmica evolutiva diferenciada consoante o tratamento ao longo do tempo. A seguir, a avaliação dos resultados será efetuada através do gráfico de interação apresentado para cada um dos parâmetros cromáticos.

Tabela 9- Parâmetros cromáticos nas amostras ao longo dos 6 dias.

Amostras	Tempo (dias)	L* ± dp	a*± dp	b*± dp	C*± dp	h ± dp
C	T0	46,40 ±1,53	1,92 ±0,51	0,48 ±0,21	1,99 ±0,44	15,22 ±9,94
	T3	52,00 ±0,18	2,21 ±0,07	3,26 ±0,09	3,93 ±0,11	55,86 ±0,16
	T6	52,21 ±0,75	2,45 ±0,49	4,14 ±0,18	4,82 ±0,10	59,46 ±6,11
HMPC	T0	45,61 ± 0,98	1,78 ±0,05	0,12 ±0,13	1,78 ±0,06	3,73 ±3,97
	T3	50,45 ±1,56	0,50 ±0,09	1,71 ±0,05	1,78 ±0,07	73,90 ±2,31
	T6	50,56 ± 1,63	2,54 ±0,88	1,97 ±0,69	3,22 ±1,12	37,85 ±0,06
P2%	T0	54,25 ± 1,67	0,64 ±0,49	6,02 ±0,61	6,05 ±0,66	84,05 ±4,06
	T3	49,89 ±4,70	-0,56 ±0,48	2,26 ±1,02	2,33 ±1,10	103,60 ±4,53
	T6	50,25 ± 4,53	-0,42 ±0,51	3,98 ±0,01	3,97 ±0,16	96,00 ±3,56
P4%	T0	51,56 ± 0,73	2,11 ±0,29	5,16 ±0,92	5,57 ±0,96	67,68 ±0,81
	T3	50,69 ±0,005	1,84 ±0,15	2,39 ±0,54	3,02 ±0,52	51,70 ±4,05
	T6	51,32 ± 0,82	-0,61 ±0,05	6,73 ±0,92	6,76 ±0,91	95,28 ±1,09

C(controlo), HMPC (hidroxipropilmetilcelulose) P2% e P4% (películas com própolis a 2% e 4%) L* (luminosidade), a* (componente vermelho-verde), b* (componente amarelo-azul), C* (cromaticidade) e h° (ângulo de tonalidade), dp (desvio padrão).

A **Luminosidade (L*)** está ilustrada na Figura 18, que representa a sua evolução ao longo do período de armazenamento (T0, T3 e T6). Este parâmetro expressa o grau de claridade da superfície das amostras (0 = preto; 100 = branco) e constitui um indicador sensível das alterações visuais e estruturais que ocorrem na matriz cárnea durante a conservação.

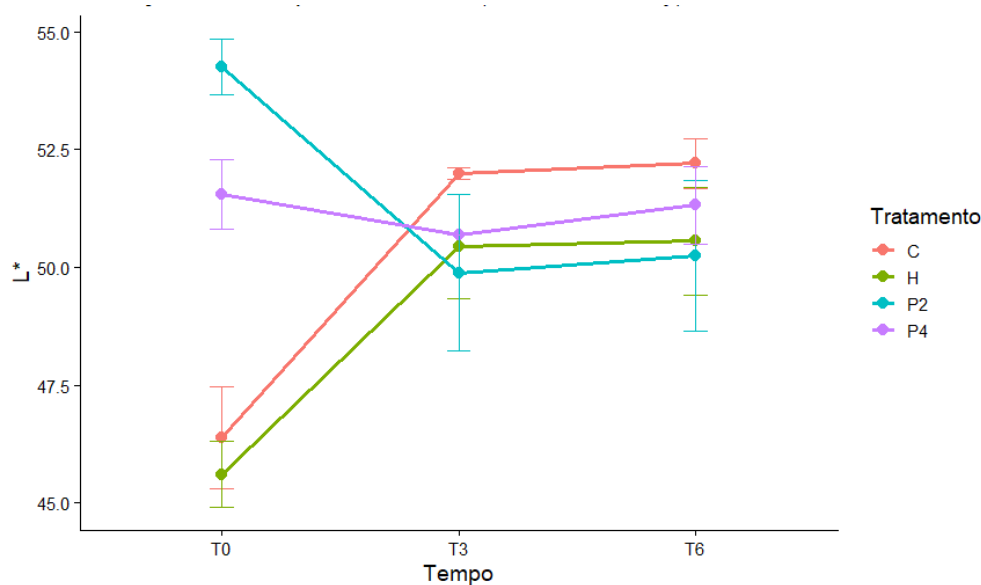


Figura 18-Interação entre tempo e tratamento para variável L*.

Em T0, observou-se uma forte diferenciação entre as amostras. A amostra P2% apresentou o valor mais elevado de L* (~54), enquanto P4% exibiu luminosidade intermédia (~51), e C e HPMC mostraram valores inferiores (~45–46), correspondentes a colorações mais escuras.

Estes resultados confirmam que a adição de extrato de própolis aumenta a luminosidade inicial do bife, devido à presença de pigmentos fenólicos amarelados e à maior dispersão da luz proporcionada pelas partículas fenólicas incorporadas na matriz polimérica (Mallegni et al., 2025; Pan et al., 2024; Paula et al., 2024).

Com o decorrer do armazenamento (T3 e T6), verificou-se uma tendência para convergência dos valores de L* entre os tratamentos, como mostrado pelas linhas do gráfico que se aproximam após T3.

Nas amostras C e HPMC, ocorreu um aumento acentuado de L* entre T0 e T3, mantendo-se estável até T6. Esta variação pode ser atribuída à perda de humidade, à oxidação superficial e à reorganização estrutural da matriz de HPMC, que aumentam a reflexão da luz e tornam o material mais claro (Shahidi & Ambigaipalan, 2015).

Por contraste, as amostras com própolis (P2 % e P4 %) apresentaram redução inicial de L^* entre T0 e T3, seguida de estabilização em T6, comportamento compatível com a ação antioxidante dos compostos fenólicos, que atenuam a oxidação e o amarelecimento (Mallegni et al., 2025; Pan et al., 2024; Singh et al., 2022).

A formulação P4 %, com maior teor de extrato, destacou-se pela menor variação de L^* ao longo do tempo, demonstrando maior estabilidade ótica e resistência à degradação (Mallegni et al., 2025).

Em síntese, o extrato de própolis influencia positivamente a luminosidade inicial da carne e contribui para maior estabilidade ótica durante o armazenamento, sobretudo quando aplicado em maior concentração.

O **parâmetro a^*** , está ilustrado na Figura 19, que representa a variação da componente cromática vermelho-verde das amostras ao longo do tempo de armazenamento (T0, T3 e T6). De forma geral, valores positivos de a^* indicam tendência para tons avermelhados, enquanto valores negativos indicam tonalidades esverdeadas.

