

Desenvolvimento e caracterização de filmes comestíveis à base de quitosano incorporados com própolis para aplicação na conservação de alimentos

Cristiane De Carli

Dissertação apresentada à Escola Superior Agrária de Bragança para obtenção do Grau de Mestre em Qualidade e Segurança Alimentar, no âmbito de dupla diplomação com a Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Orientadoras

Doutora Soraia Isabel Domingues Marcos Falcão

Doutora Arantzazu Santamaria-Echart

Doutora Celeide Pereira

Bragança

2021

Desenvolvimento e caracterização de filmes comestíveis à base de quitosano incorporados com própolis para aplicação na conservação de alimentos

Trabalho financiado pelo Projeto DivInA (PDR2020-101-031734), no âmbito de uma iniciativa comunitária promovida pelo PDR2020 e cofinanciada pelo FEADER, Portugal 2020. Este trabalho foi também financiado pelo projecto GreenHealth e parcialmente financiado pelo CIMO UID/AGR/00690/2019) através do FEDER no âmbito do PT2020.



“O sucesso é a soma de pequenos esforços repetidos dia após dia.”

Robert Collier

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pela vida, pelas oportunidades oferecidas e alcançadas.

Aos meus pais, Josemar De Carli e Valci R. De Carli, por todos os ensinamentos, amor, motivação, incentivo, apoio, carinho, valores, educação e por acreditarem que tudo seria e será possível.

Ao meu namorado Lucas V. Cavichi, por toda ajuda, encorajamento, determinação, incentivo, amor, que ao longo desses 6 anos me fez seguir em frente me dando forças para nunca desistir e sim persistir.

Aos meus sogros, Elaine P. Cavichi e Marcos Cavichi que, mesmo não estando mais presente entre nós, permanecerá em meu coração toda gratidão pelo apoio e vivência.

Aos meus familiares, tios, tias, avós, primos e primas que me apoiaram.

Aos meus amigos que acreditaram que essa etapa seria possível, e aos novos amigos que Portugal proporcionou conhecer e se tornar a nova família quando estávamos longe de pais e familiares.

Em especial, agradeço as professoras e orientadoras Dra. Soraia I. D. M. Falcão e Dra. Arantzazu Santamaria-Echart por todos ensinamentos e conhecimentos transmitidos, por acompanhar e auxiliar para que este trabalho fosse desenvolvido. Assim como, aos demais professores que fizeram parte do desenvolvimento e aprendizado Dra. Paula C. A. Rodrigues e Dr. Miguel J. R. Vilas Boas. A professora e Dra. Celeide Pereira da UTFPR de Medianeira, pelo incentivo, apoio e conclusão deste trabalho.

A Andreia V. F. Tomás, por toda ajuda, paciência, determinação, incentivo para que esse trabalho fosse realizado da melhor maneira possível. Ao Volkan Aylanc, pela ajuda e ensinamentos, Thank you very much!

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

Por fim, a toda equipe do CIMO e IPB por proporcionar a realização deste trabalho, além de agregar muito conhecimento, oferecer oportunidades e experiências.

Gratidão a tudo e a todos!

RESUMO

O quitosano é um biopolímero natural obtido a partir da desacetilação da quitina e considerado o polímero mais abundante depois da celulose. A quitina é geralmente extraída de exoesqueletos de crustáceos, como os encontrados na espécie invasora, o lagostim vermelho, *Procambarus clarkii*, que pode ser usada como fonte para produzir quitosano, um biopolímero com características atrativas, incluindo de não toxicidade, atividade antimicrobiana, biocompatibilidade e biodegradabilidade e apresentando potencial para a utilização em diversas áreas, nomeadamente biomedicina, engenharia de tecidos ou em aplicações agrícolas. A produção de filmes com base de quitosano está a receber uma grande atenção em termos de aplicações a níveis industriais no setor alimentício, visto que são capazes de preservar e prolongar a vida útil dos produtos perecíveis como hortaliças e frutas. Para melhorar as propriedades biológicas que os filmes de quitosano apresentam, entre as quais antimicrobiana, antioxidante e antifúngica, uma gama de extratos naturais pode ser adicionada para potencializar as propriedades dos filmes comestíveis. A própolis apresenta propriedades biológicas importantes como agente antimicrobiano e antioxidante, assim, sua incorporação em filmes comestíveis, proporcionam um aumento na vida útil do alimento e agregam valor nutricional. Deste modo, o presente deste estudo teve por objetivo desenvolver um filme comestível a base de quitosano com adição de diferentes concentrações de própolis, para a posterior aplicação em alimentos, avaliando a sua atividade antimicrobiana com o objetivo de prolongar o tempo de vida de prateleira do produto.

Para efeitos quanto a metodologia, fez-se a caracterização da própolis com análise de compostos fenólicos, para caracterização dos filmes fez-se análises de espessura, cor, transmitância ótica, SEM, solubilidade em água, FTIR, TGA e propriedades mecânicas e por fim atividade de bioatividades como antioxidantes e antimicrobiana.

A composição fenólica da própolis permitiu a identificação de 41 compostos fenólicos, entre os mais abundantes se destacaram o ácido cafeico, pinocembrina, 3-*O*-acetato de pinobanksina, quercetina e galangina. Quando a caracterização dos filmes, a espessura apresentou medida de aproximadamente 70 μm , a coloração observou-se redução na luminosidade L^* e uma variação nos parâmetros a^* e b^* , para transmitância ótica, relatou-se diminuição da permeabilidade de luz com a adição do extrato da própolis, todos os filmes se apresentaram homogêneos quando feita análise de SEM, ocorreu diminuição significativa da solubilidade de água conforme adição de própolis, para análise de FTIR, os principais picos observados foram grupos aminos, hidroxilos e amidas, o

ensaio de TGA apresentou 3 etapas de degradação, as propriedades mecânicas foi possível observaraumento na tensão, redução na capacidade de deformação e aumento na rigidez. Quanto a bioatividade, a capacidade antioxidante apresentou resultados satisfatórios, com valoresde 49,8% a 94,5% de inibição dos radicais livres, já a atividade antimicrobiana, apresentou aumento na inibição do desenvolvimento microbiano com a adição de extrato da própolis na formulação do filme de quitosano, com estudo *in vitro* observou-se inibição no crescimento de fungos e bactérias como *Botrytis cinerea*, *Cladosporium* sp, *Penicillium brevicompatum* e *Staphylococcus aureus* respectivamente, já na aplicação em amoras observou-se reduções de 3 ciclos log para as bactérias, 0,3 ciclos de log para levedura e 1,5 ciclos log no crescimento dos bolores. Desta forma, destaca-se a usabilidade de filmes de quitosano com adição de própolis para controlar o desenvolvimento microbiano e prolongar a vida útil de produtos como frutas.

Palavras-chave: Quitosano, própolis, filmes comestíveis, atividade antimicrobiana, vida útil.

ABSTRACT

Chitosan is a natural biopolymer obtained from the deacetylation of chitin and considered the most abundant polymer after cellulose. Chitin is usually extracted from crustaceans' exoskeletons, such as found in the invasive species, the red crawfish, *Procambarus clarkii*, which can be used as source to produce chitosan, a biopolymer with attractive characteristics including non-toxicity, antimicrobial activity, biocompatibility and biodegradability, showing potential to be used in diverse areas, namely biomedicine, tissue engineering or agricultural applications. The production of chitosan-based films is receiving great attention in terms of applications at industrial levels in the food sector since they are able to preserve and prolong the useful life of perishable products such as vegetables and fruits. To improve the biological properties showed by the chitosan films, namely antimicrobial, antioxidant and antifungal, a range of natural extracts can be added to enhance the properties of edible films. Propolis has important biological properties as an antimicrobial and antioxidant agent, thus, its incorporation in edible films provides an increase in the useful life of the food and add nutritional value. In this way, the present study intends to develop an edible film based on chitosan with the addition of different concentrations of propolis, proceeding with its application in foods, evaluating its antimicrobial activity, with the objective of prolonging the shelf life of the product.

For the purpose of the methodology, the propolis was characterized with analysis of phenolic compounds, for characterization of the films were made analyses of thickness, color, optical transmittance, SEM, solubility in water, FTIR, TGA and mechanical properties and finally activity of bioactivities as antioxidants and antimicrobial. The phenolic composition of propolis allowed the identification of 41 phenolic compounds, among the most abundant were caffeic acid, pinocembrine, pinobanksin 3-*O*-acetate, quercetin and galangin. When characterizing the films, the thickness was measured at approximately 70 μm , the coloration was observed a reduction in the luminosity L^* and a variation in the parameters a^* and b^* , for optical transmittance, a decrease in light permeability was reported with the addition of propolis extract, all films were homogeneous when SEM analysis was performed, there was a significant decrease in water solubility according to the addition of propolis to FTIR, the main peaks observed were amino groups, hydroxyls and amides, the TGA test presented 3 degradation steps, the mechanical properties were possible to observe increase in tension, reduction in deformation capacity and increase in rigidity.

Regarding bioactivity, the antioxidant capacity presented satisfactory results, with values from 49.8% to 94.5% of free radical inhibition, and antimicrobial activity, showed increased inhibition of microbial development with the addition of propolis extract in the formulation of chitosan film, with in vitro study was observed inhibition in the growth of fungi and bacteria such as *Botrytis cinerea*, *Cladosporium* sp, *Penicillium brevicompatum* and *Staphylococcus aureus* respectively, on the other hand, reductions of 3 log cycles were observed for bacteria, 0.3 log cycles for yeast and 1.5 log cycles in mold growth. In this way, we highlight the usability of chitosan films with the addition of propolis to control microbial development and prolong the life of products such as fruits.

Keywords: Chitosan, propolis, edible films, antimicrobial activity, useful life.

Índice

RESUMO	4
ABSTRACT	6
LISTA DE FIGURAS	10
LISTA DE ABREVIACÕES.....	14
1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
1.1 Produtos apícolas.....	15
1.1.1 Própolis.....	16
1.1.1.1 Composição e origem vegetal da própolis	17
1.1.1.2 Propriedades biológicas.....	18
1.1.1.3 Aplicações da própolis na indústria alimentar	19
1.2 Lagostim.....	20
1.3 Quitina.....	22
1.4 Quitosano.....	24
1.5 Filmes comestíveis	26
2. OBJETIVOS.....	28
2.1 Objetivo geral.....	28
2.2 Objetivos específicos.....	29
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	30
3.1 Amostragem	30
3.2 Isolamento da quitina	30
3.3 Produção de quitosano.....	30
3.4 Extração etanólica da própolis.....	30
3.5 Preparação e produção dos filmes de quitosano.....	31
3.6 Caracterização dos compostos fenólicos da própolis	31
3.6.1 Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa (LC-MS).....	31
3.7 Caracterização do quitosano e filmes	32
3.7.1 Espessura dos filmes	32
3.7.2 Medição de cor.....	33
3.7.3 Transmitância ótica	33
3.7.5 Solubilidade dos filmes em água.....	33
3.7.6 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR).....	34
3.7.7 Análise termogravimétrica (TGA)	34
3.7.8 Propriedades mecânicas	34
3.7.9 Atividade antioxidante	34

3.7.10	Análise microbiológica.....	35
3.7.10.1	Avaliação <i>in vitro</i> da atividade antimicrobiana dos filmes	35
3.7.10.1.1	Microrganismos utilizados	35
3.7.10.1.2	Preparação das suspensões celulares	36
3.7.10.1.3	Ensaio <i>in vitro</i>	36
3.7.10.2.	Avaliação da atividade antimicrobiana dos filmes em amoras.....	37
3.7.11	Análise estatística dos dados	39
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	40
4.1	Compostos fenólicos da própolis.....	40
4.2	Espessura dos filmes.....	44
4.3	Cor	44
4.4	Transmitância ótica	45
4.5	SEM.....	46
4.6	Solubilidade em água	47
4.7	FTIR	48
4.8	TGA.....	49
4.9	Propriedades mecânicas.....	52
4.10	Atividade antioxidante.....	53
4.11	Atividade antimicrobiana dos filmes.....	54
5.	CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS FUTURAS	63
6.	REFERÊNCIAS	66
7.	ANEXOS	88

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Produtos apícolas	15
Figura 2 - Própolis	17
Figura 3 - Estruturas químicas dos compostos fenólicos mais comuns encontrados na própolis a) Derivados ácido cinâmico; b) Derivados de ácido benzóico e c) Flavóides	18
Figura 4 - <i>Procambarus clarkii</i>	21
Figura 5 - Quitina	22
Figura 6 - Estruturas moleculares a) α -quitina; b) β -quitina e c) γ -quitina	23
Figura 7 - Quitosano	24
Figura 8 - Esquema de obtenção do quitosano	24
Figura 9 - Perfil cromatográfico a 280 nm do extrato etanólico da própolis.....	40
Figura 10 - Estruturas dos compostos mais abundantes na própolis. a) Ácido cafeico, b) Pinocembrina, c) 3-O-acetato de pinobanksina, d) Quercitina e e) Galangina.....	41
Figura 11 - Transmitância ótica dos filmes	46
Figura 12 - Microscopia eletrônica de varredura dos filmes contendo A= 0%, B= 5%, C= 10% e D= 20% de própolis.....	47
Figura 13 - Espectros FTIR	48
Figura 14 - Perda de massa em função da temperatura	50
Figura 15 - Velocidade de perda de massa em função da temperatura.....	50
Figura 16 - Curvas de tensão x deformação dos filmes.....	52
Figura 17 - Atividade antimicrobiana de filmes de própolis contra <i>Botrytis cinerea</i> CIMO 21MS019. Colunas: A. Difusão em disco de ágar; B. Difusão em gota de ágar. Linhas: 1. Antifúngico comercial Bayer Teldor (1,5mg/100mL); 2. Controlo negativo; 3. Filme 0%; 4. Filme 5%; 5. Filme 10%; 6. Filme 20% (em triplicado).	56
Figura 18 - Atividade antimicrobiana de filmes de própolis contra <i>Cladosporium</i> sp CIMO 21MS014. Colunas: A. Difusão em disco de ágar; B. Difusão em gota de ágar. Linhas: 1. Antifúngico comercial Bayer Teldor (1,5mg/100mL); 2. Controlo negativo; 3. Filme 0%; 4. Filme 5%; 5. Filme 10%; 6. Filme 20% (em triplicado).	56
Figura 19 - Atividade antimicrobiana de filmes de própolis contra <i>Penicillium brevicompatum</i> CIMO 21MS015. Colunas: A. Difusão em disco de ágar; B. Difusão em gota de ágar. Linhas: 1. Antifúngico comercial Bayer Teldor (1,5mg/100mL); 2. Controlo negativo; 3. Filme 0%; 4. Filme 5%; 5. Filme 10%; 6. Filme 20% (em triplicado).	57

Figura 20 - Atividade antimicrobiana contra <i>Pantoea</i> sp. Detalhe do efeito inibitório dos filmes de própolis a diferentes concentrações	57
Figura 21 - Atividade antimicrobiana <i>Staphylococcus hominis</i> . Detalhe do efeito inibitório dos filmes de própolis a diferentes concentrações	57
Figura 22 - Atividade antimicrobiana de filmes de própolis contra <i>Staphylococcus aureus</i> . Colunas: A. Difusão em disco de ágar; B. Difusão em gota de ágar. Linhas: 1. Antifúngico comercial Bayer Teldor (1,5mg/100mL); 2. Controlo negativo; 3. Filme 0%; 4. Filme 5%; 5. Filme 10%; 6. Filme 20% (em triplicado).....	58
Figura 23 - Contagens (log UFC/g) de aeróbios mesófilos em amoras ao longo de 15 dias de estocagem a 4 °C.....	60
Figura 24 - Contagens (log UFC/g) de levedura em amoras ao longo de 15 dias de estocagem a 4 °C.....	60
Figura 25 - Contagens (log UFC/g) de bolores em amoras ao longo de 15 dias de estocagem a 4 °C.....	61
Figura 26 - Atividade antimicrobiana de filmes de própolis <i>Erwinia</i> sp CIMO 21MS006. Colunas: A. Difusão em disco de ágar; B. Difusão em gota de ágar. Linhas: 1. Antifúngico comercial Bayer Teldor (1,5mg/100mL); 2. Controlo negativo; 3. Filme 0%; 4. Filme 5%; 5. Filme 10%; 6. Filme 20% (em triplicado).	88
Figura 27 - Atividade antimicrobiana de filmes de própolis <i>Arthrobacter</i> sp CIMO 21MS005. Colunas: A. Difusão em disco de ágar; B. Difusão em gota de ágar. Linhas: 1. Antifúngico comercial Bayer Teldor (1,5mg/100mL); 2. Controlo negativo; 3. Filme 0%; 4. Filme 5%; 5. Filme 10%; 6. Filme 20% (em triplicado).....	88
Figura 28 - Atividade antimicrobiana de filmes de própolis <i>Pantoea</i> sp CIMO 21MS004. Colunas: A. Difusão em disco de ágar; B. Difusão em gota de ágar. Linhas: 1. Antifúngico comercial Bayer Teldor (1,5mg/100mL); 2. Controlo negativo; 3. Filme 0%; 4. Filme 5%; 5. Filme 10%; 6. Filme 20% (em triplicado).....	89
Figura 29 - Atividade antimicrobiana de filmes de própolis <i>Staphylococcus hominis</i> . CIMO 21MS001. Colunas: A. Difusão em disco de ágar; B. Difusão em gota de ágar. Linhas: 1. Antifúngico comercial Bayer Teldor (1,5mg/100mL); 2. Controlo negativo; 3. Filme 0%; 4. Filme 5%; 5. Filme 10%; 6. Filme 20% (em triplicado).	89
Figura 30 - Atividade antimicrobiana de filmes de própolis <i>Escherichia coli</i> . Colunas: A. Difusão em disco de ágar; B. Difusão em gota de ágar. Linhas: 1. Antifúngico comercial Bayer Teldor (1,5mg/100mL); 2. Controlo negativo; 3. Filme 0%; 4. Filme 5%; 5. Filme 10%; 6. Filme 20% (em triplicado).	90

Figura 31 - Atividade antimicrobiana de filmes de própolis <i>Bacillus cereus</i> . Colunas: A. Difusão em disco de ágar; B. Difusão em gota de ágar. Linhas: 1. Antifúngico comercial Bayer Teldor (1,5mg/100mL); 2. Controlo negativo; 3. Filme 0%; 4. Filme 5%; 5. Filme 10%; 6. Filme 20% (em triplicado).	90
Figura 32 - Atividade antimicrobiana de filmes de própolis <i>Metchnikowia rancensis</i> . CIMO 21MS010. Colunas: A. Difusão em disco de ágar; B. Difusão em gota de ágar. Linhas: 1. Antifúngico comercial Bayer Teldor (1,5mg/100mL); 2. Controlo negativo; 3. Filme 0%; 4. Filme 5%; 5. Filme 10%; 6. Filme 20% (em triplicado).	91
Figura 33 - Atividade antimicrobiana de filmes de própolis <i>Alternaria</i> sp. CIMO 21MS020. Colunas: A. Difusão em disco de ágar; B. Difusão em gota de ágar. Linhas: 1. Antifúngico comercial Bayer Teldor (1,5mg/100mL); 2. Controlo negativo; 3. Filme 0%; 4. Filme 5%; 5. Filme 10%; 6. Filme 20% (em triplicado).	91
Figura 34 - Soluções de própolis para realização dos filmes.	91
Figura 35 - Filmes 0%, 5%, 10% e 20%, usados para realização da caracterização.....	92
Figura 36 - Soluções dos filmes para aplicação em amoras.....	92
Figura 37 - Amoras envolvidas com a solução de filme 0%.	92
Figura 38 - Amoras envolvidas com a solução de filme 10%.....	93

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Lista de microrganismos usados no presente estudo	36
Tabela 2 - Condições de cultura e incubação dos microrganismos teste no ensaio in vitro de atividade antimicrobiana	37
Tabela 3 - Identificação e quantificação dos compostos fenólicos da própolis através de LC/DAD/ESI-MS ⁿ (média±desvio padrão, n=2).....	42
Tabela 4 – Espessuras dos filmes	44
Tabela 5 - Propriedades da cor dos filmes.....	45
Tabela 6 - Solubilidade em água dos filmes	47
Tabela 7 - Etapas de perda de massa das matérias-primas e filmes incluindo a temperatura de degradação (TD) e perda de massa (PM).....	51
Tabela 8 - Propriedades mecânicas dos filmes	52
Tabela 9 - Capacidade antioxidante dos filmes	54

LISTA DE ABREVIACOES

a.C.	Antes de Cristo
ABTS	3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato
ATR	Refletância total atenuada
CIMO	Centro de Investigao de Montanha
DPPH	2,2-difenil-1-picril-hidrazilo
DRBC	gar Dicloran Rosa Bengala Cloranfenicol Base
E	Modulo elástico
EtOH	Etanol
FDA	Food and Drug Administration
FTIR	Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier
GRAS	Geralmente Reconhecido como Seguro
LC-MS	Cromatografia líquida acoplada  espectrometria de massa
PBS	Tampão Salino Fosfato
m/z	Massa dividida pelo número de carga
MHA	Agar Mueller Hinton
PCA	gar contagem placa (Plate count agar)
PDA	gar de dextrose de batata (Potato dextrose agar)
PM	Perda de massa
rpm	Rotaes por minutos
SEM	Microscopia eletrnica de varredura
TD	Temperatura de degradao
TGA	Análise termogravimétrica
tR	Tempo de reteno
UFC	Unidade formadora de colnias
UTFPR	Universidade Tecnológica Federal do Paraná
UV-Visível	Espectroscopia no ultravioleta visível
v/v	Volume/volume
R	Deformao a ruptura
λmax	Comprimento de onda máximo
σR	Tensão a ruptura

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 Produtos apícolas

A apicultura é uma atividade ligada ao sector da agricultura, que consiste na criação e gestão de colónias de abelhas com o objetivo principal de recolher produtos apícolas, proporcionando em simultâneo um serviço de polinização fundamental à manutenção dos ecossistemas e reprodução das plantas (Bommarco et al., 2012).

Existem referências do uso dos produtos apícolas desde a antiguidade, onde os povos antigos faziam uso do mel e do pólen no tratamento de ferimentos, úlceras e a cera de abelha era vista como um objeto sagrado utilizada em alimentos, confecções de artigos religiosos (Bankova et al., 2002; Al-Jabri, 2005; Fratellone, 2015; Khan et al., 2018).



Figura 1 - Produtos apícolas
Fonte: (Dorazio, 2017)

Atualmente, além do mel, outros produtos com diferentes características e potencialidades podem ser obtidos a partir da colmeia, como a cera, o pólen, o pão de abelha, a geleia real, o veneno de abelha e a própolis. O crescente interesse da comunidade científica por estes produtos deve-se à sua capacidade nutricional e farmacológica, que está diretamente relacionada com a sua composição rica em compostos bioativos (Lin et al., 2020). De entre as inúmeras propriedades biológicas apresentadas pelos produtos da colmeia destacam-se as propriedades anti-inflamatórias, antioxidantes, antialérgicas, antimicrobianas, antivirais e antitumorais (Pasupuleti et al., 2017, Bílikova et al., 2015). Os produtos apícolas podem ser vistos como potenciais auxiliares em algumas doenças, entre os quais, o mel tem sido considerado inibidor de gastrite (Header et al., 2016), o pólen apícola é utilizado na diabetes (Laaroussi et al., 2020), a geleia real tem sido aplicada na prevenção de infeções microbianas (Siavash et al., 2015), a própolis na prevenção do cancro de cólon (Kumazaki et al., 2014), e também como coadjuvante em tratamentos de doenças relacionados a mucosite oral induzida por radioterapia (Münstedt & Männle, 2019).

Além de aplicações farmacológicas, os produtos apícolas têm vindo a destacar-se na área alimentar, devido às suas características nutricionais e funcionais (Lin et al., 2020), a utilização na substituição de conservantes e aditivos sintéticos (Villaroya et al., 2015), na redução do desenvolvimento microbiano, na permanência das características como o aroma e sabor, e sobretudo na conservação durante o armazenamento (Sharif et al., 2017).

De entre os produtos da colmeia, a própolis apresenta grande relevância, com propriedades biológicas variadas, devido à sua extraordinária composição química rica em compostos fenólicos, que mostra as enormes potencialidades deste produto em diferentes áreas de aplicação como a alimentar, onde têm vindo a ser usada como agente antimicrobiano em alimentos.

1.1.1 Própolis

A própolis ou também conhecida como resina de abelha, tem origem nos exsudados de plantas, sendo um material viscoso (Bankova et al., 2000), com uma cor que pode variar entre o castanho, verde e amarelo, que as abelhas misturam com as suas secreções, sendo usada como material de construção e proteção dos seus ninhos (Finstrom & Spivak, 2010). A palavra própolis provem do grego “pró”, para ou defesa, e “polis”, cidade, o que significa um elemento de proteção para a colmeia (Castaldo & Capasso, 2002). A resina, geralmente encontrada em folhas, flores e em cascas de árvores como o eucalipto, choupo, acácia entre outras, é recolhida pelas abelhas melíferas (*Apis mellifera*) (Crane, 1970), sendo-lhe adicionada as suas enzimas salivares e cera, transformando essa mistura na própolis, onde é aplicada na colmeia para selar brechas e evitar entrada de intrusos (Marcucci, 1995; Martinotti & Ranzato, 2015).

Desde 300 a.C. que existem registos da aplicação desta resina, tendo sido usada por diferentes culturas como remédio natural e em produtos pessoais (Bankova, 2005). No antigo Egito, a própolis era usada para embalsamar cadáveres devido suas propriedades anti-putrefativas (Crane, 1970), prática também desempenhada pelas abelhas nas suas colmeias, onde a própolis é usada como um elemento embalsamador, para envolver os vasos grandes que as mesmas mataram, porém não conseguem transportar para fora da colmeia (Castaldo & Capasso, 2002; S. Falcão, 2013).



Figura 2 - Própolis
Fonte: (Willies, 2018)

1.1.1.1 Composição e origem vegetal da própolis

A própolis é constituída por 50% resina, 30% cera, 10% óleos essenciais, 5% pólen e 5% outros componentes, entre os quais, vitaminas, sais minerais, compostos fenólicos e aminoácidos (Burdock, 1998). A composição química da própolis, está diretamente relacionada com as condições fitogeográficas do sítio de colheita, pois as abelhas podem fazer a recolha da própolis de várias espécies de plantas, brotos, flores e em diversos habitats distintos, determinando a diversidade química, tornando-se numa fonte de compostos bioativos de distintos tipos estruturais (Popova et al., 2010). A época da colheita e a espécie da abelha, também são fatores que contribuem para que ocorram variações na composição que se vão refletir nas suas propriedades químicas, físicas e biológicas.

Foram identificados cerca de 300 compostos químicos na própolis (Bankova et al., 2000), a maior parte dos elementos bioativos são constituídos por compostos fenólicos conforme Figura 3, onde se incluem os ácidos fenólicos (derivados do ácido benzóico e cinâmico) e os flavonóides (flavonas, flavonóis, flavanonas, di-hidroflavonóis, isoflavonóides, chalconas e di-hidrochalconas) (Robles et al., 2021; Huang et al., 2012; Xu et al., 2017). Estes compostos, de uma forma geral, são considerados metabolitos essenciais para as plantas sendo produzidos com finalidades diversas, tais como conferir proteção, crescimento e reprodução (Mignet et al., 2013).

No caso das regiões de clima temperado, como a Europa, América do Norte e regiões não-tropicais da Ásia, em que o choupo é a principal fonte da resina, os compostos mais abundantes são os flavonóides livres, (pinocembrina, galangina, crisina, pinobanksina) os seus ésteres (acetato de 3 -*O*-pinobanksina), ácidos fenólicos (derivados do ácido cinâmico) e os seus ésteres (cafeato de feniletilo) (Bankova, 2000; Falcão et. al., 2013). Em regiões onde o género *Populus* não é nativo, as abelhas apresentam

preferências para as espécies *Ulmus*, *Pinus*, *Quercus*, *Salix* e *Acacia*, também descritas como fontes da própolis (Falcão et al., 2013).

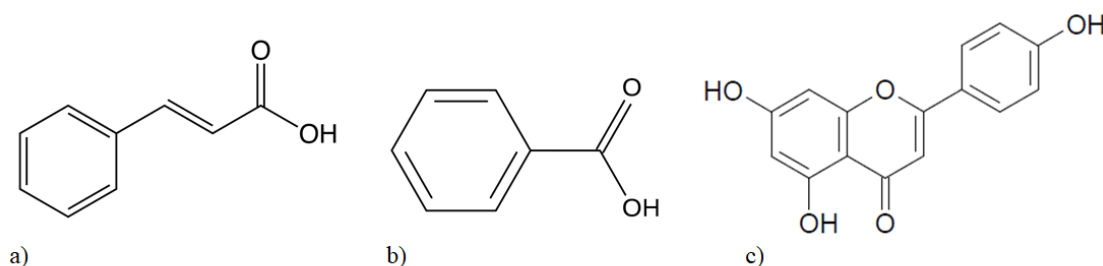


Figura 3 - Estruturas químicas dos compostos fenólicos mais comuns encontrados na própolis

a) Derivados ácido cinâmico; b) Derivados de ácido benzóico e c) Flavóides

Nas zonas tropicais, em particular no Brasil, a própolis, que apresenta uma cor verde, tem origem nos rebentos de alecrim-do-campo (*Baccharis dracunculifolia*) e apresenta uma composição rica em derivados prenilados do ácido *p*-cumárico (artepilina C, drupanina), derivados prenilados de acetofenonas, lenhanos, terpenos e flavonóides, diferentes dos encontrados na própolis derivada do choupo (Bankova et al., 2019).

Na própolis vermelha com origem na espécie *Dalbergia*, encontrada em Cuba, México, Venezuela e Brasil, os compostos mais abundantes são os isoflavonóides e seus derivados (Cuesta-Rubio et al., 2002; Ishida et al., 2011), no entanto também foram identificados benzofenonas polipreniladas como compostos maioritários na própolis com origem na resina exsudada pelas flores de *Clusia fluminensis*, presentes em Cuba e Venezuela (Cuesta-Rubio et al., 2002).

Atualmente, o estudo de polifenóis tem crescido por estes apresentarem efeitos benéficos para a saúde, entre os quais estão anticarcinogênicos, antiterogênicos e antimutagênicos (Volpi & Bergonzini, 2006), principalmente os flavonóides com suas propriedades terapêuticas antibacteriana, antifúngica e antiviral (Kujumgiev et al., 1999). A determinação dos compostos fenólicos envolve procedimentos analíticos como extração da amostra, separação analítica e quantificação, assim podendo ser avaliados pela cromatografia líquida de alta eficiência, cromatografia gasosa entre outros (Caravaca et al., 2006).

1.1.1.2 Propriedades biológicas

As propriedades da própolis, descritas como antimicrobiana, antiviral e antifúngica, são responsáveis pela baixa ocorrência de fungos e bactérias no interior da

colmeia (Bogdanov, 2012), além do mais têm a capacidade de reduzir os riscos de contaminação por doenças provocadas por alguns parasitas que podem comprometer a integridade da colónia. De entre as principais ameaças para as abelhas, encontra-se uma bactéria formadora de esporos, *Paenibacillus larvae*, que está na origem de uma doença altamente contagiosa chamada loque americana (Matheson, 1993), podendo causar perdas aos apicultores devido à obrigatoriedade de destruição das colónias quando a doença é detetada (Genersch et al., 2005). Além desta bactéria, também o ácaro *Varroa destructor* (Garedew et al., 2003) e a traça da cera conhecida como *Galleria mellonella*, representam ameaças à sanidade das colmeias (Shimanuki, 1980; Sohrabi et al., 2019).

Devido sua utilização desde a antiguidade (Marcucci, 1995), nos últimos anos, a própolis tem vindo a ser estudada pelas suas variadas propriedades biológicas, evidenciando o seu poder anti-inflamatório (Sforzin, 2007), antioxidante (Kumazawa et al., 2004), antitumoral (Missima et al., 2010), antiviral (Búfalo et al., 2009), antifúngico (Dobrowolski et al., 1991) e antimicrobiano (Park et al., 1998). A atividade antimicrobiana da própolis demonstrou inibir diferentes microrganismos Gram positivos e negativos, entre os quais: *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas fluorescens* (AbdElsalam et al., 2018; Bekiroglu & Sagdic, 2018; Kaškonienė et al., 2020; Silici & Kutluca, 2005; Siripatrawan et al., 2013), deste modo, apresentando potencial para ser utilizada como conservante alimentar, através da sua incorporação em filmes comestíveis. Suas potencialidades podem ser aumentadas, quando acrescentado outros elementos como o quitosano, derivado da quitina (Siripatrawan & Vitchayakitti, 2016), presente em carcaças de crustáceos como camarões, caranguejos e lagostins.

1.1.1.3 Aplicações da própolis na indústria alimentar

A vida útil dos alimentos é um dos fatores que o setor alimentar visa melhorar, como é o caso de frutas e vegetais, cujo tempo de vida útil é baixo ocasionado principalmente pelas mudanças que ocorrem devido o contato dos alimentos com o meio ambiente (Vergara et al., 2020). Neste sentido, as embalagens antimicrobianas foram desenvolvidas para realizarem uma manutenção na qualidade do produto, aumentando a vida útil e garantindo a qualidade e as propriedades dos alimentos (Bastarrachea et al., 2011).

A própolis tem demonstrado eficácia quando usada como aditivo natural, como foi demonstrado na sua adição a bebidas lácteas e sumos de fruta onde apresentou um efeito

anti-listerial (Thamnopoulos et al., 2018). O efeito conservante da própolis também foi observado quando adicionada a vegetais, frutas, ovos e carne (Bankova et al., 2016). Em virtude das suas características, a própolis apresenta propriedades que permitem a sua aplicação em filmes comestíveis devido à sua atuação como agente antimicrobiano e antifúngico (Pacheco et al., 2019).

A aplicação de filmes comestíveis incorporados com compostos naturais auxiliam na proteção dos alimentos, agregam valor nutricional e bioativo, apresentam propriedades antimicrobianas e antioxidantes, além de acrescentar vida útil ao produto (Bodini et al., 2013; Vargas et al., 2006). Recentemente, na aplicação de biofilmes de quitosano com incorporação de própolis em filetes de peixe, observou-se a redução do crescimento de bactérias mesófilas e psicotróficas, inibição da oxidação lipídica, melhoramento da cor e o aumento da vida útil do produto (Ebadi et al., 2019). Também a aplicação da própolis como revestimento em framboesas foi estudado, tendo os filmes revelado atividade antifúngica, principalmente para *P. digitatum* e *B. cinerea* e conseqüentemente um aumento na vida útil do produto (Moreno et al., 2020).

1.2 Lagostim

O lagostim-vermelho, também conhecido como lagostim de água doce ou do Louisiana, cujo nome científico é *Procambarus clarkii*, é um crustáceo decápode, apresenta um cefalotórax onde se pronunciam as suas duas pinças, um par de antenas, um conjunto de 8 patas e apresenta um télson para a sua locomoção (Martins et al., 2009). É considerado um onívoro, alimentando-se de matéria animal, vegetal viva ou morta, podendo-se alimentar de insetos, vermes e larvas (Correia & Ferreira, 1995).

A extinção da biodiversidade em ecossistemas aquáticos, tem como uma das principais causas espécies exóticas invasoras (Vadeboncoeur et al., 2003). Este é o caso do lagostim-vermelho, uma espécie capaz de se adaptar a diferentes ambientes como pântanos, rios e lagos, por conseguir sobreviver em condições de diferentes temperaturas, água poluída e baixos níveis de oxigênio, prejudicando a fauna e flora local, e assim podendo alterar significativamente a biodiversidade do ecossistema (Twardochleb et al., 2013). Esta espécie, originária do México e Estados Unidos, tem-se espalhado pela Europa, estando presente na Itália, França, Espanha, Portugal entre outros países (Holdich et al., 2009; Kouba et al., 2014). A habilidade do lagostim permanecer em ambientes extremos dá-se pela sua atividade de escavação, protegendo-o das variações de temperaturas e possíveis predadores (Gherardi, 2006). A Espanha é responsável por cerca

de 8-10% da captura do *P. clarkii*, sendo o terceiro maior produtor do mundo (Díaz et al., 2016). Em geral, cerca de 80% das carapaças dos lagostins são desperdiçadas e todos os anos aproximadamente 100 toneladas são processadas e eliminadas (Peng et al., 2016).



Figura 4 - *Procambarus clarkii*
Fonte: Autoria própria (2021)

A produção de alimentos tem capacidade de gerar uma grande quantidade de subprodutos dos quais muitas vezes não são aproveitados, porém, esses produtos secundários podem conter substâncias com alto valor industrial, mas quando descartados de forma incorreta, podem ocasionar impactos negativos ao meio ambiente, como por exemplo, o processamento industrial de crustáceos visando o consumo humano, produz uma grande porção de resíduos representando cerca de 50% do peso total (Islam et al., 2004). Além disso, os produtos secundários gerados pelas indústrias são muitas vezes descartados, como cabeças, caudas, escamas e conchas, embora esses resíduos podem conter várias fontes importantes como, proteínas, lípidos, pigmentos e quitina (Hamed et al., 2016).

Neste contexto, o processamento de crustáceos podem ser vistos como uma fonte de lípidos, proteínas entre outros compostos (Hamed et al., 2016), já que os principais componentes do exoesqueleto são proteínas, minerais como o carbonato de cálcio e a quitina (Ferrer et al., 1996). A utilização de compostos provenientes do exoesqueleto do lagostim tem atraído a atenção dos investigadores, já que a sua extração é vista como uma abordagem viável e ecológica (Benhabiles et al., 2012; Limam et al., 2011). Entre eles, cabe destacar a quitina, o principal componente da casca do *P. clarkii*, é um polímero orgânico, quimicamente estável e insolúvel, com capacidade de ser transformada em quitosano após desacetilação (Chen et al., 2020), podendo ser utilizado para produção de filmes comestíveis prolongando a vida útil dos alimentos.

1.3 Quitina

A quitina, apresentada na Figura 5, é considerada um biopolímero estrutural essencial no reino animal e fungi (Loron et al., 2019). É um polissacarídeo natural, sintetizado por vários microrganismos vivos, podendo também ser encontrada em insetos, paredes celulares de fungos e no exoesqueleto de crustáceos marinhos como caranguejos, camarões e lagostins (Rinaudo, 2006). No grupo das fontes quitinosas, a quitina pode estar relacionada a outras moléculas como minerais, proteínas e lípidos, por abranger ligações químicas fortes. A quitina, apresenta três polimorfos distintos, a α -, β - e γ -quitina, sendo a α -quitina, aquela associada com proteínas, constituindo umas das estruturas mais rígidas e frequentemente encontrada em crustáceos. A β -quitina pode ser encontrada nas lulas e a γ -quitina existe em fungos e leveduras sendo caracterizada por a combinação da α e β -quitina (Abdou et al., 2008).



Figura 5 - Quitina
Fonte: Autoria própria (2021)

As polimorfos da quitina correspondem a diferentes arranjos das cadeias poliméricas, Figura 6, assim o estabelecimento de ligações de hidrogênio intra e intermoleculares condicionam que os arranjos sejam mais ou menos compactos (Zhang et al., 2005). A α -, β - e γ -quitina podem ser identificadas pela posição dos grupos acetil na sua estrutura molecular. A α -quitina é constituída por polímeros contendo grupos acetil em lados opostos, favorecendo o estabelecimento de ligações de hidrogênio intra e intermoleculares, justificando a sua menor capacidade de absorver água. A β -quitina possui um grupo acetil alternado a cada dois monómeros, dificultando as ligações de hidrogênio intermoleculares e como consequência disso, torna-se mais solúvel em solventes orgânicos e mais susceptível à absorção de água. No caso da γ -quitina ocorre a combinação dos dois arranjos, α e β , dando origem a sistemas intermediários (Rufato et al., 2018; Vermeersch, 2014).

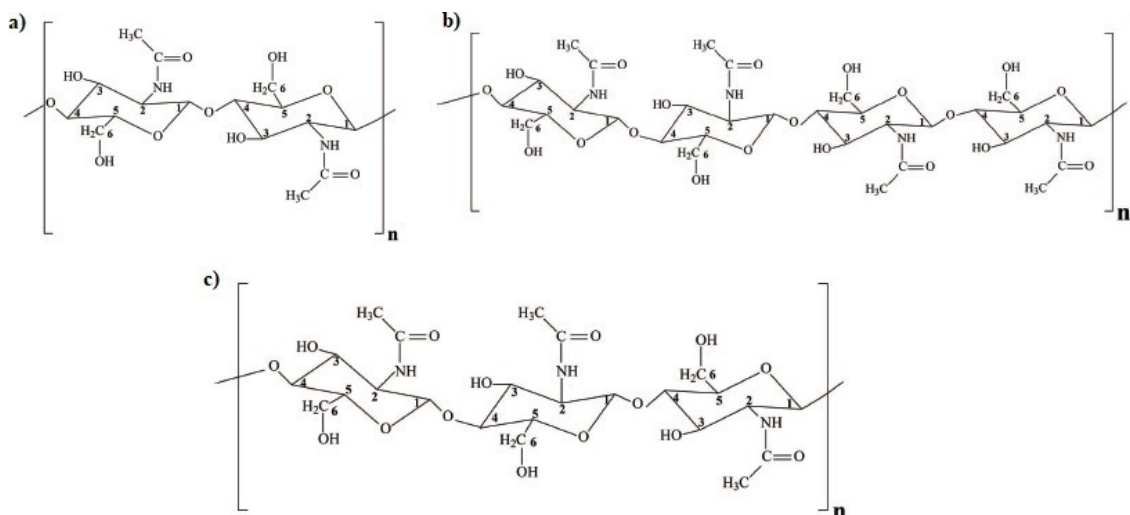


Figura 6 - Estruturas moleculares a) α -quitina; b) β -quitina e c) γ -quitina
 Fonte: (Rufato et al., 2018)

Entre as propriedades funcionais da quitina é importante assinalar, a biodegradabilidade, biocompatibilidade e a não toxicidade, tornando a aplicação tanto da quitina como do seus derivados viável em distintos campos incluindo, o medicinal, cosmético, agrícola e indústria alimentar (Bellaaj et al., 2013; Nessa et al., 2010).