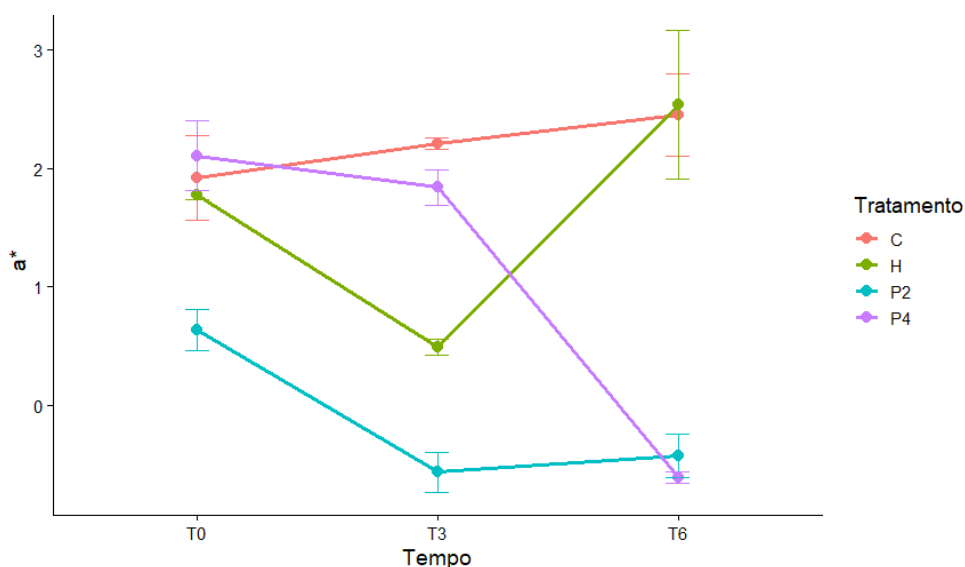


Figura 19-Interação entre tempo e tratamento para variável a^* .

Observa-se que a amostra controlo (C) manteve valores positivos e relativamente constantes, variando entre 1,56 e 2,80, refletindo uma ligeira intensificação do tom avermelhado até T6.

Na amostra HPMC (H), registou-se uma redução acentuada de a^* em T3 (média próxima de 0,5), seguida de um aumento em T6 (até 3,16), comportamento que pode ser atribuído a oscilações associadas à oxidação de compostos residuais e à reorganização da matriz polimérica, que afeta a difusão da luz e as propriedades óticas do material.

Nas amostras contendo própolis (P2% e P4%), o comportamento foi distinto. O P2% apresentou valores negativos já em T3 (-0,73 a -0,39) e manteve tonalidades esverdeadas até T6 (-0,24 a -0,60), enquanto o P4% manteve valores positivos em T0 (1,81 a 2,40), mas passou a valores negativos em T6 (-0,56 a -0,65).

Esta inversão de sinal sugere redução progressiva dos pigmentos avermelhados e aumento relativo de componentes esverdeadas, o que está em concordância com a ação antioxidante dos compostos fenólicos da própolis, que retardam o escurecimento e o avermelhamento associados à oxidação lipídica e proteica (Shahidi & Ambigaipalan, 2015; Singh et al., 2022).

O comportamento observado está de acordo com os relatados por Mallegni et al., 2025; Pan et al., 2024, que demonstraram que polímeros enriquecidos com compostos fenólicos naturais apresentam maior resistência às variações cromáticas, devido à estabilização de radicais livres e absorção seletiva da luz.

No geral, observou-se que o teor de própolis influencia diretamente a estabilidade e direção da variação cromática, promovendo maior resistência a oxidação precoce, porém favorecendo mudança gradual para tons esverdeados em fases tardias.

O **parâmetro b^*** , está ilustrado na Figura 20, que representa a variação da componente cromática amarelo-azul das amostras ao longo do tempo de armazenamento (T0, T3 e T6). De forma geral, valores positivos de b^* indicam tendência para tonalidades amareladas, enquanto valores negativos correspondem a tonalidades azuladas.

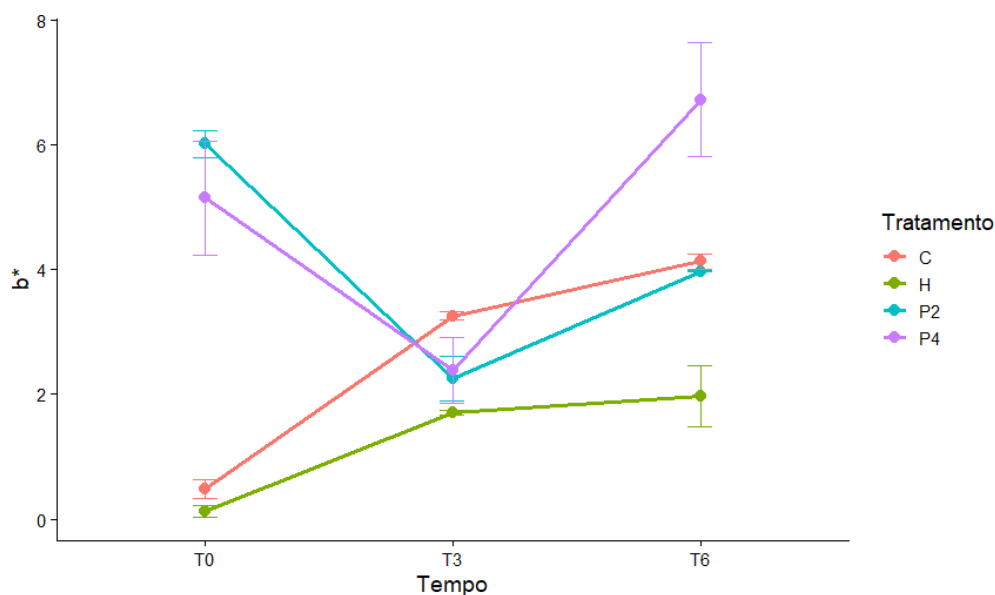


Figura 20-Interação entre tempo e tratamento para variável b^* .

Em T0, observou-se um contraste acentuado entre os tratamentos: as amostras C e H apresentaram valores baixos de b^* (entre 0,03 e 0,63), correspondentes a tonalidades quase neutras, enquanto as amostras contendo própolis (P2% e P4%) exibiram valores mais elevados (5,80–6,23 e 4,24–6,07, respectivamente), indicando uma coloração amarelada inicial mais intensa.

Este comportamento é atribuído à presença natural de pigmentos fenólicos e flavonoides no própolis, nomeadamente derivados de ácidos cinâmicos, que conferem tonalidades amareladas e douradas típicas (Shahidi & Ambigaipalan, 2015; Singh et al., 2022).

Com o decorrer do armazenamento, verificou-se um aumento significativo de b^* nas amostras C e H, que atingiram valores de 3,19–4,26 e 1,48–2,46 em T6, respetivamente. Este aumento reflete processos de oxidação e rearranjos superficiais da matriz proteica e polimérica, que promovem o amarelecimento e a perda de frescura da cor.