Além das propriedades funcionais, entre as suas características, a quitina é insolúvel em solventes orgânicos e inorgânicos (Birolli et al., 2016), e tem a capacidade de tornar-se mais solúvel em água acidificada após a sua desacetilação, onde obtém-se o quitosano (Ahmad et al., 2020; Moura et al., 2011), o seu principal derivado. Ambos os produtos apresentam propriedades que incluem a não toxicidade, adsorção de íons metálicos, atividades biológicas e capacidade de formação de filmes (Kurita, 2006). A quitina e os seus derivados apresentam diversas propriedades, entre as quais destacam a sua capacidade anticoagulante, anti-inflamatória, antitumoral, anticancerígena, antioxidante e antimicrobiana (Ngo & Kim, 2014; Vo et al., 2015). Por isso, apresentam um grande potencial na área alimentar satisfazendo diversas necessidades que abrange, a conservação de alimentos mediante a atividade antimicrobiana, clarificação e purificação de águas, eliminação da acidez de sumos e formação de filmes biodegradáveis (Abd & Niamah, 2012; Kittur et al., 1998; Luo & Wang, 2013).

Contudo, nesta área, nos últimos tempos, verificou-se um aumento dos estudos relacionados com o desenvolvimento de materiais com capacidade de formação de filmes e que apresentem outros atributos como atividade antimicrobiana para prolongar a vida de prateleira e melhorar a segurança alimentar (Tripathi et al., 2009). As embalagens antimicrobianas caracterizam-se por serem uma das formas mais promissoras contra os

microrganismos, já que supõem um obstáculo adicional para a degradação dos alimentos, evitando assim o desenvolvimento de microrganismos patogênicos ou deteriorantes (Tripathi et al., 2009; Xu et al., 2019).

Em particular, os filmes derivados do quitosano destacam-se por apresentarem um elevado potencial para serem usados como embalagens de revestimento não só devido à sua atividade antimicrobiana, mas também por ser um material com baixa permeabilidade de oxigênio (No et al., 2007).

1.4 Quitosano

O quitosano conforme Figura 7, é considerado um dos polissacarídeos mais abundantes, que geralmente se produz a partir do processo de desacetilação da quitina, tal como é apresentado na Figura 8. O grau de desacetilação tem influência nas propriedades do polímero obtido, como a solubilidade em meio ácido ou a sua capacidade de absorção de água, mantendo as características semelhantes à quitina já citada como a não toxicidade, biodegradabilidade e propriedades antimicrobianas, o que eleva as suas potencialidades na particular aplicação focada em embalagens alimentares (Leceta et al., 2015).



Figura 7 - Quitosano
Fonte: Autoria própria (2021)

Respeito a sua estrutura química o quitosano é um copolímero constituído por unidades de D-glucosamina e N-acetilglucosamina, que se torna solúvel em soluções ácidas (Weißpflog et al., 2021).

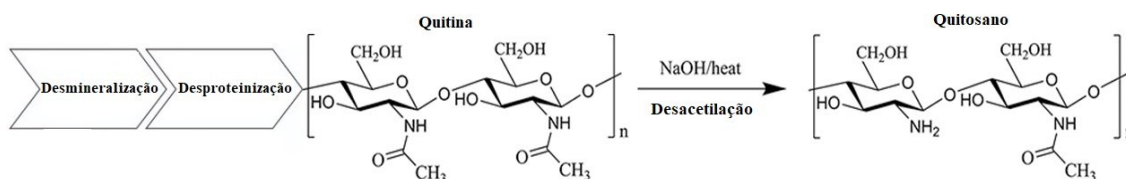


Figura 8 - Esquema de obtenção do quitosano
Fonte: Adaptado de (Rodrigues, 2016)

Além disso, a sua versatilidade oferece a possibilidade de preparar diversos materiais, incluindo, desde a preparação de hidrogéis, ou seja, estruturas com capacidade de absorver grandes quantidades de água e fluidos biológicos, até a produção de filmes semipermeáveis para embalagens alimentares, capazes de modificar a atmosfera do interior do produto reduzindo a transpiração e diminuindo a senescência dos frutos (Rinaudo, 2006). De fato, os revestimentos de quitosano caracterizam-se por apresentar alta resistência e flexibilidade, além de serem comestíveis e ter uma longa vida útil (Tharanathan & Kittur, 2003).

Nas embalagens alimentares, quando se compara o quitosano com outros materiais de base biológica, tem o benefício de incorporar algumas substâncias funcionais como, minerais ou vitaminas, potenciando a sua atividade antimicrobiana (Jeon et al., 2002; Relier & Ardon, 2004). As propriedades do quitosano podem ser influenciadas por diferentes fatores como o peso molecular, o grau de polimerização e de desacetilação (Hassan et al., 2018). Por exemplo, o quitosano com baixo peso molecular pode penetrar no citosol e conseqüentemente, dificultar a síntese de proteínas e causar interferência no DNA e RNA, ocasionando a morte das células microbianas. Em contrapartida, o quitosano de alto peso molecular, gera uma camada impermeável na superfície celular, impossibilitando que a mesma absorva nutrientes promovendo a sua inibição (Hosseinnejad & Jafari, 2016; Kumar et al., 2020).

No âmbito alimentar, o quitosano é geralmente reconhecido como seguro (GRAS), pela Food and Drug Administration (FDA) (FDA, 2005), sendo que a sua aplicação está relacionada com as suas características físico-químicas e as suas propriedades antimicrobianas inerentes. O grau de desacetilação da quitina vai determinar o grau de solubilidade do quitosano, sendo maior quando aumentar a quantidade de grupos amina na sua estrutura (Casariego et al., 2008). De fato, estes grupos vão promover a sua capacidade funcional como agente antimicrobiano, além de se considerar a concentração e o origem do polímero (Gardesh et al., 2016; Gol et al., 2013; Hosseinnejad & Jafari, 2016; Xing et al., 2011). Esta versatilidade permite ao quitosano atuar como aditivo alimentar, estabilizador ou agente antimicrobiano (H. Wang et al., 2020), além de apresentar um potencial para o desenvolvimento de nanoemulsões, revestimentos e filmes comestíveis (Duan et al., 2011; Zahid et al., 2012).

Particularmente a utilização de quitosano em revestimentos e filmes comestíveis, tem sido amplamente aplicada devido às propriedades de inibição de variados fungos e bactérias patogênicas (Romanazzi et al., 2002). Em alguns fungos, o quitosano pode

provocar alterações nas membranas, devido à interação com a superfície microbiana eletronegativa, fazendo com que ocorram modificações na permeabilidade, distúrbios metabólicos e ocasionando a morte dos fungos (Fang et al., 1994). Além disso, a sua utilização como filmes, resulta em um crescimento das características sensoriais e contribui para intensificar a aparência dos alimentos, tornando-os atraentes e mais saudáveis para o consumidor (Abdallah et al., 2017). A sua aplicação proporciona um acréscimo na vida de prateleira de diversas frutas e vegetais como manga, morango, amora, mamão e tomate respectivamente, visto que essa camada de proteção auxilia na prevenção da deterioração oxidativa, da contaminação por microrganismos e exibe atividade antioxidante que, por sua vez, elimina os radicais livres e quebra os íons metálicos (Anraku et al., 2018; Nair et al., 2020).

As várias propriedades do quitosano, entre as quais, evitar a perda de umidade e aroma, a sua flexibilidade e capacidade de bloquear a passagem de oxigênio, são fatores que contribuem para tornar adequado o desenvolvimento de filmes para aplicação em produtos frescos (Chaudhary et al., 2020). Porém, devido à sua baixa solubilidade em água e à sua estrutura rígida, a utilização direta do quitosano torna-se limitada, tendo de se adicionar componentes, como agentes de reticulação ou plastificantes, numa tentativa de melhoria e alteração das características físicas e funcionais do filme (Chaudhary et al., 2020).

O mecanismo dos filmes possuem duas forças as coesivas e adesivas, que são forças intermoleculares entre as moléculas de polímero e entre o polímero e o substrato, respectivamente (Sothornvit & Krochta, 2005). Devido às forças coesivas do quitosano, os biofilmes são constituídos por uma estrutura dura, rígida e quebradiça, assim a adição de plastificantes é requerida para impedir essas deficiências, conferindo flexibilidade, e reduzindo a coesão e fragilidade, aumentando a resistência dos filmes (Han, 2013; Sothornvit & Krochta, 2005; Vieira et al., 2011). O funcionamento dos filmes de quitosano com adição de plastificantes como o glicerol, exibem propriedades mecânicas satisfatórias (Núñez, 2014), além das propriedades físico-químicas destes filmes demonstrarem uma estrutura mais hidrofílica dos sistemas (Cerqueira et al., 2012).

1.5 Filmes comestíveis

A deterioração dos alimentos, sujeitos a contaminação microbiana, pode resultar em perdas significativas de até 25% antes mesmo dos alimentos serem consumidos (Carballo et al., 2012; Huang et al., 2012). A deterioração está relacionada com o

crescimento de patógenos que alteram a textura, cor e valor nutritivo, impossibilitando o consumo dos produtos (Malhotra et al., 2015). Uma vasta variedade de bactérias, leveduras e fungos podem ser responsáveis por deteriorar os alimentos, já que, em determinadas condições de pH, temperatura e a atividade da água dos produtos, o desenvolvimento deles é promovido (Carballo et al., 2012). Assim, tendo em mente a qualidade e segurança alimentar, embalagens de alimentos com maior viabilidade e prevenção da contaminação, estão a ganhar espaço no mercado (Sofi et al., 2018). A viabilidade do uso de filmes comestíveis está relacionada com o seu potencial na conservação de alimentos, no aumento da vida de prateleira e na atuação como barreira com fim de impedir que agentes indesejáveis prejudiquem a integridade do produto (Galus & Kadzińska, 2016). Neste contexto, há que considerar que o uso de produtos naturais com o objetivo de melhorar a qualidade do produto, minimizando a utilização de conservantes, vem sendo exigida pelos consumidores (Sathivel et al., 2007) além da diminuição do impacto ambiental observada pela utilização destes produtos. Por tudo isso, os estudos relacionados com a produção de revestimentos e filmes comestíveis em que sua composição possua biopolímeros naturais, tem adquirido espaço no desenvolvimento de novos sistemas amigos do meio ambiente (Thakur et al., 2016).

A procura por métodos sustentáveis e económicos vem sendo priorizados pelos consumidores no momento do consumo e pelas indústrias durante o processo de desenvolvimento de novos produtos. Desta forma, a utilização de filmes e revestimentos baseados em polímeros naturais entre os quais destacam polissacarídeos e proteínas tem ganho relevância nesta área (Atarés & Chiralt, 2016; Khalil et al., 2017). Tendo como objetivo a redução de plásticos que são usados para proteger os alimentos, os biopolímeros provenientes de fontes renováveis, estão sendo utilizados pelas indústrias devido a sua potencialidade de aplicação além de contribuir na sustentabilidade dos produtos (Dilarri et al., 2016). A elaboração de filmes constituídos de biopolímeros oferecem a possibilidade de ser adicionados com uma diversidade de aditivos funcionais como antioxidantes, antimicrobianos e agentes antifúngicos, assim, atuando como melhoradores da qualidade dos alimentos e prolongando a sua vida (Aloui & Khwaldia, 2016; Miteluţ et al., 2015). Assim, do mesmo modo, os filmes também podem sofrer melhorias através de meios físicos, químicos ou métodos enzimáticos, podendo aumentar algumas das características dos polissacarídeos e proteínas, como a permeabilidade de vapor de água (Zhang et al., 2019).

Os filmes, são caracterizados por proporcionar uma capa protetora aos alimentos, podendo ser representados como embalagens primárias, ou seja, em contato direto com o alimento (Hassan et al., 2018). Este tipo de embalagem é uma forma eficiente de preservar principalmente os vegetais e frutas frescas, que possuem uma vida útil baixa igualmente para produtos minimamente processados, ao mesmo tempo que previne a redução de possíveis degradações durante o armazenamento (Fakhouri et al., 2015).

Como já se mencionou anteriormente, os filmes provenientes de biopolímeros, demonstraram ser eficientes para a elaboração de embalagens funcionais, podendo ser adicionados de aditivos (nutrientes, agentes antioxidantes e antimicrobianos) com o fim de potenciar a qualidade dos alimentos e agregar vida útil ao produto (Chawla et al., 2021). Neste contexto, no caso específico dos filmes do quitosano (MLalila et al., 2018; Zhang et al., 2020) com propriedades antimicrobianas e antioxidantes (Broek et al., 2015; Guo et al., 2015) é importante destacar a possibilidade de incorporar compostos como a própolis a fim de proporcionar propriedades funcionais aos filmes. A própolis é uma fonte importante de polifenóis e diversas atividades biológicas, apresentando potencial para ser aplicada como agente ativo nestes filmes comestíveis (Siripatrawan & Vitchayakitti, 2016).

É sabido que os biofilmes de quitosano que são incorporados com própolis como composto bioativo, resultaram no melhoramento da segurança de brócolos minimamente processados, onde mostraram um efeito inibitório sobre as bactérias *E. coli* e *L. monocytogenes* (Alvarez et al., 2013). Também há estudos que demonstraram o melhoramento das propriedades dos filmes de quitosano com adição de própolis, em termos de propriedades mecânicas e nas barreiras do filme, diminuindo a permeabilidade de vapor da água e inibição de bactérias como *S. aureus* e *Salmonella* (Siripatrawan & Vitchayakitti, 2016). O efeito de inibição de microrganismos também foi observado em outros alimentos como morangos (Pacheco et al., 2019), ou carne de frango, (Mehdizadeh & Mojaddar, 2019) estendendo a vida útil do produto.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Com a realização deste trabalho pretendeu-se o desenvolvimento e caracterização de filmes comestíveis de quitosano, isolado do lagostim-vermelho, com incorporação de extratos de própolis, para aplicação na conservação de alimentos.

2.2 Objetivos específicos

- Isolamento e purificação da quitina;

O procedimento de isolamento e purificação da quitina, realizou-se a partir do lagostim-vermelho recolhido no Nordeste de Portugal.

- Desacetilação da quitina para a obtenção do quitosano e sua caracterização;

O quitosano obtido, foi caracterizado por espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR), análise termogravimétrica (TGA).

- Extração e caracterização dos compostos fenólicos da própolis;

Uma amostra de própolis, com origem no Nordeste Transmontano, obtida através de apicultores locais, foi extraída e os seus compostos fenólicos foram caracterizados por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa (LC-MS).

- Produção e caracterização físico-química dos filmes de quitosano;

A fim de produzir filmes de quitosano contendo própolis, o extrato fenólico foi adicionado ao quitosano (dissolvido num solvente) em diferentes proporções. Os filmes comestíveis foram caracterizados por FTIR, microscopia eletrónica de varredura (SEM), TGA, transmitância ótica. Além disso, a solubilidade em água, e cor também foram avaliadas.

- Avaliação da atividade antimicrobiana;

Foram realizados testes para os filmes comestíveis desenvolvidos pela técnica de difusão em placas. Os testes foram realizados contra os contaminantes mais significativos em alimentos, usando amora como modelo. Além disso, realizou-se testes para microrganismos considerados como controlo para segurança alimentar, bolores e levedura, e uma vez que a amora passa por manipulação efetuou-se teste para *S. aureus*.

- Aplicação do filme ativo comestível em alimentos.

Os filmes comestíveis desenvolvidos foram incorporados em amoras e as cargas microbianas foram avaliadas em diferentes momentos do prazo de validade.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Amostragem

Os lagostins utilizados nesse estudo, de espécie conhecida como *Procambarus clarkii*, foram capturados no rio de Bragança, Portugal em julho de 2020, mantendo os mesmos congelados até a sua utilização. A própolis de origem europeia, adquiriu-se de um apicultor da região de Bragança, Portugal, sendo assim considerado como própolis comercial.

3.2 Isolamento da quitina

Para o isolamento da quitina, inicialmente as cascas dos lagostins foram secas em estufa e trituradas com um processador. Em seguida 20 g de amostra foram submetidas a uma desmineralização, ou seja, refluxadas em HCl 2M por 9 h a 100°C, para remoção dos minerais. De seguida, as amostras foram filtradas e lavadas extensivamente com água destilada até obtenção do pH neutro. Após a desmineralização, as amostras foram submetidas a uma desproteínização, a refluxo em solução de NaOH 2M por 18 h a 100°C, com a finalidade de retirar a maioria das proteínas. Posteriormente as amostras foram novamente lavadas com água destilada até alcançar pH neutro. Por fim, realizou-se a remoção dos pigmentos de cor remanescentes, nomeadamente descoloração com uma solução de água, metanol e clorofórmio na proporção de 4:2:1, respectivamente, seguido de uma filtração e repetidas lavagens para remover quaisquer resíduos químicos. Finalmente, as amostras de quitina foram secas em estufa a 50°C por 48 h (Kaya et al., 2016).

3.3 Produção de quitosano

A produção do quitosano foi levada a cabo mediante o processo de desacetilação da quitina desidratada baseado no método (Duman & Kaya, 2016). A quitina foi submetida a refluxo com NaOH 60% por 4 h a 100°C, e posterior lavagem. Por fim, o quitosano húmido foi seco em estufa a 40 °C por 72 h.

3.4 Extração etanólica da própolis

O extrato etanólico da própolis foi obtido a partir de 2 g de própolis, à qual se adicionou 20 mL de etanol (80:20, v/v), e em seguida foi colocado em banho-maria por

1 h a 70°C (agitação 60 rpm). A mistura resultante foi filtrada a vácuo e o resíduo foi re-extraído nas mesmas condições. Após a segunda extração, as amostras foram filtradas a vácuo novamente e posteriormente o etanol foi removido com o evaporador rotativo a vácuo por 10 min a 40°C. Finalmente as amostras foram congeladas, liofilizadas e armazenadas para posterior utilização. O procedimento foi realizado em duplicado.

3.5 Preparação e produção dos filmes de quitosano

Os filmes de quitosano foram preparados com diferentes teores de extrato de própolis, 0%, 5%, 10% e 20%, sendo essas percentagens determinadas a partir da quantidade de quitosano utilizado nos filmes. A solução de quitosano foi preparada, para cada concentração de própolis, dissolvendo 400 mg em 20 mL de solução de ácido acético (1% v/v), e submetido a agitação magnética por 24 h a 600 rpm. Posteriormente, preparou-se as soluções de própolis em 5 mL de etanol (80% v/v) adicionando, 0, 10, 20 e 40 mg de própolis e agitando-os por 20 min para obter as formulações contendo 0, 5, 10 e 20% de própolis, respectivamente.

Para cada solução de quitosano (previamente filtrada para reter possíveis resíduos) foi adicionado 100 µL de glicerol e 1 mL das respectivas soluções de própolis, assim as misturas foram agitadas por 30 min a 20000 rpm em um homogeneizador. Cada solução foi moldada em uma placa de Petri, onde foram mantidas a 30°C por 4 dias (Koc et al., 2020).

3.6 Caracterização dos compostos fenólicos da própolis

3.6.1 Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa (LC-MS)

Para a caracterização dos extratos fenólicos, foram dissolvidas 20 mg de própolis em EtOH / H₂O (80:20, v / v, 2 mL), de seguida filtrados com um filtro de nylon de 0,45 mm e mantidos a -20°C até a análise.

As análises de UPLC/DAD/ESI-MSⁿ foram realizadas num equipamento Dionex UPLC final 3000 (Thermo Scientific, EUA) equipado com um detetor de fotodíodos, acoplado a um detetor de massas. O sistema cromatográfico consistiu em uma bomba quaternária, um amostrador automático mantido a 5°C, um degaseificador, um detetor de fotodíodos e um compartimento de coluna termostática automática.

A separação cromatográfica foi efetuada com uma coluna Macherey-Nagel Nucleosil C18 (250 mm × 4 mm id; diâmetro de partículas de 5 mm), mantida a uma temperatura constante de 30°C. A fase móvel foi composta por (A) 0,1% (v/v) de ácido

fórmico em água e (B) 0,1% (v/v) de ácido fórmico em acetonitrilo, previamente degaseificados e filtrados usando um filtro de membrana nylon com porosidade 0,22 µm. Para a corrida utilizou-se um gradiente linear, com um caudal de 1 mL.min⁻¹, tendo seguido o seguinte programa: condições iniciais de 20% de (B), atingindo os 30% de (B) aos 10 min; 10-40 min 30-40% (B); 40-60 min 40-60% (B); 60-80 min 60-90% (B); regresso as condições iniciais aos 90 min e 20% (B) durante 10 min. O volume de injeção foi de 10 µl. Os dados espectrais de todos os picos foram detetados na gama de 190-600 nm. A análise de massas foi realizada num espectrómetro de massa LTQ XL (Thermo Scientific, CA, EUA), em modo negativo, equipado com uma fonte de ionização por electro-spray ESI: tensão do spray, 5 kV; voltagem do capilar, -20V; tensão do tubo capilar, -65V; temperatura do capilar, 325°C; fluxo de gás e gás auxiliar (N₂), 50 e 10 (unidades arbitrárias), respetivamente. Os espectros de massa foram adquiridos no intervalo de massa de 100-1000 m/z. A energia de colisão utilizada nas experiências de MSⁿ foi de 35 (unidades arbitrárias). A aquisição de dados foi realizada através do software Xcalibur ® (Thermo Scientific, CA, E.U.A.).

A elucidação dos compostos fenólicos foi realizada comparando o seu comportamento cromatográfico, espectros de UV e informações de MS, aos dos compostos de referência. Quando os padrões não estavam disponíveis, a informação estrutural foi confirmada com dados de UV combinados com padrões de fragmentação de MS relatados anteriormente na literatura. A quantificação foi alcançada usando curvas de calibração para o ácido cafeico (0,0187-0,4 mg/mL; $y = 6 \times 10^7 x - 26360$; $R^2 = 0,996$), ácido *p*-cumárico (0,0187-0,4 mg/mL; $y = 9 \times 10^6 x - 35105$; $R^2 = 0,999$), campferol (0,075-1,6 mg/mL; $y = 1 \times 10^6 x - 5866,6$; $R^2 = 0,997$), pinocembrina (0,0375-0,8 mg / mL; $y = 2 \times 10^6 x + 5249,8$; $R^2 = 0,997$), crisina (0,0375-0,8 mg / mL; $y = 4 \times 10^6 x - 18959$; $R^2 = 0,999$) Quando o padrão não estava disponível, os compostos foram quantificados pela curva de calibração do padrão estruturalmente mais próximo, e o resultado final foi expresso em termos equivalentes, expresso em mg / g de amostra.

3.7 Caracterização do quitosano e filmes

3.7.1 Espessura dos filmes

A espessura dos filmes foi determinada com um paquímetro Facom 806B.25. As medidas foram realizadas em seis pontos distintos para obter homogeneidade na média dos dados (Koc et al., 2020).

3.7.2 Medição de cor

A medição da cor dos filmes foi realizada usando um colorímetro Minolta (Minolta CR-740, Konica Minolta Sensing, Osaka, Japão). A medição, feita em três pontos de cada filme, foi baseada no modelo CIELAB onde foram determinados os parâmetros L^* ($L = 0$ preto e $L = 100$ branco), a^* ($-a =$ verde e $+a =$ vermelho), b^* ($-b =$ azulado e $+b =$ amarelo).

3.7.3 Transmitância óptica

A transmitância óptica dos filmes foi medida por espectrofotometria UV-Visível (UV-Vis) usando espectrofotômetro JASCO V-730. Os filmes foram medidos a temperatura ambiente na faixa de 400 a 700 nm (Koc et al., 2020).

3.7.4 Microscopia eletrônica de varredura (SEM)

A morfologia dos filmes foi analisada por SEM utilizando um microscópio Phenon Pro (Eindhoven, Países Baixos). Os filmes foram colocados sob folhas de carbono e analisados em uma tensão de aceleração por volta de 15 kV auxiliado por um controlador de temperatura (TCSH) para ajustar a mesma durante a aquisição das imagens, com o intuito de minimizar o efeito do feixe de elétrons de danos do vácuo. As imagens foram adquiridas em ampliações de 350x.

3.7.5 Solubilidade dos filmes em água

A solubilidade em água foi determinada nos filmes previamente cortados em amostras de 2 x 2 cm² e anotados seus respectivos pesos. As amostras foram colocadas em estufa a 60°C até obtenção do peso constante. Posteriormente, cada filme foi colocado em placas de petri contendo 20 mL de água destilada durante 24 h. Em seguida removeu-se a água e os filmes foram colocados na estufa durante 24 horas a 60°C. Finalmente os filmes secos foram pesados novamente e a perda de peso foi calculada com a equação 1 (Koc et al., 2020).

$$P_p = \frac{P_i - P_f}{P_i} \times 100 \quad (1)$$

Sendo, P_p = perda de peso, P_i = peso inicial e P_f = peso final.

3.7.6 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

A caracterização dos grupos funcionais e interações das matérias-primas incluindo o quitosano e própolis, além dos filmes, foi realizado mediante análise de FTIR utilizando um FTIR ABB Inc., modelo MB3000 (Quebec, Canadá), equipado com um acessório de refletância total atenuada por diamante (ATR). Os espectros foram registrados na faixa entre 4000 e 600 cm^{-1} com uma aquisição média de 32 varreduras e resolução de 16 cm^{-1} . Os espectros foram tratados usando o software Horizon MB v.3.4.

3.7.7 Análise termogravimétrica (TGA)

A estabilidade térmica das amostras foi determinada por TGA utilizando um equipamento Netzsch modelo TG209F3 Tarsus (Selb, Alemanha). Entre 5-10 mg da amostra foram colocados em cadinhos de alumina e aquecidos de 25 a 700°C a uma taxa de aquecimento de 10°C/min sob fluxo de N_2 30 mL/min. Os termogramas foram adquiridos e tratados usando o software de análise térmica Netzsch Proteus, v.5.2.1.

3.7.8 Propriedades mecânicas

As propriedades mecânicas dos filmes foram analisadas por meio de testes mecânicos de tração utilizando um equipamento Shimadzu Autograph A65-X, equipado com uma célula de carga de 10 kN e apertos pneumáticos para fixar as amostras. Para cada amostra, 5 repetições com dimensões de 20 mm x 30 mm foram medidos a uma velocidade de extensão de 5 mm/min.

3.7.9 Atividade antioxidante

A atividade antioxidante dos filmes foi avaliada usando dois métodos, o DPPH e o ABTS. No ensaio DPPH (2,2 difenil-1-picrilhidrazil), para cada filme foram cortados cerca de 10 mg de amostra e dissolvidas em 1 mL de solução de DPPH a $6,5 \times 10^{-5}$ M. As amostras foram incubadas no escuro até a mudança de coloração do roxo para o amarelo. Posteriormente a absorbância foi medida a 517 nm em um espectrofotômetro modelo 6705 UV-Vis marca Jenway (Stone, Staffordshire, UK). No ensaio ABTS (3-etilbenzotiazolína-6-sulfonato), uma solução de ABTS 7 mM foi preparada com persulfato de potássio 2,45 mM e permaneceu por 12 a 16 hrs no escuro a temperatura ambiente. A solução ABTS, foi diluída com etanol para obter uma absorbância de $0,70 \pm$

0,02 a 751 nm no UV-Vis. Cerca de 10 mg dos filmes foi misturada com 3,7 mL da solução ABTS por 10 min no escuro. A absorvância da mistura foi medida a 751 nm no UV-Vis. As medições foram repetidas em triplicatas e os resultados foram apresentados como média \pm desvio padrão (Koc et al., 2020). A atividade antioxidante (I%) para os dois ensaios DPPH e ABTS, foi calculada usando a seguinte equação 2:

$$(I\%) = \frac{A_c - A_a}{A_c} \times 100 \quad (2)$$

Sendo A_c e A_a as absorvâncias das soluções controlo e amostra analisada respectivamente, tanto para os ensaios DPPH e ABTS.

3.7.10 Análise microbiológica

3.7.10.1 Avaliação *in vitro* da atividade antimicrobiana dos filmes

3.7.10.1.1 Microrganismos utilizados

Para avaliar a atividade dos filmes de quitosano com adição de própolis foram utilizados vários microrganismos. Na Tabela 1, estão listadas as estirpes isoladas de amoras, e fornecidas pela coleção de culturas do Centro de Investigação de Montanha (CC-CIMO). Estes microrganismos são comuns em amoras e outros frutos semelhantes, e são frequentemente apontados como responsáveis por podridões e deteriorações pós-colheita dos frutos armazenados. Além dos microrganismos citados, foram também utilizadas bactérias de referência (não isoladas de amoras) que são apontadas como fator de segurança alimentar, sendo elas *Bacillus cereus* e *Escherichia coli*, uma vez que, a amora é uma fruta sujeita a manipulação humana em seu processamento, utilizou-se também *Staphylococcus aureus*, um microrganismo comum de se encontrar em alimentos que passam por manuseamento. Estas bactérias foram fornecidas pelo CIMO.

Para utilização nos estudos subsequentes, as bactérias foram inoculadas em *Plate Count Agar* (PCA, BioLife, Itália) e incubadas durante 24 h a 37 °C. A levedura e os bolores foram inoculados em *Potato Dextrose Agar* (PDA, Liofilchem, Itália) a 28 °C por 3 dias e a 25°C por 5 dias, respetivamente.

Tabela 1 - Lista de microrganismos usados no presente estudo

Código de trabalho	Código coleção CIMO	Identificação	Número de acesso GenBank	Sequência (região DNA)
Bactérias				
B2	CIMO 21MS001	<i>Staphylococcus hominis</i>	OK235434	16S
B7	CIMO 21MS004	<i>Pantoea</i> sp.	OK235437	16S
B8	CIMO 21MS005	<i>Arthrobacter</i> sp.	OK235438	16S
B10	CIMO 21MS006	<i>Erwinia</i> sp.	OK235439	16S
Levedura				
L1	CIMO 21MS010	<i>Metchnikowia rancensis</i>	OK274319	26S
Bolores				
F3	CIMO 21MS014	<i>Cladosporium</i> sp.	OK274323	ITS
F4	CIMO 21MS015	<i>Penicillium brevicompactum</i>	OK274324	ITS
F15	CIMO 21MS019	<i>Botrytis cinerea</i>	OK274328	ITS
F17	CIMO 21MS020	<i>Alternaria</i> sp.	OK274329	ITS

3.7.10.1.2 Preparação das suspensões celulares

Para as bactérias e leveduras, as suspensões celulares foram preparadas pelo método de densidade óptica com comprimento de onda de 540 nm. Misturou-se uma porção de células em uma solução de NaCl 0,9% com tween 80 0,1%, e realizou-se a leitura de densidade óptica em um densitômetro (modelo McFarland DEN-1B). Quando necessário, foi efetuada diluição das suspensões celulares até alcançar uma concentração de 10^8 células/mL e 10^6 células/mL, para as bactérias e leveduras respectivamente. Para os bolores, foi utilizada uma suspensão de esporos de concentração 10^6 esporos/mL, obtida através da contagem de esporos em câmara de Neubauer.

3.7.10.1.3 Ensaio *in vitro*

A análise da atividade antimicrobiana *in vitro* dos filmes, foi efetuada através da utilização de duas técnicas. O primeiro procedimento foi realizado pelo mecanismo de difusão em disco de ágar, onde as placas de ágar são inoculadas com o inóculo padronizado dos microrganismos teste. Posteriormente à inoculação, discos de papel filtro (Prat Dumas France) com diâmetro de 9 mm, foram colocados sobre as placas e 50 µL de cada filme foram dispostos sobre os discos. O segundo procedimento, foi realizado pelo método de difusão em gota de ágar, onde foram inoculadas as placas de ágar com o inóculo dos microrganismos e posteriormente 50 µL dos filmes foram depositados diretamente no ágar. Estes métodos proporcionam a visualização da capacidade de inibição de crescimento através da formação de um halo de inibição em volta do filme

(Balouiri et al., 2016; Gomes et al., 2021). Os ensaios foram efetuados em placas de plástico de 12 x 12 cm, contendo os meios de cultura indicados na Tabela 2, dependendo do tipo de microrganismos.

Neste ensaio foram avaliados os filmes contendo 0%, 5%, 10% e 20% de própolis, sendo que, para o controlo positivo utilizou-se antifúngico Bayer Teldor com uma concentração de 1,5mg/100mL, para as bactérias, bolores e levedura. Como controlo negativo foi aplicado uma solução de glicerol, etanol e ácido acético (solução base dos filmes). As placas foram incubadas nas condições descritas na Tabela 2. Todos os testes foram realizados em triplicada.

Tabela 2 - Condições de cultura e incubação dos microrganismos teste no ensaio in vitro de atividade antimicrobiana.

Microrganismos	Meios de cultura	Suspensão celular (cél/mL)	Temperatura de incubação (°C)	Tempo de incubação (dia)
Bactérias	MHA	10 ⁸	37	1
Bolores	MHA	10 ⁶	25	5
Levedura	MHA + 2% glucose	10 ⁶	28	3

3.7.10.2. Avaliação da atividade antimicrobiana dos filmes em amoras

A atividade antimicrobiana dos filmes de própolis foi estudada em amoras, com o objetivo de avaliar a capacidade dos filmes inibirem o desenvolvimento microbiano em frutos durante o armazenamento, e assim prologar o seu tempo de vida útil. As amoras foram escolhidas como modelo, por se tratar de um tipo de fruto muito perecível, em resultado do desenvolvimento de podridões. Para o presente estudo foram utilizadas amoras silvestres comerciais (*Rubus* sp.), produzidas em Portugal, que foram adquiridas no comércio local (Bragança, Portugal). Antes da aplicação dos tratamentos, as amoras foram lavadas em água estéril e secas em papel absorvente, dentro da câmara de fluxo laminar.

Foram estabelecidos quatro tratamentos para serem avaliados, sendo eles: amoras lavadas em água (controlo negativo), antifúngico comercial utilizado na produção de amoras marca Bayer Teldor com uma concentração de 1,5mg/100mL, filme 0% e filme 10%. As amoras foram submersas nas diferentes soluções durante 1 minuto, e foram

posteriormente deixadas a secar durante 5 minutos. As amoras submetidas aos tratamentos foram conservadas a 4 °C, e foram recolhidas e analisadas amostras nos tempos 0, 5, 10 e 15 dias de conservação. Para cada tratamento e tempo de amostragem foram utilizadas quatro amoras, correspondendo a aproximadamente 25g.

A preparação das amostras para análise microbiológica foi efetuada segundo a ISO 6887-1:2017 (ISO 2017). As amoras submetidas a cada tratamento foram cortadas em pequenos pedaços e homogeneizadas, e 10g foram pesadas e adicionadas a 90 mL de água peptonada (AP, Liofilchem, Itália). A mistura foi homogeneizada num stomacher (MixWel Alliance Bio Expertise) e a partir dela foram efetuadas diluições decimais até 10^{-5} , através da adição de 1 mL da diluição anterior a 9 mL de água peptonada.

Os parâmetros microbiológicos analisados foram: microrganismos mesófilos aeróbios, bolores e leveduras. A contagem de aeróbios mesófilos seguiu o procedimento descrito na ISO 4833-1:2013 (ISO, 2013). Onde 1 mL de cada diluição foi colocado em placa de Petri estéril, e sobre ele foram distribuídos cerca de 15 mL de PCA liquefeito a 50 °C. Cada diluição foi semeada em duplicado. As placas foram incubadas a 30 °C por 48 h a 72 h, período após o qual foi feita a contagem de colónias. A contagem de bolores e leveduras seguiu o procedimento descrito na ISO 21527-1:2008 (ISO 2008). Cada diluição com 0,2 mL foi semeada em placa de Petri contendo 15 mL de Diclorano Rosa Bengal Cloranfenicol (DRBC, Biolife, Itália), em duplicado e espalhada com espalhador. As placas foram incubadas a 25 °C por 3 dias (para contagem de leveduras) e 5 dias (para contagem de bolores).

Após o período de incubação, realizou-se a contagem das colónias das placas que continham entre 15 e 300 colónias, no caso dos mesófilos aeróbios, e entre 15 e 150 colónias no caso dos bolores e leveduras, seguindo a fórmula (ISO 7218:2007). Os resultados foram expressos em UFC/g de amostra.

$$N = \frac{\sum C}{V \times n^1 + 0,1 \cdot n^2 \times d} \text{ UFC/g} \quad (3)$$

onde:

$\sum C$ = Número total de colónias contadas nas placas consideradas

n^1 = Número de placas consideradas na 1ª diluição

n^2 = Número de placas consideradas na 2ª diluição

V = volume semeado

3.7.11 Análise estatística dos dados

Todas as análises foram realizadas em triplicata e os resultados foram denotados como média \pm desvio padrão. Os dados obtidos foram analisados no GraphPad Prism versão 9 (San Diego, CA, EUA). Utilizou-se uma análise de variância unilateral, seguida do teste de Tukey para separação das médias em $p < 0,05$. Além disso, os coeficientes de correlação de Pearson foram calculados para verificar a relação entre os parâmetros testados.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Compostos fenólicos da própolis

A composição fenólica da própolis foi realizada através de LC/DAD/ESI-MSⁿ, conforme Figura 9.

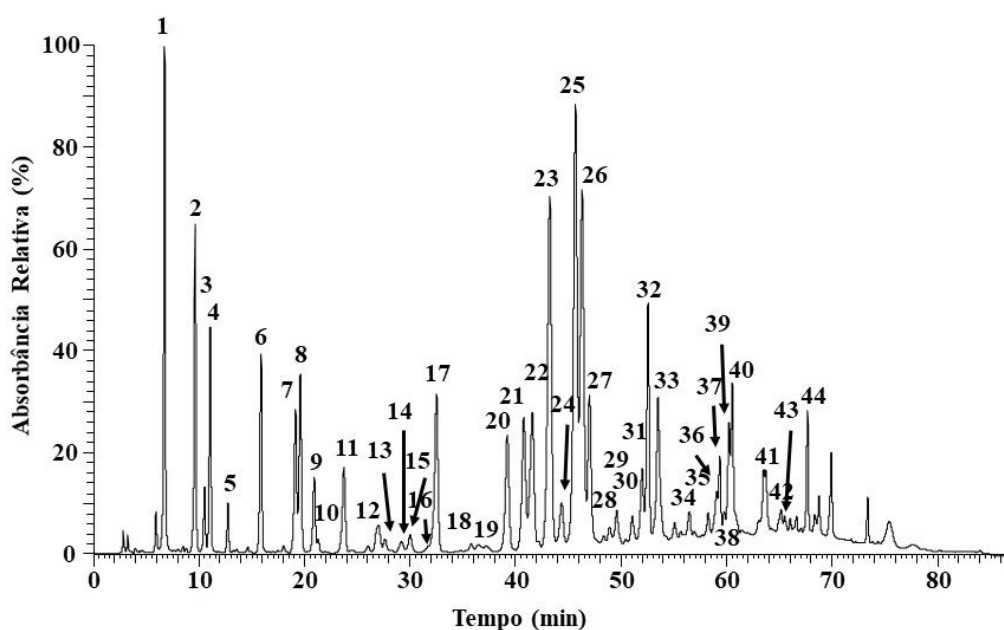


Figura 9 - Perfil cromatográfico a 280 nm do extrato etanólico da própolis.

Com a identificação de 41 compostos, entre eles 14 ácidos fenólicos e 27 flavonóides onde inclui 11 dihidroflavonóis, 9 flavonóis, 5 flavonas e 2 flavononas. Os principais compostos encontrados na amostra foram o ácido cafeíco, pinocembrina, crisina, 3-*O*-acetato de pinobanksina, galangina, ácido cinamilidenacético e quercetina, compostos típicos de própolis com origem em choupo, sendo esta própolis característica de zonas temperadas como , ao relatado por Falcão et al. (2013).

Para os flavonóides, os compostos mais abundantes na amostra da própolis conforme observados na Tabela 3 foram a pinocembrina (m/z 289), o 3-*O*-acetato de pinobanksina (m/z 313), a galangina (m/z 269), a quercetina (m/z 301) e a crisina (m/z 253), que apresentaram quantidades que variaram entre 54,42 e 92,63 mg/g de própolis, esses mesmos compostos foram relatados em estudos anteriores (Falcão et al., 2010). Para os ácidos fenólicos, os compostos mais abundantes foram ácido cafeíco (m/z 179), ácido *p*-cumárico (m/z 163), ácido isoferulico (m/z 193), e ácido ferulico (m/z 193), sendo que as quantificações dos compostos citados se apresentaram entre 2,65 a 17,01 mg/g de própolis relatados igualmente por (Falcão et al., 2010). Algumas estruturas dos compostos mais abundantes são apresentadas abaixo:

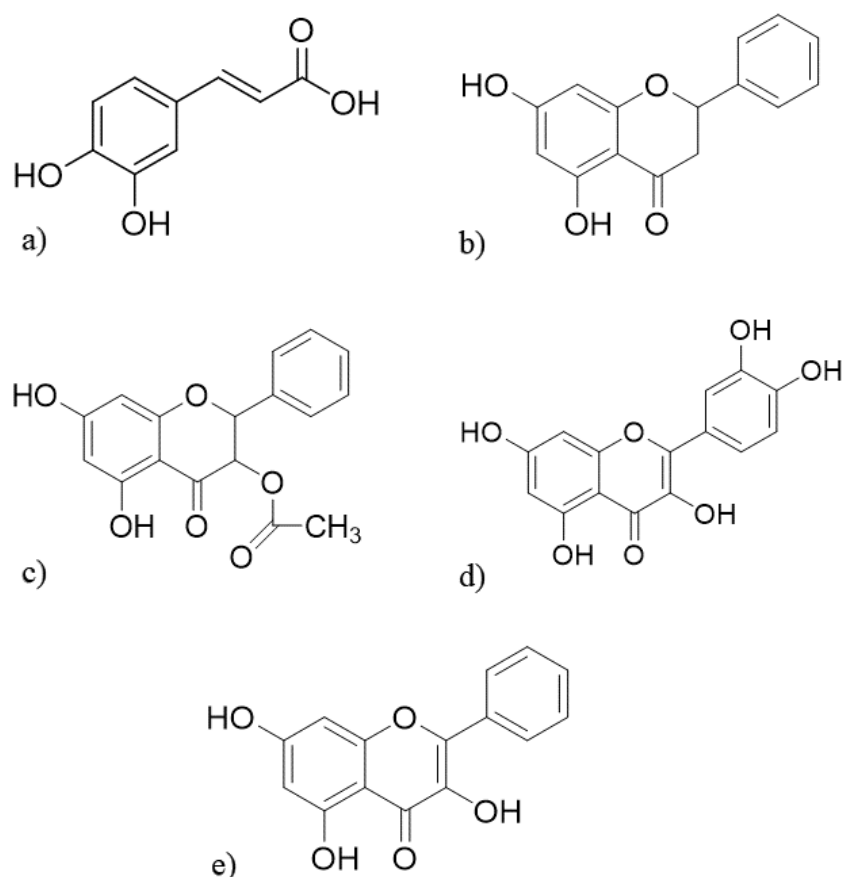


Figura 10 - Estruturas dos compostos mais abundantes na própolis. a) Ácido cafeíco, b) Pinocebrina, c) 3-O-acetatode pinobanksina, d) Quercitina e e) Galangina.