Por outro lado, nas formulações com própolis, observou-se uma redução inicial acentuada de b^* até T3 — de 6,0 para 2,0 em P2% e de 5,0 para 2,4 em P4% — seguida de recuperação em T6, especialmente em P4%, que alcançou o valor máximo de $7,64 \pm 0,9$, indicando estabilização e possível migração de pigmentos fenólicos para a superfície.

De forma global, conclui-se que o extrato de própolis influencia a componente amarela da cor, modulando a sua evolução ao longo do tempo e promovendo maior intensidade cromática em fases tardias de armazenamento.

O C^* (**croma ou saturação**), está ilustrado na Figura 21, que representa a intensidade ou pureza da cor das amostras ao longo do armazenamento (T0, T3 e T6.). Valores mais elevados de C^* correspondem a cores mais vivas e saturadas, enquanto valores mais baixos indicam tons mais neutros ou desbotados.

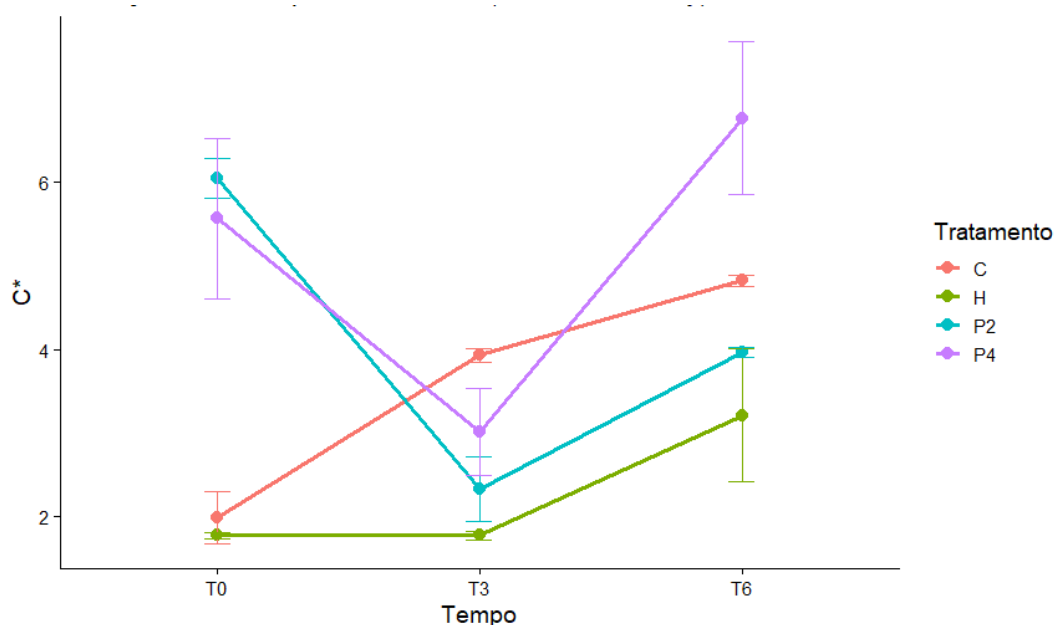


Figura 21-Interação entre tempo e tratamento para variável C^* .

Em T0, as amostras com própolis (P2% e P4%) exibiram valores iniciais mais elevados ($\sim 6,0$ e $\sim 5,5$ – $6,5$, respetivamente), revelando uma maior saturação e intensidade de cor em comparação com as amostras controlo (C e H), que apresentaram valores inferiores ($\sim 1,7$ – $2,3$).

Durante o armazenamento, verificou-se uma tendência distinta entre os tratamentos. As amostras C e H apresentaram um aumento progressivo de C^* até T6 ($\sim 4,8$ em C e $\sim 4,0$ em H), o que indica maior amarelecimento e intensificação da cor com o tempo, possivelmente associada a reações de oxidação superficial e perda de humidade, que aumentam a reflexão de luz e reforçam o brilho aparente.

Por contraste, as amostras com própolis (P2% e P4%) mostraram redução acentuada da saturação em T3 ($\sim 2,0$ – $2,7$) seguida de recuperação significativa em T6, especialmente em P4%, que atingiu $7,67 \pm 0,9$, o valor máximo entre todos os tratamentos.

Este comportamento indica que os compostos fenólicos da própolis exercem duplo efeito. Nos primeiros dias, ocorre migração e reorganização dos pigmentos e antioxidantes dentro da matriz, levando a uma aparente diminuição da saturação e posteriormente, observa-se estabilização e reintensificação cromática, resultado da libertação controlada e redistribuição superficial dos compostos fenólicos, que restauram parcialmente o brilho e a cor.

De acordo com Mallegni et al., (2025), a inclusão de antioxidantes fenólicos em matrizes biopoliméricas aumenta a estabilidade ótica e resistência à oxidação fotoquímica, preservando a cor e o brilho superficial. Da mesma forma, Zheng et al., (2025) demonstraram que as interações intermoleculares entre ácidos hidroxicinâmicos e polissacarídeos promovem uma estrutura mais estável, que reduz a degradação cromática e favorece a libertação gradual dos pigmentos. Estes mecanismos explicam a maior estabilidade e saturação observada nas formulações com própolis, sobretudo em P4%, cuja coloração intensa e estável reflete a integração eficaz dos compostos fenólicos com a matriz da película.

Globalmente, conclui-se que a própolis influencia a evolução da intensidade cromática, promovendo maior saturação inicial e recuperação em fases tardias, enquanto os tratamentos sem extrato apresentam um desenvolvimento mais gradual e contínuo.

O **ângulo de matiz (h°)** (Figura 22), apresentou alterações expressivas ao longo do período de armazenamento, evidenciando a transição gradual do tom das amostras. Observou-se uma evolução desde matizes mais avermelhados, caracterizados por valores de h° mais baixos, até tonalidades progressivamente amareladas, associadas a valores de h° mais elevados.