De acordo com trabalhos já realizados, a atividade antimicrobiana da própolis, pode estar relacionada principalmente com os flavonóides, como a pinocebrina e galangina (Bosio et al., 2000), que atuam no interior da membrana bacteriana, fazendo com que o potencial seja alterado e por consequencia modifica sua permeabilidade (Velasquez & Gómez, 2017). Nesta amostra de própolis, a pinocebrina foi o composto mais abundante com uma concentração de 92,63 mg/g de própolis.

Tabela 3 - Identificação e quantificação dos compostos fenólicos da própolis através de LC/DAD/ESI-MSⁿ (média±desvio padrão, n=2).

Nº	t _R (min)	λ _{max} (nm)	[M-H] m/z	MS ² (% pico base)	Composto proposto	mg/g de própolis
1	6.72	292, 323	179	135	Ácido cafeico ^{a,b}	17,01±0,66
2	9.63	310	163	119	Ácido <i>p</i> -cumárico ^{a,b}	12,76±0,49
3	10.52	295, 322	193	133 (100), 149 (49), 177 (15)	Ácido ferulico ^{a,b}	2,65±0,02
4	11.06	298, 319	193	133 (100), 149 (49), 177 (15)	Ácido isoferulico ^{a,b}	8,28±0,035
5	12.73	228	121		Ácido benzoico ^{a,b}	1,93±0,07
6	15.87	295sh, 322	207	192 (100), 163 (62)	Ácido 3,4-dimetil-cafeico ^{a,b}	8,94±0,11
7	19.13	287	285	267 (100), 239 (25), 252 (16)	Éter de 3-metil-pinobanksina ^{b,c}	23,89±0,07
8	19.60	256, 370	301	179 (100), 151 (53)	Quercetina ^{a,b}	56,95±0,28
9	20.92	256, 355	315	300	Éter de 3-metil-quercetina ^{b,c}	24,66±0,15
10	21.28	256, 355	315	300	Éter de metil-quercetina ^{b,c}	4,13±0,10
11	23.74	292	271	253 (100), 225 (22), 151 (8)	Pinobanksina ^{b,c}	17,61±0,05
12	27.05	269, 337	269	225 (100), 151 (20)	Apigenina ^{a,b}	3,69±0,11
13	27.62	267, 365	285	285 (100), 257 (13), 151 (20)	Campferol ^{a,b}	3,27±0,06
14	29.12	253, 370	315	300	Isoramnetina ^{a,b}	5,28±0,28
15	29.97	267, 352	299	284	Éter de metil-campferol ^{b,c}	7,28±0,00
16	31.73	-	329	314	Éter de metil-metoxicampferol ^{b,c}	3,66±0,37
17	32.50	311	173	129	Ácido cinamilidenacético ^{b,c}	12,19±0,44
18	35.79	256, 367	315	165	Ramnetina ^{b,c}	2,77±0,16
19	36.48	265, 300sh, 352	283	268 (100), 239 (76)	Éter de 5-metil-galangina ^{b,c}	2,29±0,23
20	39.21	298, 325	247	179 (100), 135 (16)	Cafeato de isoprenilo ^{a,b}	9,77±0,12
21	40.78	298, 325	247	179 (100), 135 (16)	Cafeato de isoprenilo (isomero) ^{a,b}	10,94±0,02
22	41.59	298, 325	269	178 (100), 135 (96)	Cafeato de benzilo ^{b,c}	12,70±0,01
23	43.23	289	255	213 (100), 211 (55), 151 (36)	Pinocembrina ^{a,b}	92,63±0,01
24	44.39	290	285	139 (100), 145 (42)	NI	0,00
25	45.67	268, 313	253	209	Crisina ^{a,b}	54,42±0,95
26	46.31	294	313	253 (100), 271 (20)	3- <i>O</i> -acetato de pinobanksina ^{b,c}	89,36±1,72

Continuação

N	t _R (min)	λ _{max} (nm)	[M-H] m/z	MS ² (% pico base)	Composto proposto	mg/g de própolis
27	47.01	266, 300sh, 359	269	269 (100), 241 (61)	Galangina ^{a,b}	69,36±2,06
28	48.91	268, 331	283	269	Acacetina ^{a,b}	1,36±0,13
29	49.57	265, 300sh, 350sh	283	269	6-Metoxi-crisina ^{b,c}	3,14±0,06
30	51.06	250, 268sh, 343	313	298	Éter de metil-crisoeriol ^{b,c}	2,81±0,02
31	51.99	294, 310	231	163 (100), 119 (12)	<i>p</i> -Cumarato de isoprenilo ^{b,c}	4,86±0,46
32	52.56	295, 324	295	178 (100), 135 (60)	Cafeato de cinamilo ^{b,c}	13,04±0,33
33	53.50	289	327	253 (100), 271 (10)	3- <i>O</i> -propionato de pinobanksina ^{b,c}	30,12±1,19
34	56.50	289	269	254 (100), 251 (54), 165 (22)	3-Hidroxy-5-metoxi-flavanona ^{b,c}	4,83±0,14
35	58.26	292	417	297 (100), 402 (85), 267 (67)	Éter de 3- <i>O</i> -fenilpropionato de metilpinobanksina ^{b,c}	3,48±0,06
36	59.05	292	475	415	3- <i>O</i> -acetato-5- <i>O</i> -hidroxifenilpropionato de pinobanksina ^{b,c}	7,29±0,03
37	59.35	308	431	281	NI	0,00
38	59.72	292	417	267 (100), 281 (100)	Éter de 3- <i>O</i> -fenilpropionato de metilpinobanksina (isomero) ^{b,c}	2,07±0,04
39	60.22	292	475	415	3- <i>O</i> -acetato-7- <i>O</i> -hidroxifenilpropionato de pinobanksina ^{b,c}	16,51±0,01
40	60.53	294, 320	413	161	NI	0,00
41	63.70	292	355	253	3- <i>O</i> -pentanoato/2-metil-butirato de pinobanksina ^{b,c}	9,67±0,31
42	65.13	292, 322	315	179 (100), 135 (31)	Derivado de ácido cafeíco ^{b,c}	1,11±0,03
43	65.50	292	403	253 (100), 271 (21)	3- <i>O</i> -fenilpropionato de pinobanksina ^{b,c}	1,59±0,30
44	66.98	292	369	253 (100), 271 (14)	3- <i>O</i> -hexanoato de pinobanksina ^{b,c}	0,72±0,00

^a Confirmado com padrão, ^b Confirmado com fragmentação MSⁿ, ^c (Falcão et al., 2013), ^d NI= não identificado

4.2 Espessura dos filmes

Os valores das espessuras dos filmes são apresentados na Tabela 4.

Tabela 4 – Espessuras dos filmes.

Amostras	Espessura (μm)
Filme 0%	61,7 \pm 9,8 ^a
Filme 5%	71,7 \pm 11,7 ^a
Filme 10%	78,3 \pm 7,5 ^a
Filme 20%	70,0 \pm 8,9 ^a

Letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças significativas entre as médias obtidas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Os filmes mostraram espessuras semelhantes, ao redor de 70 μm , apesar de apresentar diferentes concentrações de própolis em sua composição. Geralmente é considerado que a espessura dos filmes deve estar mais condicionada pelo conteúdo de polímero em comparação com a adição de compostos moleculares, cujo tamanho é substancialmente menor e neste caso, a quantidade do quitosano foi fixa para todas as formulações. De fato, através da análise estatística, observou-se que não houve diferença significativa entre as variações entre as amostras.

4.3 Cor

A cor é um parâmetro importante no desenvolvimento de um novo material que será aplicado em alimentos, uma vez que é necessário que não interfira na aparência, sabor e aspectos dos alimentos. A coloração dos filmes pode ser refletida usando os parâmetros de cor, geralmente descritos no modelo CIELAB. O parâmetro L^* refere-se à luminosidade, apresentando valores entre 0 e 100. Quanto maior é seu valor, a amostra é mais brilhante e branca, permitindo maior reflexão da luz. O parâmetro a^* representa a influência da cor verde quando negativa ($-a^*$) e do vermelho quando positiva ($+a^*$) enquanto o b^* indica o efeito da cor azul quando negativo ($-b^*$) e do amarelo quando positivo ($+b^*$). Os resultados das coordenadas da cor dos filmes são apresentados na Tabela 5.

Tabela 5 - Propriedades da cor dos filmes.

Amostras	Parâmetro de coloração		
	L^*	a^*	b^*
Filme 0%	88,2±0,7 ^a	0,5±0,04 ^a	12,2±0,14 ^d
Filme 5%	85,6±0,95 ^b	-1,6±0,49 ^b	33,2±2,67 ^c
Filme 10%	84,6±1,05 ^{bc}	-2,5±0,76 ^b	39,6±2,99 ^b
Filme 20%	82,3±0,99 ^c	-1,8±1,03 ^b	51,0±2,11 ^a

Letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças significativas entre as médias obtidas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Geralmente, a luminosidade, L^* , dos filmes é reduzida quando adicionado algum composto, particularmente aqueles que apresentam cores intensas. Este efeito foi observado nos filmes, que apresentaram uma redução da luminosidade conforme a incorporação da própolis. No filme contendo 0% obteve-se uma luminosidade de 88,2 que foi diminuindo progressivamente até 82,3 para o filme com a maior concentração, 20%. Quando analisado o parâmetro a^* , observaram-se valores negativos para os filmes com adição de própolis, devido à influência das tonalidades verdes, sendo verificados valores de -1,6, -2,5 e -1,8 para os filmes adicionados com 5%, 10% e 20% respectivamente. Do mesmo modo, o seu parâmetro b^* , observou-se um aumento do valor de 33,2 para 51 associado as tonalidades amarelas. Estes resultados indicam que maior concentração da própolis favorece a sua tonalidade verde e amarela tornando-o com aspecto mais escuro e opaco.

De modo geral, de acordo com a análise estatística foram observadas diferenças significativas entre os filmes. Os resultados obtidos são semelhantes com estudos reportados na literatura. Hoque et al. (2011), analisaram filmes de choco (*Sepia pharaonis*) com adição de extrato de cravo, canela e anis estrelado, onde observaram a diminuição do parâmetro L^* e valores mais altos de b^* . Wang et al. (2013), relataram que para filmes a base de quitosano com polifenóis de chá incorporados, os valores de L^* diminuíram e os parâmetros a^* e b^* aumentaram em relação ao controle.

4.4 Transmitância óptica

A transmitância de luz dos filmes é apresentada na Figura 11. Através da análise pode ser observado que a permeabilidade de luz diminuiu com a adição do extrato da própolis, ou seja, aumentou a atividade de bloqueio de UV dos filmes, podendo ser favorável sendo que esse bloqueio pode auxiliar para prevenir a oxidação dos alimentos e fazendo com que ocorra um aumento da sua vida de prateleira.

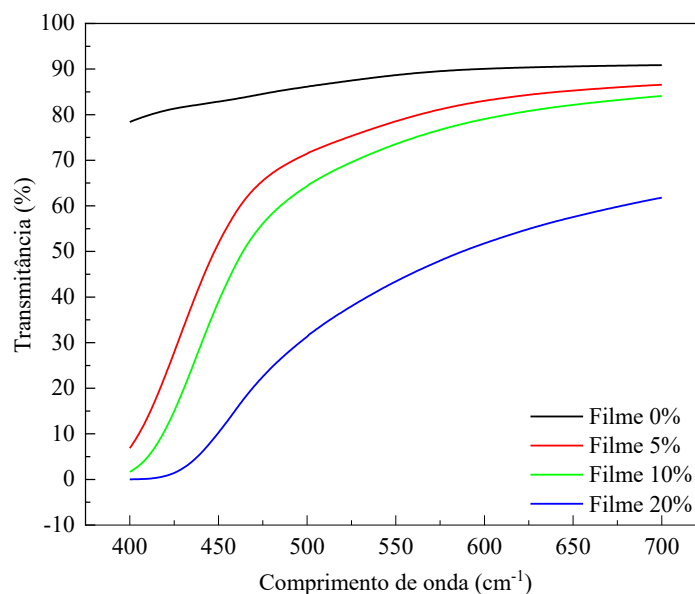


Figura 11 - Transmitância ótica dos filmes

O filme controle apresentou uma permeabilidade de luz de aproximadamente 90,05%, seguidamente dos filmes 5%, 10% e 20% com transmitâncias de 83,03%, 79,04% e 51,77% respectivamente, sendo esses valores referentes ao comprimento de onda 600 cm⁻¹, adotados como referência entre demais autores como Norajit et al. (2010). De acordo com Bitencourt et al. (2014) observaram a diminuição na transmissão da luz conforme adicionado extrato de cúrcuma nos seus filmes. Além disso, Koc et al. (2020) demonstraram um decréscimo significativo quando adicionado extrato fúngico nos filmes a base de quitosano.

4.5 SEM

As superfícies dos filmes foram avaliadas por análise de SEM e as imagens são apresentadas na Figura 12. Como pode ser observado, a morfologia de todos os filmes apresentou-se homogênea, lisa e compacta, evidenciando a capacidade de formação do quitosano. Excepcionalmente, uma pequena alteração foi apreciada no filme com adição de 10%, onde apresentou regiões mais escuras que poderiam estar relacionadas com a efetiva adição da própolis nesta composição.

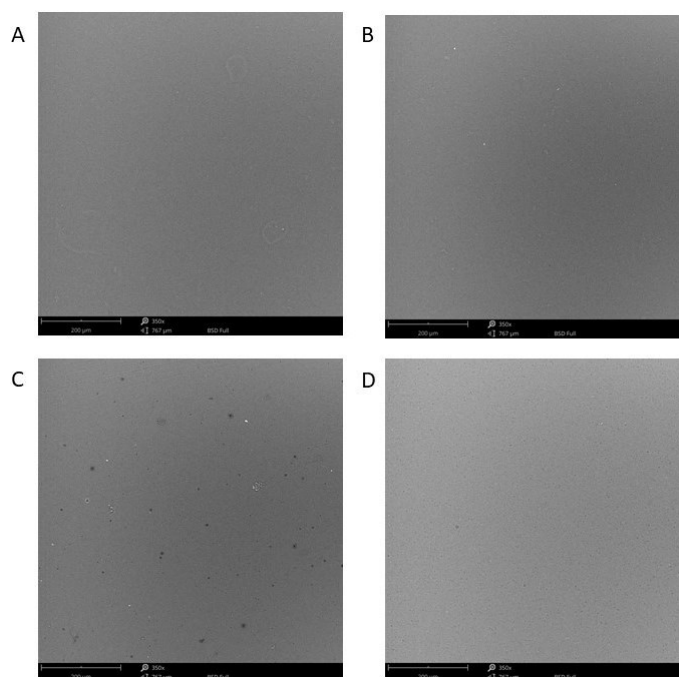


Figura 12 - Microscopia eletrônica de varredura dos filmes contendo A= 0%, B= 5%, C= 10% e D= 20% de própolis

4.6 Solubilidade em água

A solubilidade em água é uma propriedade importante a ser analisada em filmes quando terão por finalidade a proteção de alimentos que contêm elevada quantidade de água. Desta forma, é possível prever o comportamento dos filmes perante ambientes aquosos ou úmidos. Para isso, a perda de peso dos filmes quando mergulhados em água foi estudada e os resultados podem ser observados na Tabela 6.

Tabela 6 - Solubilidade em água dos filmes.

Amostras	Perda de peso (%)
Filme 0%	45,7±5,2 ^a
Filme 5%	23,4±12,8 ^b
Filme 10%	15,3±3,2 ^{bc}
Filme 20%	10,2±0,4 ^c

Letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças significativas entre as médias obtidas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

A maior solubilidade em água foi observada no filme controle de quitosano que apresentou uma perda de peso de aproximadamente 45,7%. Essa perda relaciona-se capacidade de ligação da água com o plastificante, glicerol, e aos grupos funcionais do quitosano (Ojagh et al., 2010). O aumento da concentração do extrato de própolis

influenciou em uma diminuição significativa da solubilidade de água nos filmes, desde 23,4% para o filme contendo 5% de própolis até 10,2% para o filme do 20%. Este efeito está relacionado com a composição química da própolis sendo um produto com baixa solubilidade em água. Resultados semelhantes foram obtidos por outros autores quando realizaram a adição de α -tocoferol e óleo essencial de canela em filmes de quitosano, obtendo uma redução progressiva da solubilidade conforme o aumento de concentração do extratos (Martins et al., 2012; Ojagh et al., 2010).

4.7 FTIR

Para determinar as interações moleculares entre as matérias primas e os filmes, foram realizadas análises de FTIR, conforme apresentado na Figura 13.

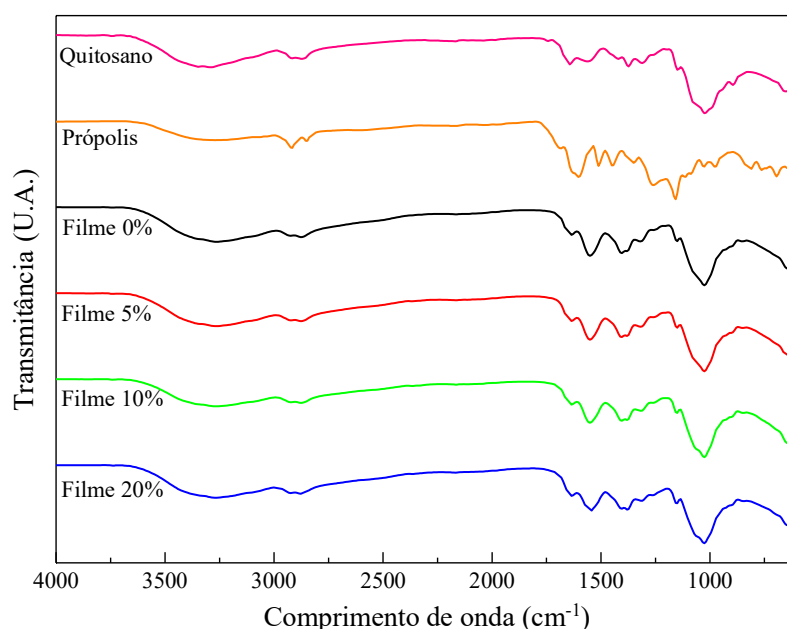


Figura 13 - Espectros FTIR
Fonte: Autoria própria (2021)

No espectro do quitosano, os picos observados na gama 3550 - 3000 cm^{-1} centrados em 3363 e 3286 estão relacionados às vibrações de alongamento dos grupos amino (-NH) e hidroxilo (-OH) respectivamente, o pico centrado ao redor de 2869 cm^{-1} é atribuído à vibração de alongamento dos grupos (-CH) (Zhang et al., 2015). Além disso, na região da amida (1700-1300 cm^{-1}) são diferenciadas várias regiões incluindo a amida I, amida II e amida III. Na região da amida I, o pico em 1647 cm^{-1} é atribuído à vibração de alongamento dos grupos (C=O), na amida II a vibração de deformação (-N-H) está associada ao pico em 1557 cm^{-1} e na amida III, o pico a 1373 reflete a vibração de alongamento (-CN) da estrutura do quitosano (Li et al., 2019).

No espectro da própolis, o pico em 3340 cm^{-1} representa a vibração de alongamento dos grupos (-OH) ligados a hidrogênio de compostos fenólicos, ou seja, grupos hidroxilo fenólicos. Os grupos (C=C) do anel aromático apresentaram as bandas de absorção típicas nos picos 1620 cm^{-1} , 1512 cm^{-1} e 1450 cm^{-1} e a banda de 1157 cm^{-1} é associada a vibração de alongamento relacionada aos (-C-C). Também se observou uma banda em 1049 cm^{-1} atribuída à ligação de (C-O) do éter aromático dos flavonóides e uma banda em 910 cm^{-1} , correspondente a deformação angular fora do plano do (C-H) aromático. Outros estudos similares reportados evidenciaram resultados semelhantes. Por exemplo Elbaz et al. (2016) demonstraram a vibração do (OH) em um comprimento de onda a 3430 cm^{-1} . De acordo com Siripatrawan e Vitchayakitti (2016), as bandas entre 1800 e 1000 cm^{-1} estão relacionadas com a presença de compostos fenólicos, grupos (C=O) de ésteres, éteres e polióis e (-C=C-) do anel aromático. Estudos realizados por Zancanela (2017), evidenciaram que os picos em 1640 , 1457 e 1252 cm^{-1} correspondem às bandas típicas de anéis aromáticos e flavonóides, entre outras classes de compostos.

Em relação aos filmes, foi possível observar que os espectros apresentaram picos correspondentes aos materiais que foram usados para o seu desenvolvimento, ou seja, o quitosano e a própolis. Desta forma os principais picos observados nos filmes foram os grupos amino e hidroxilo, amida I, II e III, além de grupos (-OH), ligação de (C-O) do éter aromático. Porém, com a incorporação das diferentes concentrações da própolis não foi possível evidenciar as variações nos picos correspondentes aos seus grupos, tal fato pode estar relacionado com a superposição de alguns picos com os do quitosano, uma vez que a quantidade da própolis é consideravelmente menor, assim o seu efeito pode não ficar evidenciado nestas análises.