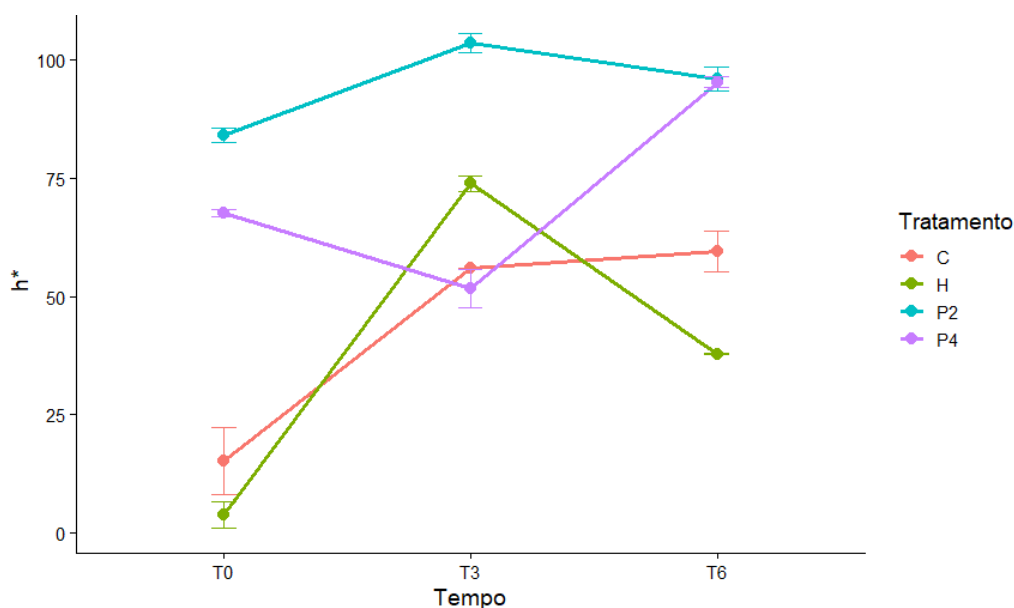


Figura 22-Interação entre tempo e tratamento para variável h^* .

No tempo inicial (T0), as amostras com própolis (P2% e P4%) apresentaram valores de h^* mais elevados (~82–85 e ~67–68, respectivamente), indicando uma tonalidade amarelada predominante.

Por contraste, as amostras C e H exibiram valores mais baixos (~8–22 e ~1–6, respectivamente), associados a matizes mais escuros e avermelhados, compatíveis com a ausência de pigmentos fenólicos coloridos.

A presença inicial de tons amarelados nas amostras com própolis confirma a influência direta dos flavonoides e ácidos fenólicos, especialmente os derivados de ácido ferúlico e cafeico, que atuam como pigmentos naturais e moduladores de cor (Paula et al., 2024; Shahidi & Ambigaipalan, 2015; Singh et al., 2022).

Com o decorrer do armazenamento, observou-se uma mudança acentuada no h^* , cuja magnitude e direção dependem da formulação.

Nas amostras C e H, os valores de h^* aumentaram expressivamente entre T0 e T3 (de ~10 para ~55–75), indicando uma transição gradual de tons avermelhados para amarelados. Esta alteração é atribuída a reações de oxidação e foto degradação dos constituintes da matriz polimérica e proteica, que conduzem à perda da coloração original. No entanto, em T6, o h^* das mesmas amostras diminuiu ligeiramente, sugerindo a saturação do processo oxidativo.

Nas formulações com própolis, o comportamento foi distinto: P2% apresentou um aumento de h° entre T0 e T3 ($\sim 83 \rightarrow \sim 103$), seguido de uma ligeira redução em T6 ($\sim 95-98$), o que indica maior estabilidade e tonalidade amarelada persistente. O P4%, por sua vez, mostrou uma diminuição inicial acentuada até T3 ($\sim 68 \rightarrow \sim 51-56$), seguida de recuperação intensa em T6 ($\sim 94-96$).

Esta variação pode ser explicada pela interação entre os compostos fenólicos da própolis e a matriz de HPMC, que afeta a difusão e redistribuição dos pigmentos ao longo do tempo (Zheng et al., 2025).

O comportamento de P4% em T6, com valores de h° próximos de 96, reflete maior resistência à oxidação e manutenção do tom amarelado, demonstrando que concentrações mais elevadas de compostos fenólicos conferem proteção fotoquímica e estabilização cromática prolongada.

Este efeito é coerente com as observações de Mallegni et al. (2025), que relataram que a incorporação de antioxidantes fenólicos em matrizes biopoliméricas melhora significativamente a estabilidade ótica e resistência à degradação da cor sob condições de envelhecimento.

No conjunto, conclui-se que o própolis modula o comportamento do ângulo de matiz e confere maior proteção ótica ao longo do armazenamento, garantindo coloração mais estável e persistente.

5. Conclusão

O presente trabalho permitiu demonstrar o elevado potencial do extrato etanólico de própolis, proveniente da região de Trás-os-Montes, como agente bioativo natural incorporado em películas de hidroxipropilmetilcelulose (HPMC), com aplicação promissora na conservação de alimentos perecíveis, nomeadamente bifes de frango embalados a vácuo.

Com base nos resultados obtidos, destacam-se as seguintes conclusões principais:

- O extrato de própolis apresentou uma composição rica em compostos fenólicos e flavonoides, com teores elevados de compostos fenólicos totais (~391,68 mg EAG/g) e flavonoides (~107,99 mg EQ/g), evidenciando o seu perfil químico bioativo.
- A atividade antioxidante, avaliada pelo ensaio DPPH, confirmou o potencial do extrato como fonte eficaz de antioxidantes naturais.
- Foi observada uma atividade antimicrobiana significativa do extrato de própolis contra *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Candida albicans*, demonstrando a sua eficácia frente a microrganismos patogénicos e deterioradores.
- A incorporação do extrato nas matrizes de HPMC revelou-se tecnologicamente viável, promovendo melhorias nas propriedades funcionais das películas. O aumento da concentração de própolis de 2 % para 4 % resultou em incrementos na concentração de compostos fenólicos, bem como na capacidade antioxidante e antimicrobiana das películas ativas.
- As películas com extrato de própolis induziram reduções significativas nas contagens microbianas (mesófilos totais, coliformes, *E. coli*, bolores e leveduras) ao longo do armazenamento. Não foram detetados patogénicos como *S. aureus* coagulase positiva ou *Listéria monocytogenes*, reforçando a eficácia antimicrobiana do sistema.
- A análise espectrofotométrica na região UV evidenciou a migração gradual dos compostos fenólicos para o alimento, indicando um comportamento de libertação controlada desejável em sistemas de embalagem ativa.

- As formulações com própolis influenciaram significativamente os parâmetros cromáticos das películas, sendo que a formulação com 4 % de extrato (P4%) manteve uma maior estabilidade ótica e cromática, com valores mais constantes de b^* e h^* , associados a uma menor degradação da cor e maior resistência à oxidação.
- A formulação P4 % destacou-se como a mais eficaz em termos de desempenho global, integrando de forma eficiente o extrato de própolis na matriz polimérica de HPMC, resultando numa estrutura homogênea, funcionalmente estável e com elevada performance antioxidante e antimicrobiana.

Em síntese, a película com HPMC–própolis a 4 % revelou-se uma alternativa natural, segura e sustentável aos conservantes sintéticos, com elevado potencial para prolongar a vida útil e preservar a qualidade microbiológica e visual de produtos cárneos embalados a vácuo. Este sistema contribui não só para o aumento da segurança alimentar, como também para a valorização de produtos apícolas locais, promovendo a utilização de ingredientes naturais com impacto positivo na saúde e no ambiente.