4.8 TGA

A estabilidade térmica das matérias primas e dos filmes foram analisadas mediante análises termogravimétricas onde a perda de massa das amostras é registrada em função da temperatura. Dessa maneira, é possível determinar a temperatura de trabalho limite da amostra, as etapas de degradação que tem lugar durante o processo ou a geração de possíveis resíduos. A evolução da perda de massa das amostras é apresentada na Figura 14 e a Figura 15 representa a suas derivadas, ou seja, a velocidade da perda de massa das amostras.

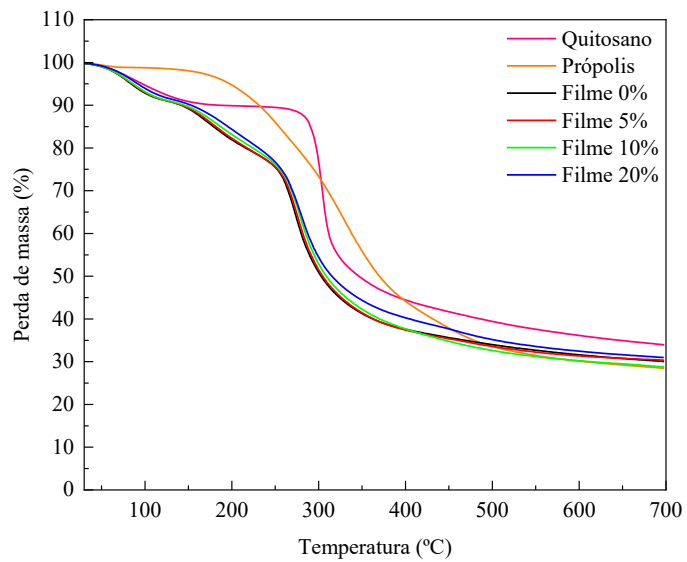


Figura 14 - Perda de massa em função da temperatura
 Fonte: Autoria própria

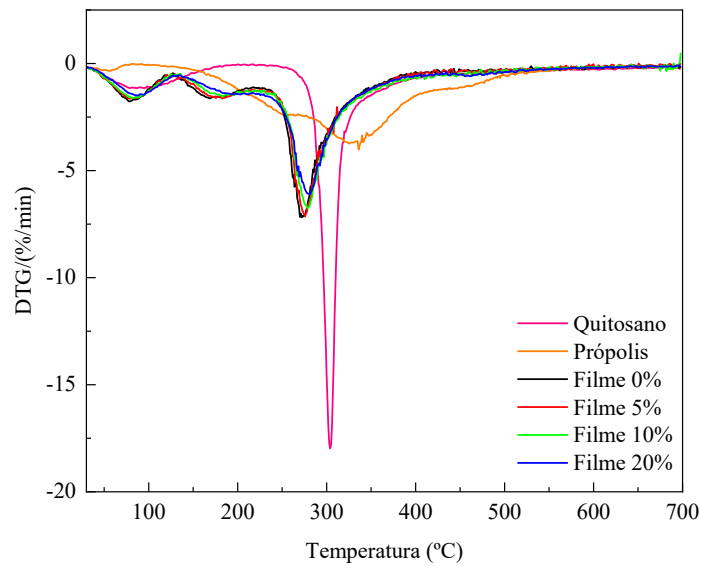


Figura 15 - Velocidade de perda de massa em função da temperatura
 Fonte: Autoria própria

O resumo dos resultados é apresentado na Tabela 7, destacando que nas matérias primas foram identificadas duas etapas de degradação, enquanto nos filmes foram observadas 3 etapas.

Tabela 7 - Etapas de perda de massa das matérias-primas e filmes incluindo a temperatura de degradação (TD) e perda de massa (PM).

Amostras	Etapa 1		Etapa 2		Etapa 3		Resíduo (%)
	T _{D1} (°C)	P _{M1} (%)	T _{D2} (°C)	P _{M2} (%)	T _{D3} (°C)	P _{M3} (%)	
Quitosano	93,4	10,1	303,7	46,0	-	-	34,0
Própolis	56,0	1,1	336,0	66,9	-	-	28,4
Filme 0%	79,2	8,9	169,4	11,7	273,3	43,0	30,1
Filme 5%	78,8	9,1	183,0	11,8	275,8	42,7	30,4
Filme 10%	86,3	8,9	182,8	12,0	278,9	41,9	28,8
Filme 20%	87,8	8,7	203,5	10,0	281,2	42,6	31,0

A primeira etapa de degradação das matérias primas apresentou temperaturas de 56 e 93,4°C e representam a perda de umidade da própolis e do quitosano, respectivamente. A diferença nas temperaturas está relacionada com a naturalidade do solvente utilizado no método de obtenção das matérias, sendo etanol na extração da própolis e a água no quitosano referente a sua tendência na absorção de água, apresentando perdas de 1,1% e 10,1%, respectivamente. A segunda etapa de degradação do quitosano, a uma temperatura de 303,7°C com perda de 46%, pode ser atribuída a sua decomposição térmica ou seja, desidratação dos anéis de sacarídeo, despolimerização e decomposição das unidades acetiladas e desacetiladas do quitosano (Kaya et al., 2018). No caso da própolis, a etapa principal tem lugar a uma temperatura de 336°C com uma perda de 66,9% referente a degradação dos compostos fenólicos presentes no extrato (Silva et al., 2020).

No caso dos filmes, a primeira etapa também é atribuída a perda de umidade onde ocorreu uma degradação de aproximadamente 9% para os filmes. A temperatura desta etapa (80-87°C) situada no intervalo entre a temperaturas de degradação (etapa 1) correspondente das matérias primas indica que esta etapa pode estar influenciada por ambos os solventes, que foram utilizados no processo de preparo dos filmes. Para a segunda etapa de degradação, foram registradas temperaturas que variaram de 169,4 a 203,5°C com perdas de 11,7 e 10,0% respectivamente. Esta etapa pode ser conferida a degradação do glicerol, composto utilizado como plastificante na preparação dos filmes, tendo em vista que estudos anteriores relataram a degradação do glicerol em torno de 120 a 200°C (Kaya et al., 2018). A terceira etapa dos filmes, registrou-se temperaturas de 273,3 a 281,2°C com perdas entre 43,0 e 42,6%, nessa última etapa ocorre a finalizaçãoda degradação da própolis e do quitosano presentes na elaboração dos filmes (Dou et al., 2009; Ezgi et al., 2021). Todas as amostras apresentaram resíduos pertinentes aos

compostos existentes nos materiais.

4.9 Propriedades mecânicas

O comportamento mecânico dos filmes, resulta uma característica fundamental para determinar a sua elasticidade e resistência quando submetidos a aplicação prática. O comportamento mecânico dos filmes é apresentado na Figura 16, enquanto o resumo das propriedades, nomeadamente módulo elástico (E), tensão a ruptura (σ_R) e deformação a ruptura (ϵ_R), são apresentados na Tabela 8.

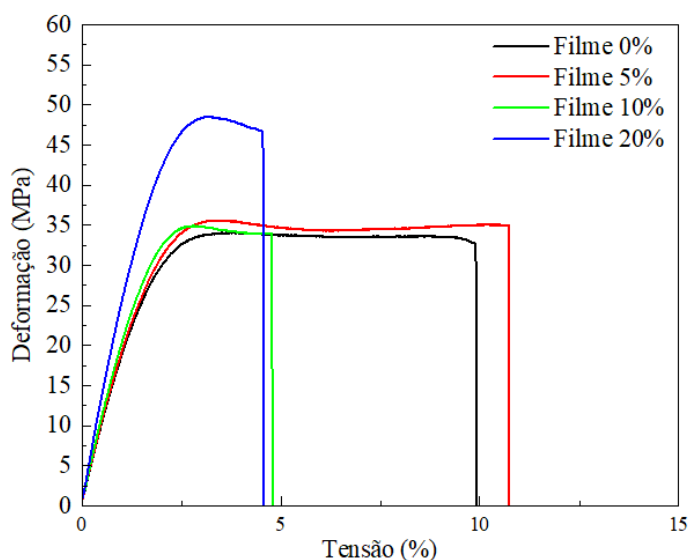


Figura 16 - Curvas de tensão x deformação dos filmes

Tabela 8 - Propriedades mecânicas dos filmes.

Amostras	Módulo (E) (Mpa)	Tensão (σ_R) (Mpa)	Deformação (ϵ_R) (%)
Filme 0%	1795,1±205,2 ^c	35,1±4,7 ^b	10,7±2,3 ^a
Filme 5%	1782,2±433,1 ^c	34,2±6,6 ^b	9,4±2,9 ^a
Filme 10%	2224,9±389,3 ^b	37,6±10,0 ^{ba}	6,0±3,4 ^a
Filme 20%	2471,8±852,6 ^a	48,4±4,7 ^a	5,6±3,5 ^a

Letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças significativas entre as médias obtidas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Geralmente, é preciso certa flexibilidade e resistência mecânica nos filmes para resistir nas condições de aplicação, mantendo a integridade do produto e conferi-lhe as barreiras de proteção (Rao et al., 2010). Os resultados obtidos exibiram um aumento da tensão com a adição de própolis e conseqüentemente, a deformação foi reduzida. Estes resultados implicam que a incorporação da própolis torna o filme mais rígido, sendo capaz de suportar uma maior tensão antes da ruptura dos mesmos.

Outro parâmetro a considerar é o módulo elástico, sendo um indicativo da

deformação elástica do material, ou seja, a capacidade do material de se deformar e voltar a sua forma original quando retirar a força exercida, representando uma deformação recuperável. Maiores valores de módulo implicam também uma maior rigidez do material. Desta forma, os resultados obtidos revelaram que a adição do extrato de própolis aumentou o módulo, sendo aproximadamente, 1795 MPa para o filme 0% e 1782, 2224 e 2471 MPa para os filmes com 5%, 10% e 20% de própolis respectivamente. De fato, os filmes com 10 e 20% apresentaram diferenças significativas quando comparado o filme controle.

Resultados semelhantes foram observados em filmes com adição de extrato fúngico de quitosano, onde o aumento da percentagem de incorporação, os filmes apresentaram um aumento no alongamento e na elasticidade (Koc et al., 2020). Outro estudo de filmes de quitosano com microemulsões de óleo de casca de canela e óleo de soja, relatou que a resistência à tração diminuiu com o aumento da concentração de óleo de casca de canela, porém o mesmo estudo possibilitou resultados onde demonstrou que o alongamento na ruptura dos filmes de quitosano aumentava conforme o aumento da concentração de óleo de soja (Ma et al., 2015). No presente estudo, o alongamento foi reduzido com a própolis, assim pode-se observar que a incorporação de compostos em filmes não irão apresentar o mesmo comportamento, uma vez que cada material adicionado pode apresentar diferentes fatores que proporcionam aspectos diferentes para o filme, fatores como a quantidade do composto adicionado, a homogeneidade do sistema, a origem e a composição.

4.10 Atividade antioxidante

A capacidade antioxidante de filmes comestíveis, é determinada pela capacidade antioxidante dos diferentes compostos que constituem a sua composição. De fato, os variados mecanismos de ação que podem existir, implicam a necessidade de analisar o poder antioxidante dos filmes através de mais de um método. Desta forma, as atividades antioxidantes dos filmes comestíveis de quitosano incorporados com extrato de própolis foram investigadas usando o ensaio de inibição dos radicais ABTS e DPPH conforme mostrado na Tabela 9. Os resultados revelaram que a capacidade antioxidante dos filmes aumentou significativamente de acordo com o acréscimo de extrato de própolis.

Tabela 9 - Capacidade antioxidante dos filmes.

Amostras	Inibição (%)	
	ABTS	DPPH
Filme 0%	4,9±0,2 ^d	2,5±2,1 ^c
Filme 5%	20,3±0,5 ^c	49,8±2,6 ^b
Filme 10%	54,6±0,4 ^b	94,0±0,5 ^a
Filme 20%	83,6±0,3 ^a	94,5±0,2 ^a

Letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças significativas entre as médias obtidas pelo teste deTukey ($p < 0,05$).

O filme controlo apresentou uma leve atividade de inibição dos radicais de 4,9% e 2,5% para os métodos ABTS e DPPH, respectivamente. Nos filmes incorporados com a própolis, ambos os testes apresentaram um crescente poder antioxidante nas amostras. Nas análises de ABTS, a maior atividade de inibição dos radicais foi registrada no filme com 20% de própolis, apresentando um 83,6%, além de refletir diferença significativa em todos os filmes estudados. No método DPPH, o filme 20% também foi a amostra com maior capacidade antioxidante, com um valor de inibição de 94,5%. Porém, nesse mecanismo não ocorreu diferença significativa entre o filme 10% e 20%. A comparação dos dois métodos mostrou que os radicais DPPH reagiram fortemente com os agentes antioxidantes dos filmes quando comparados com o ABTS.

Em outros estudos reportados, a adição de extrato fúngico nos filmes a base de quitosano também demonstraram um aumento significativo no poder antioxidante do filme, representando cerca de 84% (Koc et al., 2020). Também, a adição de extrato de espirulina também registrou aumento na atividade antioxidante dos filmes, apresentando a maior atividade um valor de cerca de 58,77% (Balti et al., 2017). Da mesma forma, Zhang et al. (2020) relataram que a adição de extrato da casca de banana em filmes de quitosano, fizeram com que a atividade antioxidante fosse potencializada.

4.11 Atividade antimicrobiana dos filmes

A deterioração dos alimentos pode resultar em perdas significativas, fato este diretamente relacionado com o crescimento de microrganismos deterioradores, que alteram as propriedades e o valor nutritivo, levando a degradação de frutas. As amoras e outros pequenos frutos (framboesas, morangos) são altamente perecíveis, e a sua deterioração rápida é geralmente resultado do desenvolvimento de bolores como *Alternaria* sp., *Botrytis cinerea*, *Cladosporium* sp. e *Penicillium* sp., que causam podridões visíveis (Horvitz et al., 2017). Além destes bolores, várias bactérias e leveduras

podem também desenvolver-se e causar outros tipos de deterioração, menos evidentes, como podridões moles, podridões secas, ou fermentação (Tournas & Katsoudas, 2005). Assim, a aplicação de filmes comestíveis visa auxiliar para que o produto tenha uma vida útil estendida, além de prevenir o desenvolvimento dos microrganismos que venham afetar a qualidade do produto e comprometer sua integridade. A atividade antimicrobiana dos filmes contendo extrato de própolis tem sido amplamente avaliada pelo método de difusão em disco, uma vez que este método se baseia na liberação de agentes antimicrobianos dos filmes para o ágar, onde resulta em uma zona de inibição do crescimento microbiano ao redor dos filmes. A adição do extrato de própolis é um procedimento capaz de conferir aos filmes uma atividade antimicrobiana, atribuída aos compostos fenólicos do extrato (Safaei & Roosta, 2020; Suriyatem et al., 2018)

A utilização de quitosano como revestimento comestível é amplamente estudado devido a capacidade de formar uma película na superfície dos alimentos e por apresentar propriedades de inibição de bactérias e fungos e desta maneira proteger o mesmo. Essa camada de filme faz com que ocorra o desenvolvimento de uma barreira de umidade e gás levando redução da deterioração e prolongando a vida útil (Chaudhary et al., 2020).

No presente estudo, a avaliação do potencial dos filmes de própolis no controle de desenvolvimento microbiano foi avaliada em duas fases. Numa primeira fase, foi efetuado um estudo *in vitro* da atividade antimicrobiana de filmes de quitosano contendo 0%, 5%, 10 e 20% de própolis, usando dois métodos de difusão em ágar (solução teste em poço ou em disco impregnado). Este efeito foi comparado com o efeito de agentes antimicrobianos químicos. Uma vez que o objetivo dos discos de papel é a observação de zonas de inibição, os principais microrganismos que se destacaram neste quesito foram *B. cinerea*, *Cladosporium* sp. e *P. brevicompactum*. Os resultados obtidos para estes fungos estão apresentados nas Figuras 17, 18 e 19, respectivamente. *Botrytis cinerea* e *P. brevicompactum* apresentaram maiores zonas de inibição do desenvolvimento dos bolores nos filmes contendo própolis na composição dos mesmos. Resultado semelhante foi relatado por Moreno et al. (2020), em um estudo sobre revestimentos comestíveis antifúngicos contendo extrato de própolis, onde os filmes revelaram notável atividade antifúngica apresentando maior efeito inibitório sobre *P. digitatum* e *B. cinerea*.

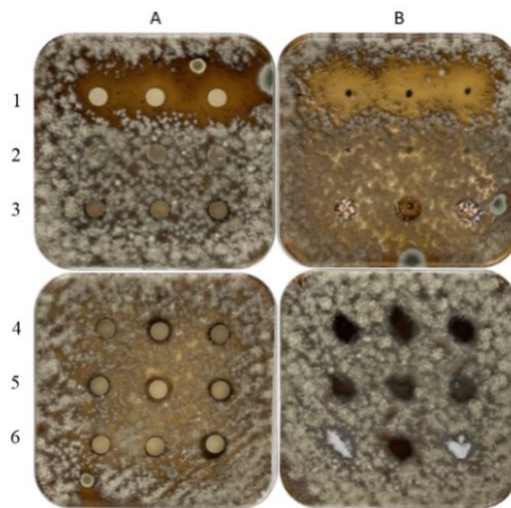


Figura 17 - Atividade antimicrobiana de filmes de própolis contra *Botrytis cinerea* CIMO 21MS019. Colunas: A. Difusão em disco de ágar; B. Difusão em gota de ágar. Linhas: 1. Antifúngico comercial Bayer Teldor (1,5mg/100mL); 2. Controlo negativo; 3. Filme 0%; 4. Filme 5%; 5. Filme 10%; 6. Filme 20% (em triplicado).

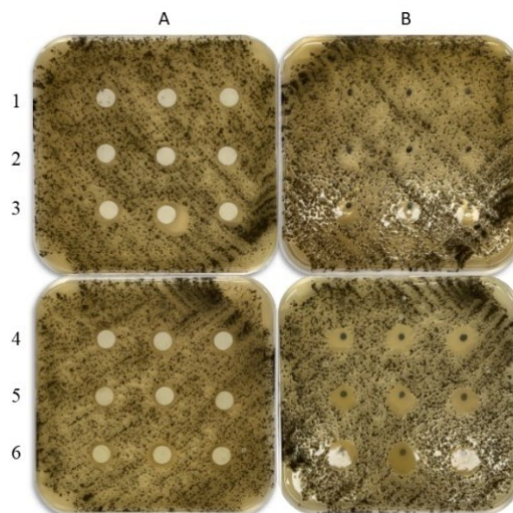


Figura 18 - Atividade antimicrobiana de filmes de própolis contra *Cladosporium* sp CIMO 21MS014. Colunas: A. Difusão em disco de ágar; B. Difusão em gota de ágar. Linhas: 1. Antifúngico comercial Bayer Teldor (1,5mg/100mL); 2. Controlo negativo; 3. Filme 0%; 4. Filme 5%; 5. Filme 10%; 6. Filme 20% (em triplicado).

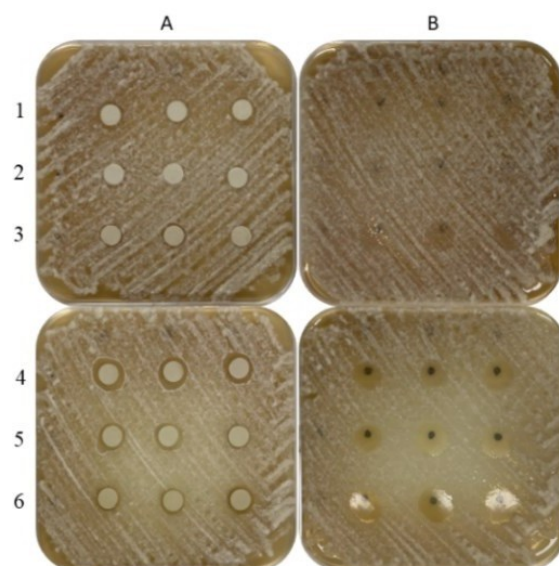


Figura 19 - Atividade antimicrobiana de filmes de própolis contra *Penicillium brevicompatum* CIMO 21MS015. Colunas: A. Difusão em disco de ágar; B. Difusão em gota de ágar. Linhas: 1. Antifúngico comercial Bayer Teldor (1,5mg/100mL); 2. Controlo negativo; 3. Filme 0%; 4. Filme 5%; 5. Filme 10%; 6. Filme 20% (em triplicado).

Já os demais microrganismos testados, que podem ser consultados no anexo A, para a difusão em disco de ágar, não foi possível observar zonas visíveis de inibição. Desta maneira, fez-se a observação em esteriomicroscópio para melhor verificação dos resultados. Os microrganismos que mais tiveram formação de halos foram *Pantoea* sp. e *Staphylococcus hominis*, conforme apresentado na Figuras 20 e 21, respetivamente.

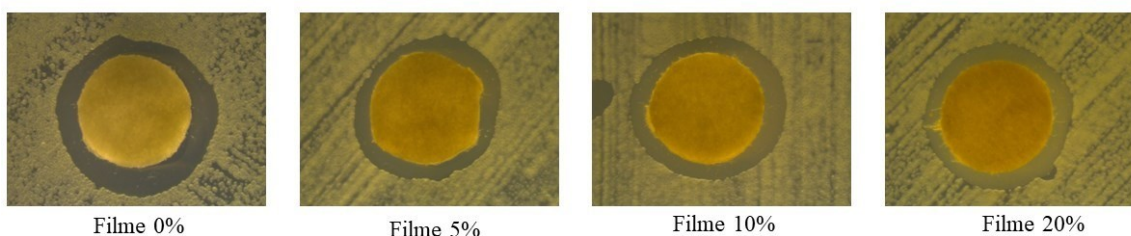


Figura 20 - Atividade antimicrobiana contra *Pantoea* sp. Detalhe do efeito inibitório dos filmes de própolis a diferentes concentrações.