6. Perspetivas Futuras

Os resultados obtidos demonstram o potencial das películas de HPMC incorporados com extrato etanólico de própolis na preservação da carne de frango, abrindo várias possibilidades para investigação futura.

Uma linha relevante consiste em alargar a aplicação das películas a outros alimentos perecíveis, como peixe, carne bovina ou produtos vegetais minimamente processados, de modo a avaliar o seu desempenho em diferentes matrizes. Ensaios de armazenamento mais prolongado e em condições mais desafiantes permitirão compreender a durabilidade funcional das películas e a estabilidade dos compostos fenólicos, esclarecendo também a persistência do efeito antimicrobiano.

A quantificação dos compostos fenólicos e/ou flavonoides presentes na película e na superfície da carne ao longo do armazenamento seria essencial para estabelecer a relação entre a redução microbiana e a quantidade residual de bioativo, validando a hipótese de libertação controlada. Paralelamente, a caracterização estrutural e físico-química da película incluindo espessura, porosidade, aderência e atividade de água da superfície

recoberta contribuiria para uma melhor compreensão dos mecanismos de difusão e de contacto com os microrganismos.

Será igualmente importante aprofundar o efeito do própolis sobre microrganismos Gram-negativos através de ensaios específicos, bem como distinguir o impacto da barreira física da película (redução de oxigénio, humidade) do efeito químico dos compostos bioativos, esclarecendo o contributo de cada componente da formulação. A otimização das propriedades mecânicas e de permeabilidade das películas representa também uma oportunidade para melhorar a sua funcionalidade.

A investigação futura deverá contemplar maior detalhe metodológico, incluindo variabilidade técnica, replicação e limites de deteção, de forma a reforçar a comparabilidade com a literatura. Estudos toxicológicos, de migração e de enquadramento regulamentar serão fundamentais para garantir segurança e viabilidade comercial. A valorização de própolis de origem local e a avaliação da aceitação do consumidor, bem como a análise da viabilidade de produção em escala industrial, constituem igualmente etapas essenciais para a transição desta tecnologia para aplicação real.

De forma global, as películas ativas de HPMC e própolis apresentam elevado potencial para integrarem soluções naturais e sustentáveis de embalagem alimentar, sendo expectável que os desenvolvimentos futuros contribuam para o avanço tecnológico e para alternativas mais seguras e ambientalmente responsáveis.

Referências Bibliográficas

- Agência Nacional de Vigilância Sanitária [ANVISA]. (2018). Instrução Normativa n.º 28, de 26 de julho de 2018. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. https://www.in.gov.br/materia/-/asset_publisher/Kujrw0TZC2Mb/content/id/36893857
- AOAC International. (2000). Official method 989.13 — Salmonella in foods: 1-2 Test method. AOAC International. <https://www.aoac.org/official-methods-of-analysis>
- AOAC International. (2005). Official method 2005.03 — Enumeration of total coliforms and Escherichia coli in foods: SimPlate method. AOAC International. <https://www.aoac.org/official-methods-of-analysis>
- Associação Portuguesa de Normalização [IPQ]. (2002). NP 4405:2002 — Microbiologia alimentar. Contagem de microrganismos aeróbios mesófilos. Método por contagem em placa a 30 °C. Instituto Português da Qualidade.
- Associação Portuguesa de Normalização [IPQ]. (2002). NP 4400-1:2002 — Microbiologia alimentar. Contagem de estafilococos coagulase-positiva (Staphylococcus aureus e outras espécies). Parte 1: Método por contagem de colónias obtidas a 37 °C. Instituto Português da Qualidade.
- Abduh, M. Y., Ramdhani, F., Setiawan, A., Rifqialdi, G., Rahmawati, A., & Zainudin, I. M. (2023). Determination of productivity, yield and bioactivity of propolis extract produced by Tetragonula spp. Cultivated in Modular tetragonula hives. *Heliyon*, 9(6), e17304.
- Aboulghazi, A., Bakour, M., Fadil, M., & Lyoussi, B. (2022). Simultaneous Optimization of Extraction Yield, Phenolic Compounds and Antioxidant Activity of Moroccan Propolis Extracts: Improvement of Ultrasound-Assisted Technique Using Response Surface Methodology. *Processes*, 10(2), 297.
- Al-Ani, I., Zimmermann, S., Reichling, J., & Wink, M. (2018). Antimicrobial Activities of European Propolis Collected from Various Geographic Origins Alone and in Combination with Antibiotics. *Medicines*, 5(1), 2.
- Anjum, S. I., Ullah, A., Khan, K. A., Attaullah, M., Khan, H., Ali, H., Bashir, M. A., Tahir, M., Ansari, M. J., Ghramh, H. A., Adgaba, N., & Dash, C. K. (2019). Composition and functional properties of propolis (bee glue): A review. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 26(7), 1695–1703.

- Anthis, N. J., & Clore, G. M. (2013). Sequence-specific determination of protein and peptide concentrations by absorbance at 205 nm. *Protein Science: A Publication of the Protein Society*, 22(6), 851–858.
- Bankova, V. S., Castro, S. L. de, & Marcucci, M. C. (2000). Propolis: Recent advances in chemistry and plant origin. *Apidologie*, 31(1), 3–15.
- Barroso, B. L., Garcia, A. M., Molina, C., de Vasconcellos, S. P., Vital, V. G., Lago, J. H. G., Camilo, F. F., & Oliveira, L. V. F. de. (2024). Enhanced mechanical and antimicrobial properties of hydroxypropyl methylcellulose films incorporating silver nanoparticles for wound dressing applications. *Polymer Bulletin*, 81(12), 11339–11357.
- Barry. (2024, dezembro 24). UV Light in Biosafety Cabinets: Pros and Cons. *BioSafe Tech by QUALIA*. <https://qualia-bio.com/blog/uv-light-in-biosafety-cabinets-pros-and-cons/>
- Borba, R. S., Klyczek, K. K., Mogen, K. L., & Spivak, M. (2015). Seasonal benefits of a natural propolis envelope to honeybee immunity and colony health. *The Journal of Experimental Biology*, 218(Pt 22), 3689–3699.
- Bouchelaghem, S. (2022). Propolis characterization and antimicrobial activities against *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans*: A review. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 29(4), 1936–1946.
- Burdock, G. A. (1998). Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (propolis). *Food and Chemical Toxicology*, 36(4), 347–363.
- Castaldo, S., & Capasso, F. (2002). Propolis, an old remedy used in modern medicine. *Fitoterapia*, 73, S1–S6.
- Cauich-Kumul, R., & Campos, M. R. S. (2019). Chapter 12—Bee Propolis: Properties, Chemical Composition, Applications, and Potential Health Effects. Em M. R. S. Campos (Ed.), *Bioactive Compounds* (pp. 227–243). Woodhead Publishing.
- Contieri, L. S., De Souza Mesquita, L. M., Sanches, V. L., Chaves, J., Pizani, R. S., Da Silva, L. C., Viganó, J., Ventura, S. P. M., & Rostagno, M. A. (2022). Recent progress on the recovery of bioactive compounds obtained from propolis as a natural resource: Processes, and applications. *Separation and Purification Technology*, 298, 121640.
- Dashipour, A., Razavilar, V., Hosseini, H., Shojaee-Aliabadi, S., German, J. B., Ghanati, K., Khakpour, M., & Khaksar, R. (2015). Antioxidant and antimicrobial carboxymethyl cellulose films containing *Zataria multiflora* essential oil. *International Journal of Biological Macromolecules*, 72, 606–613.