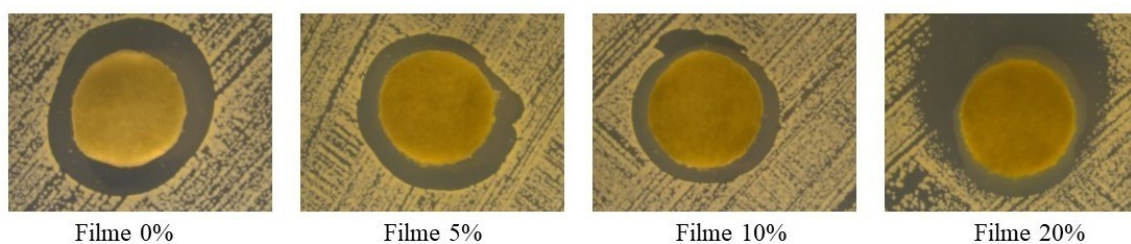


Figura 21 - Atividade antimicrobiana *Staphylococcus hominis*. Detalhe do efeito inibitório dos filmes de própolis a diferentes concentrações.

Do mesmo modo que os bolores citados anteriormente, foi possível observar zonas de inibição para a bactéria *S. aureus*, conforme apresentado na Figura 22, ocorrendo assim formação de halo nos filmes que consistiam em adição de própolis. O mesmo foi relatado por Bodini et al. (2013), onde observaram o efeito inibitório contra *S. aureus* em filmes à base de gelatina incorporados com extrato de própolis. Da mesma forma, Altiok et al.

(2010) evidenciaram que para filmes de quitosano adicionados de óleo de tomilho, uma concentração de 1% foi capaz de inibir o microrganismos citado. Siripatrawan & Vitchayakitti (2016) relataram que filmes de quitosano contendo diferentes concentrações de própolis de 2,5%, 5%, 10% e 20% também apresentaram efeito inibitório contra a bactéria em análise.

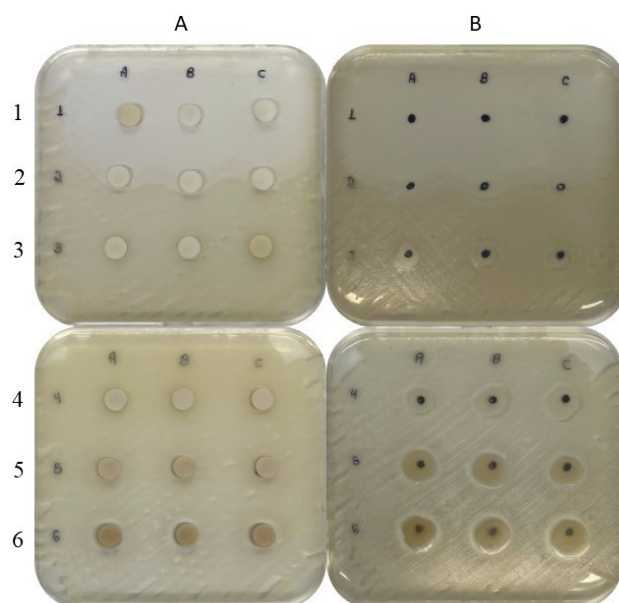


Figura 22 - Atividade antimicrobiana de filmes de própolis contra *Staphylococcus aureus*. Colunas: A. Difusão em disco de ágar; B. Difusão em gota de ágar. Linhas: 1. Antifúngico comercial Bayer Teldor (1,5mg/100mL); 2. Controle negativo; 3. Filme 0%; 4. Filme 5%; 5. Filme 10%; 6. Filme 20% (em triplicado).

Para o estudo realizado pelo método de difusão de gota em ágar, coluna B das figuras acima, pode-se observar o efeito da difusão do composto no meio e a inibição dos microrganismos. Desta forma, foi possível observar que para todos os microrganismos testados ocorreu a redução do crescimento microbiano, não sendo observado o desenvolvimento sobre as gotas dos filmes. Assim, com estes resultados observou-se que a adição de própolis é capaz de aumentar a capacidade antimicrobiana dos filmes de quitosano, como relatado por Siripatrawan & Vitchayakitti (2016), que analisou o melhoramento das propriedades funcionais dos filmes de quitosano como embalagens ativas de alimentos por incorporação com própolis e observou que os filmes de quitosano contendo extrato de própolis exibiram atividade antimicrobiana na superfície de contato com os filmes. Além disso, Altiok et al. (2010) no estudo das propriedades antimicrobianas de filmes de quitosano que continham óleo de tomilho, não observaram nenhum crescimento bacteriano sob os filmes. Moreno et al. (2020), em análise da atividade antifúngica com própolis, relatou inibição de *Alternaria alternata*, *Penicillium italicum* e *Aspergillus carbonarius*. Pacheco et al. (2019), em filmes de nanopartículas de própolis-quitosano, observou redução de *Listeria monocytogenes*, *E. coli* e *Salmonella*

Enteritidis. De maneira geral, para ambos os tratamentos de difusão em discos de papel e em gota, foi possível observar uma redução no desenvolvimento dos microrganismos analisados. Porém, as zonas de inibições observadas neste estudos se apresentaram reduzidas, exibindo tamanhos com cerca de 0,04 mm a 0,06 mm para todos tratamentos e microrganismos, desta forma se apresentando inconsistente quando comparadas com outros estudos, como por exemplo, Bodini et al. (2013), utilizou concentrações de 40 e 200 g de EPE / 100 g de gelatina onde registrou zonas de inibição variando de 1,2 a 5,4 mm para *S. aureus*.

A reduzida atividade da própolis quando incorporada nos filmes de quitosano, pode estar relacionada com a perda parcial dos compostos fenólicos, uma vez que interagem com os grupos funcionais do quitosano e desta forma, apresentam dificuldade em se propagar e ocorrer a difusão através do meio de ágar, fazendo com que impeça uma atividade antimicrobiana relevante frente a estudos já realizados (Siripatrawan & Vitchayakitti, 2016). Esta interação entre os compostos fenólicos e o quitosano também pode levar a uma menor interação com as células bacterianas e as moléculas responsáveis pelo seu crescimento. Assim pode ocasionar com que a interação química e os compostos fenólicos, venham a dificultar a difusão dos potenciais antimicrobianos dos filmes para inibir as bactérias ao redor dos discos do filme durante o ensaio de difusão em ágar.

Em Portugal, para a cultura de amoras não existem produtos fitofarmacêuticos homologados, porém existem autorizações para a utilização de alguns desses produtos usados no combate a determinados organismos para esta cultura. A utilização destes produtos é autorizada de acordo com o estipulado no art.º 9 do Decreto-Lei nº 94/98, de 15 de abril (Ministério da Agricultura, 1998) dentre eles estão inseticidas, acaricidas e fungicidas. Desta forma, utilizou-se um fungicida comercial aprovado para aplicação em amoras como controlo positivo para as análises microbiológicas. Além disso, a avaliação de aplicação nas amoras refere-se a um estudo preliminar, não tendo sido efetuadas réplicas e por isso não se apresenta desvio padrão e análises estatísticas, ademais optou-se pela utilização do filme 10%, uma vez que, se trata de uma concentração média.

Os resultados da atividade antimicrobiana contra bactérias, levedura e bolores através da aplicação dos filmes nas amoras apresentam-se nas Figuras 23, 24 e 25, respetivamente.

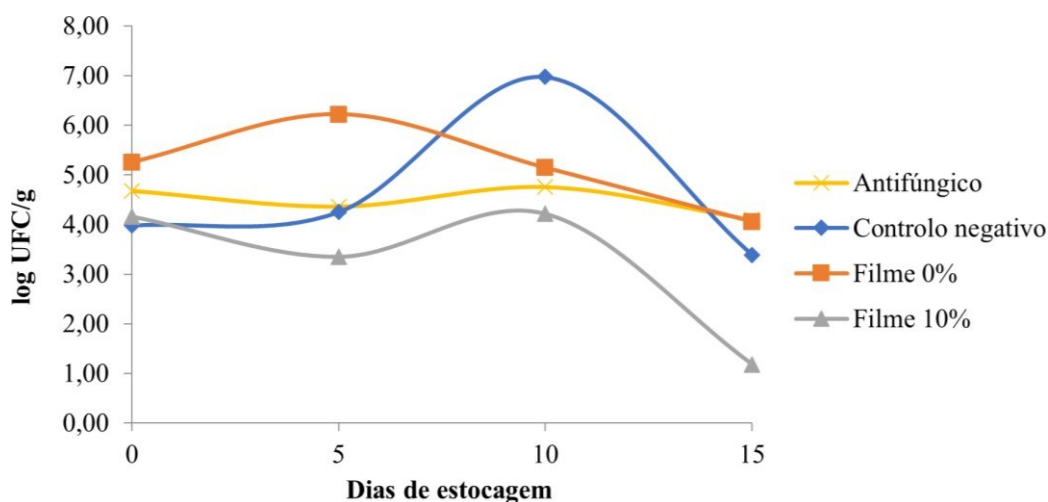


Figura 23 - Contagens (log UFC/g) de aeróbios mesófilos em amoras ao longo de 15 dias de estocagem a 4 °C.

O tratamento das amoras com o filme 10% apresentou resultados satisfatórios no controlo de bactérias aeróbias mesófilas, sendo que, pode ser observado o controlo do desenvolvimento ao final dos 15 dias, Figura 23. Este filme demonstrou reduções constantes e acentuadas até o final do tempo de armazenamento, sendo observado no dia 0 uma contagem de 4,16 log UFC/g e ao final dos 15 dias a contagem foi de 1,18 log UFC/g, apresentando uma redução de aproximadamente 3 ciclos log (1000 x). Para o filme 0% oscilações foram observadas e o controlo não foi efetivo quando comparado com o filme 10%.

O efeito dos filmes sobre a carga de leveduras pode ser observado na Figura 24.

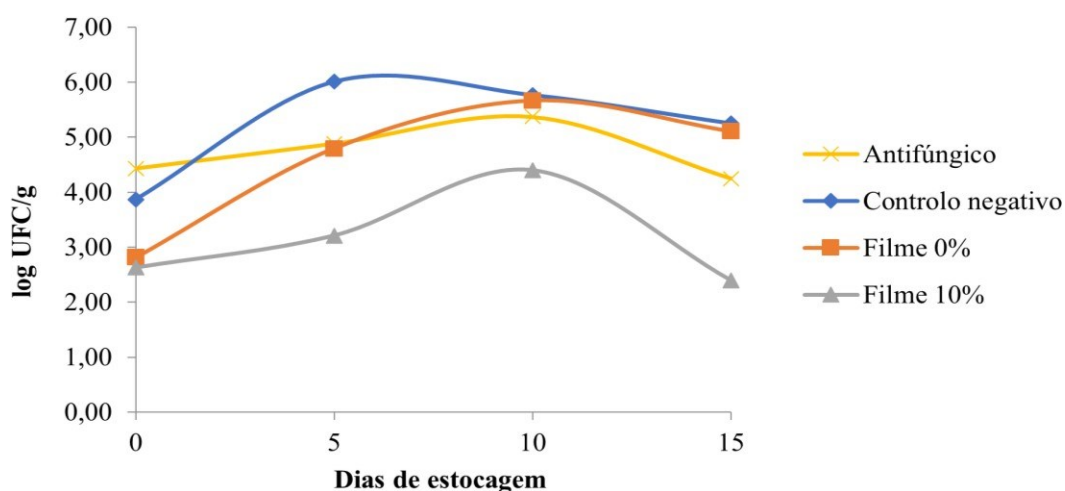


Figura 24 - Contagens (log UFC/g) de levedura em amoras ao longo de 15 dias de estocagem a 4 °C

O tratamento 0% não foi efetivo para esse microrganismo onde foi observado aumento no desenvolvimento, passando de 2,81 log UFC/g para 5,11 log UFC/g nos 15

dias finais. Para o tratamento 10%, pode ser relatado uma redução, porém não acentuada como visto nas bactérias, apresentando uma redução de aproximadamente 0,3 ciclos log o desenvolvimento das leveduras. Ainda assim, o tratamento com filme 10% foi o que apresentou melhores resultados no controlo das leveduras.

A Figura 25 apresenta o efeito dos tratamentos no desenvolvimento de bolores

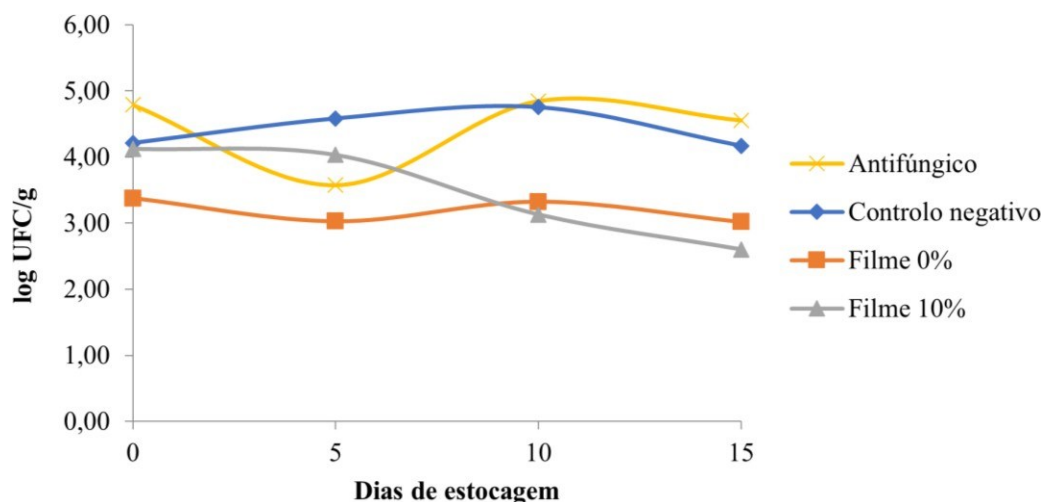


Figura 25 - Contagens (log UFC/g) de bolores em amoras ao longo de 15 dias de estocagem a 4 °C

Para os bolores pode ser observado que a aplicação do filme 0%, nos cinco primeiros dias apresentou uma maior redução do desenvolvimento, porém não manteve constante a ação de decréscimo, ao contrário do filme 10% onde se observou um decréscimo constante e evidenciado ao fim dos 15 dias, sendo que inicialmente observou-se uma contagem de 4,12 log UFC/g para 2,60 log UFC/g, representando assim uma redução cerca de 1,5 ciclos log no crescimento dos bolores. Já o tratamento com as frutas somente lavadas e a aplicação do antifúngico não apresentaram queda do desenvolvimento dos bolores.

Desta maneira, foi possível observar que os testes *in vitro* não apresentaram resultados semelhantes quando comparados com o teste de aplicação nas amoras. Os testes *in vitro* apresentaram zonas de inibição reduzidas para todos os tratamentos e microrganismos em análise, porém quando comparadas com o teste nas amoras, estes resultados mostraram-se mais satisfatórios, uma vez que, foi possível observar uma maior redução do desenvolvimento dos microrganismos quando aplicado o filme que continha própolis em sua composição, relativamente aos restantes tratamentos testados.

Com os resultados do presente estudo, foi possível observar que os filmes de quitosano com própolis mostraram maior eficiência inibitória contra bactérias Gram-positivas *Arthrobacter* sp., *Staphylococcus hominis*, *Staphylococcus aureus* e *Bacillus*

cereus em comparação com as Gram-negativas, *Erwinia* sp. e *Escherichia coli*. Como a membrana externa das Gram-negativas contém lipopolissacarídeos, esse grupo geralmente é mais resistente a agentes químicos externos em comparação com as Gram-positivas (Shahbazi, 2017). Além disso, este estudo contrasta com estudos da eficácia antibacteriana do filme de quitosano contra *E. coli* e *S. aureus*, no qual o filme exibiu baixa propriedade bactericida pelo método de difusão em ágar, assim como relatado em estudos anteriores (Torlak & Sert, 2013). Por outro lado, na aplicação do filme 10% nas amoras, pode-se observar que a adição de própolis aumentou a atividade antimicrobiana dos filmes de quitosano, sendo que, o efeito antimicrobiano do quitosano contendo própolis em sua composição pode ser atribuído principalmente aos flavonóides da própolis. A atividade antibacteriana dos filmes contendo própolis inclui diferentes ações sendo elas alteração da permeabilidade da membrana, modificação química da membrana celular, deformação da célula microbiana (Siripatrawan et al., 2013).

Como esperado, a atividade antimicrobiana foi aumentada com a adição de extrato da própolis na formulação do filme de quitosano, sendo capaz de reduzir as contagens de bactérias em cerca de 3 ciclos de log em um período de 15 dias de armazenamento. E para os bolores, sendo eles *Botrytis cinerea*, *Cladosporium* sp. e *Penicillium brevicompactum* foram os que mais apresentaram zonas de inibição, destacando principalmente a *B. cinerea* uma vez que, se caracteriza por ser um dos principais causadores de deterioração da amora, causando a podridão cinzenta. Estudos demonstraram a falta de propriedades antibacterianas do filme de quitosano contra *S. aureus*, *S. Enteritidis*, *E. coli* e *Pseudomonas aeruginosa*, sendo que a atividade antimicrobiana foi observada somente após incorporação do extrato de própolis ao filme de quitosano, em concentrações variando entre 2,5% e 20,0% (Siripatrawan & Vitchayakitti, 2016).

5. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS FUTURAS

A preocupação pela prolongação da vida útil de alimentos tem destacado grande atenção a níveis industriais, uma vez que, a deterioração, principalmente de frutas e hortaliças são responsáveis por grandes perdas econômicas. A produção de filmes comestíveis provindo de fontes naturais que visam o aumento da vida de prateleira tem ganhado espaço para novos estudos e aplicações. A utilização de quitosano em filmes se faz relevante uma vez que, que tem origem em uma fonte natural e a incorporação de extrato fenólico de própolis auxilia nas características dos filmes, aumentando as propriedades biológicas. Desta forma, o presente estudo teve por objetivo o desenvolvimento de filmes comestíveis à base de quitosano com incorporação de diferentes concentrações de extrato fenólico de própolis, determinando as características dos filmes e avaliando suas propriedades biológicas em especial a atividade antioxidante e antimicrobiana.

Inicialmente a avaliação da composição fenólica da própolis apresentou 41 compostos, entre eles 14 ácidos fenólicos e 27 flavonóides, sendo que, entre os mais abundantes se destacaram o ácido cafeico, a pinocembrina, o 3-*O*-acetato de pinobanksina, a quercitina e a galangina. Em relação à caracterização dos filmes, a espessura não apresentou diferença significativa permanecendo em torno de 70 μm , para a coloração observou-se que ocorreu uma redução na luminosidade L^* e uma variação nos parâmetros a^* e b^* tornando os filmes com tonalidades verde e amarela e com aspecto mais escuro e opaco em presença de maior concentração da própolis. Na avaliação da transmitância ótica, observou-se a diminuição da permeabilidade de luz com a adição do extrato da própolis, aumentando a atividade de bloqueio de UV dos filmes. Na análise de SEM, a morfologia de todos os filmes revelou-se homogênea, lisa e compacta. Em relação à solubilidade dos filmes em água, observou-se que o aumento da concentração do extrato de própolis influenciou na diminuição significativa da solubilidade, fazendo com que a perda de peso fosse reduzida.

Para os resultados de FTIR, os espectros de quitosano apresentaram picos na gama de 3550 - 3000 cm^{-1} relacionados aos grupos amino (-NH) e hidroxilo (-OH), além de picos na região de 1700-1300 cm^{-1} referentes a amida I, amida II e amida III. No espectro da própolis, o pico em 3340 cm^{-1} representa grupos hidroxilo fenólicos. Também se observou uma banda em 1049 cm^{-1} atribuída à ligação de (C-O) do éter aromático dos flavonóides. Para os filmes, os principais picos observados foram grupos amino e hidroxilo, amida I, II e III, além de grupos (-OH), ligação de (C-O) do éter aromático. Em

relação a análise de TGA, a primeira etapa de degradação representa a perda de umidade das matérias primas. Para a segunda etapa, em relação à parte do quitosano houve perdas de massa referente à desidratação dos anéis de sacarídeo, decomposição das unidades acetiladas e desacetiladas. Em relação à parte da própolis a perda de massa está relacionada com a degradação dos compostos fenólicos, além da degradação do glicerol. Por fim, a última etapa de degradação dos filmes dá-se pela finalização da degradação da própolis e do quitosano.

As propriedades mecânicas dos filmes apresentaram um aumento na tensão conforme a adição de própolis e conseqüentemente a capacidade de deformação foi reduzida, obtendo-se um filme mais rígido conforme a adição de própolis. Além do mais para outro parâmetro analisado, o módulo elástico, observou-se que com o aumento da concentração de própolis levou a um aumento da rigidez. Os filmes apresentaram crescente poder antioxidante conforme o acréscimo de própolis para ambos os ensaios realizados, com valores de inibição de DPPH de 49,8% 94% e 94,5% para os filmes 5%, 10% e 20% respectivamente.