- Dave, D., & Ghaly, A. E. (2011). Meat Spoilage Mechanisms and Preservation Techniques: A Critical Review. *American Journal of Agricultural and Biological Sciences*, 6(4), 486–510.
- de Souza, M. Q., Bierhals, D. V., Reis, A. J., Chimara, E., Vianna, J. S., von Groll, A., da Silva, P. A., & Ramis, I. B. (2024). 2,3,5-triphenyl tetrazolium chloride as colorimetric indicator for drug susceptibility testing against nontuberculous mycobacteria. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 108(1), 116096.
- Diallo, M. (2021). *Chemical characterization and bioactivity of poplar, green and red propolis: A screening study with a food preservation purpose* [masterThesis]. <https://bibliotecadigital.ipb.pt/handle/10198/24706>
- Drescher, N., Klein, A.-M., Neumann, P., Yañez, O., & Leonhardt, S. D. (2017). Inside Honeybee Hives: Impact of Natural Propolis on the Ectoparasitic Mite *Varroa destructor* and Viruses. *Insects*, 8(1), 15.
- EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies (NDA). (2010). Scientific Opinion on the substantiation of health claims related to propolis (ID 1242, 1245, 1246, 1247, 1248, 3184) and flavonoids in propolis (ID 1244, 1644, 1645, 3526, 3527, 3798, 3799) pursuant to Article 13(1) of Regulation (EC) No 1924/2006. *EFSA Journal*, 8(10), 1810.
- El Sheikha, A. F., Allam, A. Y., ElObeid, T., Basiouny, E. A., Abdelaal, A. A., Amarowicz, R., Oz, E., Proestos, C., Karrar, E., & Oz, F. (2022). Impact of a Carboxymethyl Cellulose Coating Incorporated with an Ethanolic Propolis Extract on the Quality Criteria of Chicken Breast Meat. *Antioxidants*, 11(6), Artigo 6.
- El-Sakhawy, M., Salama, A., & Mohamed, S. A. A. (2023). Propolis applications in food industries and packaging. *Biomass Conversion and Biorefinery*.
- Falcão, S. I., Freire, C., & Vilas-Boas, M. (2013). A Proposal for Physicochemical Standards and Antioxidant Activity of Portuguese Propolis. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 90(11), 1729–1741.
- Gangadharan, G., Gupta, S., Kudipady, M. L., & Puttaiahgowda, Y. M. (2024). Gallic Acid Based Polymers for Food Preservation: A Review. *ACS Omega*, 9(36), 37530–37547.
- Gedikoğlu, A. (2022). Antimicrobial and Antioxidant Activities of Commercialized Turkish Propolis Extract, and Application to Beef Meatballs. *Turkish Journal of Agriculture - Food Science and Technology*, 10(10), 2021–2029.

- Gomes, K. O., Silva, L. C. F. M. da, Santos, R. D. dos, Prado, B. A., Montes, P. da S., Rodrigues, L. F. S., Araújo, M. O. de, Bilac, C. A., Freire, D. O., Gris, E. F., Silva, I. C. R. da, Barreto, L. C. L. de S., & Orsi, D. C. (2024). Chemical characterization and antibacterial activities of Brazilian propolis extracts from *Apis mellifera* bees and stingless bees (Meliponini). *PLOS ONE*, *19*(7), e0307289.
- Halboub, E., Al-Maweri, S. A., Al-Wesabi, M., Al-Kamel, A., Shamala, A., Al-Sharani, A., & Koppolu, P. (2020). Efficacy of propolis-based mouthwashes on dental plaque and gingival inflammation: A systematic review. *BMC Oral Health*, *20*(1), 198.
- Hassoun, A., Carpena, M., Prieto, M. A., Simal-Gandara, J., Özogul, F., Özogul, Y., Çoban, Ö. E., Guðjónsdóttir, M., Barba, F. J., Marti-Quijal, F. J., Jambrak, A. R., Maltar-Strmečki, N., Kljusurić, J. G., & Regenstein, J. M. (2020). Use of Spectroscopic Techniques to Monitor Changes in Food Quality during Application of Natural Preservatives: A Review. *Antioxidants*, *9*(9), 882.
- Hatano, T., Kagawa, H., Yasuhara, T., & Okuda, T. (1988). Two new flavonoids and other constituents in licorice root: Their relative astringency and radical scavenging effects. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, *36*(6), 2090–2097.
- Heim, K. E., Tagliaferro, A. R., & Bobilya, D. J. (2002). Flavonoid antioxidants: Chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, *13*(10), 572–584.
- Hossain, R., Quispe, C., Khan, R. A., Saikat, A. S. M., Ray, P., Ongalbek, D., Yeskaliyeva, B., Jain, D., Smeriglio, A., Trombetta, D., Kiani, R., Kobarfard, F., Mojgani, N., Saffarian, P., Ayatollahi, S. A., Sarkar, C., Islam, M. T., Keriman, D., Uçar, A., ... Cho, W. C. (2022). Propolis: An update on its chemistry and pharmacological applications. *Chinese Medicine*, *17*(1), 100.
- Ioirish, A. (1982). *As Abelhas: Farmacêuticas com Asas*. Mir Moscou.
- Irigoiti, Y., Navarro, A., Yamul, D., Libonatti, C., Tabera, A., & Basualdo, M. (2021). The use of propolis as a functional food ingredient: A review. *Trends in Food Science and Technology*, *115*, 297–306.
- International Organization for Standardization [ISO]. (2008). ISO 21527-2:2008 — Microbiology of food and animal feeding stuffs — Horizontal method for the enumeration of yeasts and moulds — Part 2: Colony count technique in products with water activity less than or equal to 0.95. International Organization for Standardization.
- International Organization for Standardization [ISO]. (2017). ISO 11290-1:2017 — Microbiology of the food chain — Horizontal method for the detection and enumeration

- of *Listeria monocytogenes* and of *Listeria* spp. — Part 1 e 2: Detection method. International Organization for Standardization.
- Jonaidi Jafari, N., Kargozari, M., Ranjbar, R., Rostami, H., & Hamedi, H. (2018). The effect of chitosan coating incorporated with ethanolic extract of propolis on the quality of refrigerated chicken fillet. *Journal of Food Processing and Preservation*, 42(1).
- Kaczmarek-Szczepańska, B., Grabska-Zielińska, S., & Michalska-Sionkowska, M. (2023). The Application of Phenolic Acids in The Obtainment of Packaging Materials Based on Polymers—A Review. *Foods*, 12(6), 1343.
- Katiyar, D. (2023). Propolis: A natural biomaterial. *Materials Today: Proceedings*.
- Katiyo, W., De Kock, H. L., Coorey, R., & Buys, E. M. (2020). Sensory implications of chicken meat spoilage in relation to microbial and physicochemical characteristics during refrigerated storage. *LWT*, 128, 109468.
- Lee, D. D., Lee, E. Y., Jeong, S. H., & Chang, C. L. (2007). Evaluation of a colorimetric broth microdilution method for antimicrobial susceptibility testing using 2, 3, 5-triphenyltetrazolium chloride. *Korean J Clin Microbiol*, 10(1), 49–53.
- Lustosa, S. R., Galindo, A. B., Nunes, L. C. C., Randau, K. P., & Rolim Neto, P. J. (2008). Propolis: Updates on chemistry and pharmacology. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 18, 447–454.
- Mahdavi-Roshan, M., Gheibi, S., & Pourfarzad, A. (2022). Effect of propolis extract as a natural preservative on quality and shelf life of marinated chicken breast (chicken Kebab). *LWT*, 155, 112942.
- Mallegni, N., Cicogna, F., Passaglia, E., Gigante, V., Coltelli, M.-B., & Coiai, S. (2025). Natural Antioxidants: Advancing Stability and Performance in Sustainable Biobased and Biodegradable Plastics. *Compounds*, 5(1), 4.
- Marcucci, M., & Custódio, Â. (2018). Própolis: Correlação química e biológica. *Revista Chemkeys*, 1–23.
- Mazza, G., Fukumoto, L., Delaquis, P., Girard, B., & Ewert, B. (1999). Anthocyanins, Phenolics, and Color of Cabernet Franc, Merlot, and Pinot Noir Wines from British Columbia. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(10), 4009–4017.
- Mehdizadeh, T., & Mojaddar Langroodi, A. (2019). Chitosan coatings incorporated with propolis extract and *Zataria multiflora* Boiss oil for active packaging of chicken breast meat. *International Journal of Biological Macromolecules*, 141, 401–409.
- Mohammadzadeh, A., Farnia, P., Ghazvini, K., Behdani, M., Rashed, T., & Ghanaat, J. (2006). Rapid and low-cost colorimetric method using 2,3,5-triphenyltetrazolium

- chloride for detection of multidrug-resistant Mycobacterium tuberculosis. *Journal of Medical Microbiology*, 55(12), 1657–1659.
- Moise, A. R., & Bobiș, O. (2020). Baccharis dracunculifolia and Dalbergia ecastophyllum, Main Plant Sources for Bioactive Properties in Green and Red Brazilian Propolis. *Plants*, 9(11), 1619.
- Moreira, L., Dias, L. G., Pereira, J. A., & Estevinho, L. (2008). Antioxidant properties, total phenols and pollen analysis of propolis samples from Portugal. *Food and Chemical Toxicology*, 46(11), 3482–3485.
- Moreira, L., Rogão, M., & Estevinho, L. M. (2011). Propólis ao longo da história da humanidade. *O Apicultor*, 73, 21–24.
- Nazari-Bonab, H., Jamilian, P., Radkhah, N., Zarezadeh, M., & Ebrahimi-Mameghani, M. (2023). The effect of propolis supplementation in improving antioxidant status: A systematic review and meta-analysis of controlled clinical trials. *Phytotherapy Research: PTR*, 37(9), 3712–3723.
- Obied, H. K., Allen, M. S., Bedgood, D. R., Prenzler, P. D., & Robards, K. (2005). Investigation of Australian olive mill waste for recovery of biophenols. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(26), 9911–9920.
- Ostrosky, E. A., Mizumoto, M. K., Lima, M. E. L., Kaneko, T. M., Nishikawa, S. O., & Freitas, B. R. (2008). Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI) de plantas medicinais. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 18(2), 301–307.
- Otręba, M., Marek, Ł., Tyczyńska, N., Stojko, J., Kurek-Górecka, A., Górecki, M., Olczyk, P., & Rzepecka-Stojko, A. (2022). Propolis as Natural Product in the Oral Cavity Bacterial Infections Treatment: A Systematic Review. *Applied Sciences*, 12(19), 10123.
- Pan, J., Li, C., Liu, J., Jiao, Z., Zhang, Q., Lv, Z., Yang, W., Chen, D., & Liu, H. (2024). Polysaccharide-Based Packaging Coatings and Films with Phenolic Compounds in Preservation of Fruits and Vegetables-A Review. *Foods (Basel, Switzerland)*, 13(23), 3896.
- Pasupuleti, V. R., Sammugam, L., Ramesh, N., & Gan, S. H. (2017). Honey, Propolis, and Royal Jelly: A Comprehensive Review of Their Biological Actions and Health Benefits. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2017, 1259510.

- Paula, V. B., Dias, L. G., & Estevinho, L. M. (2024). Microbiological and Physicochemical Evaluation of Hydroxypropyl Methylcellulose (HPMC) and Propolis Film Coatings for Cheese Preservation. *Molecules*, 29(9), 1941.
- Paula, V. B., Estevinho, L. M., Cardoso, S. M., & Dias, L. G. (2023). Comparative Methods to Evaluate the Antioxidant Capacity of Propolis: An Attempt to Explain the Differences. *Molecules*, 28(12).
- Paula, V. B., Estevinho, L. M., & Dias, L. G. (2017). Quantification of three phenolic classes and total phenolic content of propolis extracts using a single UV-vis spectrum. *Journal of Apicultural Research*, 56(5), 569–580.
- Paviani, L. C., Saito, E., Dariva, C., Marcucci, M. C., Sanchez-Camargo, A. P., & Cabral, F. A. (2012). Supercritical CO₂ extraction of raw propolis and its dry ethanolic extract. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 29(2), 243.
- Pereira, A. dos S., Bicalho, B., & Neto, F. R. de A. (2003). Comparison of propolis from *Apis mellifera* and *Tetragonisca angustula*. *Apidologie*, 34(3), 291–298.
- Pérez-Jiménez, J., Neveu, V., Vos, F., & Scalbert, A. (2010). Identification of the 100 richest dietary sources of polyphenols: An application of the Phenol-Explorer database. *European Journal of Clinical Nutrition*, 64(3), S112–S120.
- Pietta, P. G. (2000). Flavonoids as antioxidants. *Journal of Natural Products*, 63(7), 1035–1042.
- Pobiega, K., Kraśniewska, K., & Gniewosz, M. (2019). Application of propolis in antimicrobial and antioxidative protection of food quality – A review. *Trends in Food Science and Technology*, 83, 53–62.
- Propolis Market Size, Trends & Drivers | Industry Forecast 2030*. (2025, julho 29). Mordor Intelligence. <https://www.mordorintelligence.com/industry-reports/propolis-market>
- Przybyłek, I., & Karpiński, T. M. (2019). Antibacterial properties of propolis. *Molecules*, 24(11).
- Queiroga, M. C., Laranjo, M., Andrade, N., Marques, M., Costa, A. R., & Antunes, C. M. (2023). Antimicrobial, Antibiofilm and Toxicological Assessment of Propolis. *Antibiotics*, 12(2), 347.
- Rocha, V. M., Portela, R. D., dos Anjos, J. P., de Souza, C. O., & Umsza-Guez, M. A. (2023). Stingless bee propolis: Composition, biological activities and its applications in the food industry. *Food Production, Processing and Nutrition*, 5(1).

- Saeed, F., Ahmad, R. S., Arshad, M. U., Niaz, B., Batool, R., Naz, R., & Ansar Rasul Suleria, H. (2016). Propolis to Curb Lifestyle Related Disorders: An Overview. *International Journal of Food Properties*, *19*(2), 420–437.
- Saelao, P., Borba, R. S., Ricigliano, V., Spivak, M., & Simone-Finstrom, M. (2020). Honeybee microbiome is stabilized in the presence of propolis. *Biology Letters*, *16*(5), 20200003.
- Sahm, D. F., & Washington, J. A. (1991). Antibacterial susceptibility tests: Dilution methods. Em A. Balows, W. J. Hausler, K. L. Herrmann, H. D. Isenberg, & H. J. Shadomy (Eds.), *Manual of Clinical Microbiology* (5.^a ed., pp. 1105–1116). American Society for Microbiology.
- Sahoo, C., Rao, S. R. M., & Sudhakar, M. (2015). HPMC a biomedical polymer in pharmaceutical dosage forms. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Sciences*, *8*, 875–881.
- Segueni, N., Boutaghane, N., Asma, S. T., Tas, N., Acaroz, U., Arslan-Acaroz, D., Shah, S. R. A., Abdellatouf, H. A., Akkal, S., Peñalver, R., & Nieto, G. (2023). Review on Propolis Applications in Food Preservation and Active Packaging. *Plants*, *12*(8), 1654.
- Sforcin, J. M. (2016). Biological Properties and Therapeutic Applications of Propolis. *Phytotherapy Research*, *30*(6), 894–905.
- Shahidi, F., & Ambigaipalan, P. (2015). Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: Antioxidant activity and health effects – A review. *Journal of Functional Foods*, *18*, 820–897.
- Shehata, M. G., Ahmad, F. T., Badr, A. N., Masry, S. H., & El-Sohaimy, S. A. (2020). Chemical analysis, antioxidant, cytotoxic and antimicrobial properties of propolis from different geographic regions. *Annals of Agricultural Sciences*, *65*(2), 209–217.
- Shinu, P., Singh, V., & Nair, A. (2016). Isoniazid and rifampin drug susceptibility testing: Application of 2,3,5-triphenyl tetrazolium chloride assay and microscopic-observation drug-susceptibility assay directly on Ziehl-Neelsen smear positive sputum specimens. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, *20*, 33–40.
- Silva-Carvalho, R., Baltazar, F., & Almeida-Aguiar, C. (2015). Propolis: A Complex Natural Product with a Plethora of Biological Activities That Can Be Explored for Drug Development. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, *2015*(1), 206439.

- Simone-Finstrom, M. (2017). Social Immunity and the Superorganism: Behavioral Defenses Protecting Honey Bee Colonies from Pathogens and Parasites. *Bee World*, 94(1), 21–29.
- Singh, A. K., Kim, J. Y., & Lee, Y. S. (2022). Phenolic Compounds in Active Packaging and Edible Films/Coatings: Natural Bioactive Molecules and Novel Packaging Ingredients. *Molecules*, 27(21), 7513.
- Singleton, V. L., Orthofer, R., & Lamuela-Raventós, R. M. (1999). [14] Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. In *Methods in Enzymology* (Vol. 299, pp. 152–178). Academic Press.
- Stanicka, K., Dobrucka, R., Woźniak, M., Sip, A., Majka, J., Kozak, W., & Ratajczak, I. (2021). The Effect of Chitosan Type on Biological and Physicochemical Properties of Films with Propolis Extract. *Polymers*, 13(22), 3888.
- Swatland, H. J. (1989). A Review of Meat Spectrophotometry (300 to 800 nm). *Canadian Institute of Food Science and Technology Journal*, 22(4), 390–402.
- Toreti, V. C., Sato, H. H., Pastore, G. M., & Park, Y. K. (2013). Recent Progress of Propolis for Its Biological and Chemical Compositions and Its Botanical Origin. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2013(1), 697390.
- Torlak, E., & Sert, D. (2013). Antibacterial effectiveness of chitosan–propolis coated polypropylene films against foodborne pathogens. *International Journal of Biological Macromolecules*, 60, 52–55.
- Tumbariski, Y., Topuzova, M., & Todorova, M. (2022). *FOOD INDUSTRY APPLICATIONS OF PROPOLIS: A REVIEW*. 40, 257–265.
- Vlad, R.-A., Pinte, A., Pinte, C., Rédei, E.-M., Antonoaea, P., Bîrsan, M., & Ciurba, A. (2025). Hydroxypropyl Methylcellulose—A Key Excipient in Pharmaceutical Drug Delivery Systems. *Pharmaceutics*, 17(6), 784.
- Woisky, R. G., & Salatino, A. (1998). Analysis of propolis: Some parameters and procedures for chemical quality control. *Journal of Apicultural Research*, 37(2), 99–105.
- Woo, S. O., Hong, I., & Han, S. (2015). Extraction Properties of Propolis with Ethanol Concentration. *Journal of Apiculture*, 30(3), 211.
- Zabaiou, N., Fouache, A., Trousson, A., Baron, S., Zellagui, A., Lahouel, M., & Lobaccaro, J.-M. A. (2017). Biological properties of propolis extracts: Something new from an ancient product. *Chemistry and Physics of Lipids*, 207(Pt B), 214–222.

- Zgoda, J. R., & Porter, J. R. (2001). A Convenient Microdilution Method for Screening Natural Products Against Bacteria and Fungi. *Pharmaceutical Biology*, *39*(3), 221–225.
- Zheng, F., Ren, F., Zhu, X., Han, Z., Jia, Y., Liu, X., Chen, B., & Liu, H. (2025). The interaction between starch and phenolic acids: Effects on starch physicochemical properties, digestibility and phenolic acids stability. *Food & Function*, *16*(11), 4202–4225.
- Zulhendri, F., Chandrasekaran, K., Kowacz, M., Ravalía, M., Kripal, K., Fearnley, J., & Perera, C. O. (2021). Antiviral, Antibacterial, Antifungal, and Antiparasitic Properties of Propolis: A Review. *Foods*, *10*(6), Artigo 6.