Os resultados obtidos para a atividade antimicrobiana mostraram que a incorporação de própolis nos filmes beneficiaram a redução do desenvolvimento microbiano, no estudo *in vitro*, destacando-se os fungos *Botrytis cinerea*, *Cladosporium* sp, *Penicillium brevicompatum*, que apresentaram zonas de inibição visíveis quando os filmes continham própolis. Já para o fungo *Pantoea* sp e a bactéria a *Staphylococcus hominis*, observaram-se, com o auxílio de um esteriomicroscópio, halos de inibição e baixo desenvolvimento microbiológico. Observou-se também a redução de crescimento e formação de halos para *Staphylococcus aureus*. A atividade antimicrobiana quando analisada com aplicação direto nas amoras, apresentaram resultados satisfatórios, demonstrando a redução da deterioração das frutas e diminuição do desenvolvimento dos microrganismos ao final dos 15 dias de armazenamento, indicando reduções de 3 ciclos log para as bactérias, 0,3 ciclos de log para levedura e 1,5 ciclos log no crescimento dos bolores.

Desta maneira, foi possível observar que os filmes de quitosano com própolis mostraram maior eficiência inibitória contra bactérias Gram-positivas em comparação com as Gram-negativas. Como esperado os resultados da ação do filme 10% na aplicação em amoras, revelou que a adição de própolis aumentou a atividade antimicrobiana dos filmes de quitosano, sendo que, esse efeito antimicrobiano do quitosano contendo própolis pode ser atribuído principalmente aos flavonóides da própolis. Como esperado,

a atividade antimicrobiana foi aumentada com a adição de extrato da própolis na formulação do filme de quitosano.

Para perspectivas futuras, recomenda-se a aplicação de diferentes concentrações de quitosano, realizando análise microbiológica com repetições para análise estatística, estudo de *self-life* do produto e realização de análise sensorial para analisar as alterações que o filme pode causar nos alimentos.

6. REFERÊNCIAS

- Abd, A. J., & Niamah, A. K. (2012). Effect of chitosan on apple juice quality. *International Journal of Agricultural and Food Science*, 2, 153–157.
- Abdallah, M. R. S., Mohmaed, M. A., Mohamed, H. M. H., & Emara, M. M. T. (2017). Improving the sensory, physicochemical and microbiological quality of pastirma (A traditional dry cured meat product) using chitosan coating. *LWT - Food Science and Technology*, 86, 247–253. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.08.006>
- AbdElsalam, E., Foda, H. S., Abdel-aziz, M. S. ., & Abd, E.-H. . (2018). Antioxidant and Antimicrobial activities of Egyptian Bee Pollen. *Middle East Journal of Applied Sciences*, 08, 1248–1255.
- Abdou, E. S., Nagy, K. S. A., & Elsabee, M. Z. (2008). Extraction and characterization of chitin and chitosan from local sources. *Bioresource Technology*, 99, 1359–1367. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.01.051>
- Ahmad, S. I., Ahmad, R., Khan, M. S., Kant, R., Shahid, S., Gautam, L., Hasan, G. M., & Hassan, M. I. (2020). Chitin and its derivatives: Structural properties and biomedical applications. *International Journal of Biological Macromolecules*, 164, 526–539. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.07.098>
- Al-Jabri Ali A. (2005). Honey, milk and antibiotics. *African Journal of Biotechnology*, 4, 1580–1587. <https://doi.org/10.5897/AJB2005.000-3204>
- Aloui, H., & Khwaldia, K. (2016). Natural Antimicrobial Edible Coatings for Microbial Safety and Food Quality Enhancement. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 15, 1080–1103. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12226>
- Altiok, D., Altiok, E., & Tihminlioglu, F. (2010). Physical, antibacterial and antioxidant properties of chitosan films incorporated with thyme oil for potential wound healing applications. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 21, 2227–2236. <https://doi.org/10.1007/s10856-010-4065-x>
- Alvarez, M. V., Ponce, A. G., & Moreira, M. del R. (2013). Antimicrobial efficiency of chitosan coating enriched with bioactive compounds to improve the safety of fresh cut broccoli. *LWT - Food Science and Technology*, 50, 78–87. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2012.06.021>

- Anraku, M., Gebicki, J. M., Iohara, D., Tomida, H., Uekama, K., Maruyama, T., Hirayama, F., & Otagiri, M. (2018). Antioxidant activities of chitosans and its derivatives in in vitro and in vivo studies. *Carbohydrate Polymers*, *199*, 141–149. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.07.016>
- Atarés, L., & Chiralt, A. (2016). Essential oils as additives in biodegradable films and coatings for active food packaging. *Trends in Food Science and Technology*, *48*, 51–62. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2015.12.001>
- Balouiri, M., Sadiki, M., & Ibensouda, S. K. (2016). Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, *6*, 71–79. <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2015.11.005>
- Balti, R., Mansour, M. Ben, Sayari, N., Yacoubi, L., Rabaoui, L., Brodu, N., & Massé, A. (2017). Development and characterization of bioactive edible films from spider crab (*Maja crispata*) chitosan incorporated with *Spirulina* extract. *International Journal of Biological Macromolecules*, *105*, 1464–1472. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.07.046>
- Bankova V.S., De Castro S.L., M. M. C. (2000). Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. *Apidologie*, *31*, 3–15. <https://doi.org/10.1111/j.1475-6765.1992.tb00316.x>
- Bankova, Vassya; (2005). Chemical diversity of propolis and the problem of standardization. *Journal of Ethnopharmacology*, *100*, 114–117. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2005.05.004>
- Bankova, Vassya; Bertelli, D., Borba, R., Conti, B. J., Cunha, I. B. da S., Danert, C., Eberlin, M. N., Falcão, S. I. ., Isla, M. I., Moreno, M. I. N., Papotti, G., Popova, M., Santiago, K. B., Salas, A., Sawaya, A. C. H. F., Schwab, N. V., Sforcin, J. M., Simone-Finstrom, M., Spivak, M., ... Zampini, C. (2019). Standard methods for *Apis mellifera* propolis research. *Journal of Apicultural Research*, *58*, 1–49. <https://doi.org/10.1080/00218839.2016.1222661>
- Bankova, Vassya;, Popova, M., Bogdanov, S., & Sabatini, A. G. (2002). Chemical composition of European propolis: Expected and unexpected results. *Zeitschrift Fur Naturforschung - Section C Journal of Biosciences*, *57*, 530–533. <https://doi.org/10.1515/znc-2002-5-622>

- Bankova, Vassya, Popova, M., & Trusheva, B. (2016). New emerging fields of application of propolis. *Macedonian Journal of Chemistry and Chemical Engineering*, *35*, 1–11. <https://doi.org/10.20450/mjccce.2016.864>
- Bastarrachea, L., Dhawan, S., & Sablani, S. S. . (2011). Engineering Properties of Polymeric-Based Antimicrobial Films for Food Packaging. *Food Engineering Reviews*, *3*, 79–93. <https://doi.org/10.1007/s12393-011-9034-8>
- Bekiroglu, H., & Sagdic, O. (2018). Antimicrobial activity of different monofloral bee pollens against foodborne pathogens. *Journal of Biotechnology*, *280*. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2018.06.205>
- Bellaaj, O. G., Hajji, S., Younes, I., Chaabouni, M., Nasri, M., & Jellouli, K. (2013). Optimization of chitin extraction from shrimp waste with *Bacillus pumilus* A1 using response surface methodology. *International Journal of Biological Macromolecules*, *61*, 243–250. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2013.07.001>
- Benhabiles, M. S., Salah, R., Lounici, H., Drouiche, N., Goosen, M. F. A., & Mameri, N. (2012). Antibacterial activity of chitin, chitosan and its oligomers prepared from shrimp shell waste. *Food Hydrocolloids*, *29*, 48–56. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2012.02.013>
- Birolli, W. G., Delezuk, J. A. D. M., & Campana-Filho, S. P. (2016). Ultrasound-assisted conversion of alpha-chitin into chitosan. *Applied Acoustics*, *103*, 239–242. <https://doi.org/10.1016/j.apacoust.2015.10.002>
- Bitencourt, C. M., Fávaro-Trindade, C. S., Sobral, P. J. A., & Carvalho, R. A. (2014). Gelatin-based films additivated with curcuma ethanol extract: Antioxidant activity and physical properties of films. *Food Hydrocolloids*, *40*, 145–152. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2014.02.014>
- Bodini, R. B., Sobral, P. J. A., Favaro-Trindade, C. S., & Carvalho, R. A. (2013). Properties of gelatin-based films with added ethanol-propolis extract. *LWT - Food Science and Technology*, *51*, 104–110. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2012.10.013>
- Bodini, R. B., Sobral, P. J. A., Favaro-Trindade, C. S., & Carvalho, R. A. (2013). Properties of gelatin-based films with added ethanol-propolis extract. *LWT - Food Science and Technology*, *51*, 104–110. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2012.10.013>

- Bogdanov, S., & Bankova, V. (2012). Propolis: Origin, Production, Compostion. In *The propolis book: Vol. January ch* (pp. 2–14).
- Bommarco, R., Marini, L., & Vaissière, B. E. (2012). Insect pollination enhances seed yield, quality, and market value in oilseed rape. *Oecologia*, *169*, 1025–1032. <https://doi.org/10.1007/s00442-012-2271-6>
- Bosio, K., Avanzini, C., D'Avolio, A., Ozino, O., & Savoia, D. (2000). In vitro activity of propolis against *Streptococcus pyogenes*. *Letters in Applied Microbiology*, *31*(2), 174–177. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2000.00785.x>
- Broek, L. A. M. van den;, Knoop, R. J. I., Kappen, F. H. J., & Boeriu, C. G. (2015). Chitosan films and blends for packaging material. *Carbohydrate Polymers*, *116*, 237–242. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.07.039>
- Búfalo, M. C., Figueiredo, A. S., Sousa, J. P. B., Candeias, J. M. G., Bastos, J. K., & Sforcin, J. M. (2009). Anti-poliovirus activity of *Baccharis dracunculifolia* and propolis by cell viability determination and real-time PCR. *Journal of Applied Microbiology*, *107*, 1669–1680. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04354.x>
- Caravaca, A. M. G., Romero, M. G., Román, D. A., Carretero, A. S., & Gutiérrez, A. F. (2006). Advances in the analysis of phenolic compounds in products derived from bees. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, *41*, 1220–1234. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2006.03.002>
- Carballo, G. L., Estaca, J. G., Catalá, R., Muñoz, P. H., & Gavara, R. (2012). Active antimicrobial food and beverage packaging. In *Emerging Food Packaging Technologies*. Woodhead Publishing Limited. <https://doi.org/10.1533/9780857095664.1.27>
- Casariego, A., Souza, B. W. S., Vicente, A. A., Teixeira, J. A., Cruz, L., & Díaz, R. (2008). Chitosan coating surface properties as affected by plasticizer, surfactant and polymer concentrations in relation to the surface properties of tomato and carrot. *Food Hydrocolloids*, *22*, 1452–1459. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2007.09.010>
- Castaldo, S., & Capasso, F. (2002). Propolis, an old remedy used in modern medicine. *Fitoterapia*, *73*, 1–6. [https://doi.org/10.1016/S0367-326X\(02\)00185-5](https://doi.org/10.1016/S0367-326X(02)00185-5)

- Cerqueira, M. A., Souza, B. W. S., Teixeira, J. A., & Vicente, A. A. (2012). Food Hydrocolloids Effect of glycerol and corn oil on physicochemical properties of polysaccharide films: A comparative study. *Food Hydrocolloids*, *27*, 175–184. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2011.07.007>
- Chaudhary, S., Kumar, S., Kumar, V., & Sharma, R. (2020). Chitosan nanoemulsions as advanced edible coatings for fruits and vegetables: Composition, fabrication and developments in last decade. *International Journal of Biological Macromolecules*, *152*, 154–170. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.02.276>
- Chawla, R., Sivakumar, S., & Kaur, H. (2021). Antimicrobial edible films in food packaging : Current scenario and recent nanotechnological advancements- a review. *Carbohydrate Polymer Technologies and Applications*, *2*, 100024. <https://doi.org/10.1016/j.carpta.2020.100024>
- Chen, S., Jiang, S., & Jiang, H. (2020). A review on conversion of crayfish-shell derivatives to functional materials and their environmental applications. *Journal of Bioresources and Bioproducts*, *5*, 238–247. <https://doi.org/10.1016/j.jobab.2020.10.002>
- Correa-Pacheco, Z. N., Bautista-Baños, S., Ramos-García, M. de L., Martínez-González, M. del C., & Hernández-Romano, J. (2019). Physicochemical characterization and antimicrobial activity of edible propolis-chitosan nanoparticle films. *Progress in Organic Coatings*, *137*, 105326. <https://doi.org/10.1016/j.porgcoat.2019.105326>
- Correa, F. T., Souza, A. C., Júnior, E. A. de S., Isidoro, S. R., Piccoli, R. H., Dias, D. R., & Abreu, L. R. (2019). Effect of Brazilian green propolis on microorganism contaminants of surface of Gorgonzola-type cheese. *Journal of Food Science and Technology*, *56*, 1978–1987. <https://doi.org/10.1007/s13197-019-03664-2>
- Correia, A. M., & O. Ferreira. (1995). Burrowing behavior of the introduced red swamp crayfish *Procambarus clarkii* (Decapoda: Cambaridae) in Portugal. *Journal of Crustacean Biology*, *15*, 248–257.
- Cuesta-Rubio, O., Frontana-Urbe, B. A., Ramirez-Apan, T., & Cardenas, J. (2002). Polyisoprenylated Benzophenones in Cuban Propolis; Biological Activity of Nemorosone. *Zeitschrift Fur Naturforschung - Section C Journal of Biosciences*,

57, 372–378. <https://doi.org/10.1515/znc-2002-3-429>

- Díaz, C. F., Rivero, G. M., & Ríos Giráldez J. (2016). *Red swampcrawfish: Guadalquivir delta. Fishsource – sustainable fisheries partnership*. FishSoucer.
- Dilarri, G., Mendes, C. R., & Martins, A. O. (2016). Síntese de biofilmes de Quitosana reticulados com Tripolifosfato atuando como agente quelante na fixação de nanopartículas de Prata. *Ciência & Engenharia*, 25, 97–103. <https://doi.org/10.14393/19834071.2016.27704>
- Dobrowolski, J. W., Vohora, S. B., Sharma, K., Shah, S. A., Naqvi, S. A. H., & Dandiya, P. C. (1991). Antibacterial, antifungal, antiamebic, antiinflammatory and antipyretic studies on propolis bee products. *Journal of Ethnopharmacology*, 35, 77–82. [https://doi.org/10.1016/0378-8741\(91\)90135-Z](https://doi.org/10.1016/0378-8741(91)90135-Z)
- Dorazio B.; (2017). *As abelhas e seus produtos*. G1 - Globo.
- Dou, B., Dupont, V., Williams, P. T., Chen, H., & Ding, Y. (2009). Thermogravimetric kinetics of crude glycerol. *Bioresource Technology*, 100, 2613–2620. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.11.037>
- Duan, J., Wu, R., Strik, B. C., & Zhao, Y. (2011). Effect of edible coatings on the quality of fresh blueberries (Duke and Elliott) under commercial storage conditions. *Postharvest Biology and Technology*, 59, 71–79. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2010.08.006>
- Duman, F., & Kaya, M. (2016). Crayfish chitosan for microencapsulation of coriander (*Coriandrum sativum* L.) essential oil. *International Journal of Biological Macromolecules*, 92, 125–133. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.06.068>
- Ebadi, Z., Khodanazary, A., Hosseini, S. M., & Zanguee, N. (2019). The shelf life extension of refrigerated *Nemipterus japonicus* fillets by chitosan coating incorporated with propolis extract. *International Journal of Biological Macromolecules*, 139, 94–102. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.07.204>
- Elbaz, N. M., Khalil, I. A., Abd-Rabou, A. A., & El-Sherbiny, I. M. (2016). Chitosan-based nano-in-microparticle carriers for enhanced oral delivery and anticancer activity of propolis. *International Journal of Biological Macromolecules*, 92, 254–269. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.07.024>

- Eslam Header, Abd El-Monem Hashish, Naser ElSawy, A. A.-K., & Mohamed, E.-B. and. (2016). Gastroprotective effects of dietary honey against acetylsalicylate induced experimental gastric ulcer in albino rats. *Life Science*, *13*, 42–47. <https://doi.org/10.7537/marslsj13011607.Key>
- Eva Crane. (1970). Bee Products. In Mizrahi A., Lensky Y. *Bee World* (Vol. 51). <https://doi.org/10.1080/0005772x.1970.11097308>
- Ezgi, K., Torlak, E., & Erim, F. B. (2021). International Journal of Biological Macromolecules Preparation and characterization of antibacterial nano cerium oxide / chitosan / hydroxyethylcellulose / polyethylene glycol composite films. *International Journal of Biological Macromolecules*, *177*, 351–359. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.02.139>
- Fakhouri, F. M., Martelli, S. M., Caon, T., Velasco, J. I., & Mei, L. H. I. (2015). Edible films and coatings based on starch/gelatin: Film properties and effect of coatings on quality of refrigerated Red Crimson grapes. *Postharvest Biology and Technology*, *109*, 57–64. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2015.05.015>
- Falcão, S. (2013). *Chemical Composition of Portuguese Propolis Bioactive Properties*. 36–37.
- Falcão, S. I., Calhella, R. C., Touzani, S., Lyoussi, B., Ferreira, I. C. F. R., & Vilas-Boas, M. (2019). In vitro interactions of moroccan propolis phytochemical's on human tumor cell lines and anti-inflammatory properties. *Biomolecules*, *9*(8). <https://doi.org/10.3390/biom9080315>
- Falcão, S. I., Vale, N., Gomes, P., Domingues, M. R. M., Freire, C., Cardoso, S. M., & Vilas-Boas, M. (2013). Phenolic profiling of Portuguese propolis by LC-MS spectrometry: Uncommon propolis rich in flavonoid glycosides. *Phytochemical Analysis*, *24*(4), 309–318. <https://doi.org/10.1002/pca.2412>
- Falcão, S. I., Vilas-Boas, M., Estevinho, L. M., Barros, C., Domingues, M. R. M., & Cardoso, S. M. (2010). Phenolic characterization of Northeast Portuguese propolis: Usual and unusual compounds. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, *396*(2), 887–897. <https://doi.org/10.1007/s00216-009-3232-8>
- Fang, S. W., Li, C. F., & Shih, D. Y. C. (1994). Antifungal Activity of Chitosan and Its Preservative Effect on Low-Sugar Candied Kumquat. *Journal of Food Protection*,

57, 136–140. <https://doi.org/10.4315/0362-028x-57.2.136>

- FDA. (2005). *US Food and Drugs Administration*. Center for Food Safety and Applied Nutrition, U.S. Agency Response Letter GRAS Notice No. GRN 170.
- Ferrer, J., Paez, G., Marmol, Z., Ramones, E., Garcia, H., & Forster, C. F. (1996). Acid hydrolysis of shrimp-shell wastes and the production of single cell protein from the hydrolysate. *Bioresource Technology*, 57, 55–60. [https://doi.org/10.1016/0960-8524\(96\)00057-0](https://doi.org/10.1016/0960-8524(96)00057-0)
- Finstrom, M. S., & Spivak, M. (2010). Propolis and bee health: The natural history and significance of resin use by honey bees. *Apidologie*, 41(3), 295–311. <https://doi.org/10.1051/apido/2010016>
- Francesca Gherardi. (2006). Crayfish invading Europe: the case study of *Procambarus clarkii*. In *Marine and Freshwater Behaviour and Physiology* (pp. 39:3, 175–191). <https://doi.org/10.1080/10236240600869702>
- Fratellone, P. M. (2015). Apitherapy Products for Medicinal Use. *Journal of Nutrition & Food Sciences*, 05, 6–7. <https://doi.org/10.4172/2155-9600.1000423>
- Galus, S., & Kadzińska, J. (2016). Whey protein edible films modified with almond and walnut oils. *Food Hydrocolloids*, 52, 78–86. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2015.06.013>
- Gardesh A. S. K. Badii, F., Hashemi, M., Ardakani, A. Y., Maftoonazad, N., & Gorji, A. M. . (2016). Effect of nanochitosan based coating on climacteric behavior and postharvest shelf-life extension of apple cv. Golab Kohanz. *LWT - Food Science and Technology*, 70, 33–40. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.02.002>
- Garedew, A., Schmolz, E., & Lamprecht, I. (2003). Microcalorimetric and respirometric investigation of the effect of temperature on the antiviral action of the natural bee product-propolis. *Thermochimica Acta*, 399, 171–180. [https://doi.org/10.1016/S0040-6031\(02\)00453-7](https://doi.org/10.1016/S0040-6031(02)00453-7)
- Genersch, E., Ashiralieva, A., & Fries, I. (2005). Strain- and genotype-specific differences in virulence of *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae*, a bacterial pathogen causing American foulbrood disease in honeybees. *Applied and Environmental Microbiology*, 71, 7551–7555. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.11.7551->

- Gol, N. B., Patel, P. R., & Rao, T. V. R. (2013). Improvement of quality and shelf-life of strawberries with edible coatings enriched with chitosan. *Postharvest Biology and Technology*, *85*, 185–195. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2013.06.008>
- Gomes, J., Barbosa, J., & Teixeira, P. (2021). The Inhibitory Concentration of Natural Food Preservatives May Be Biased by the Determination Methods. *Foods*, *10*, 1009. <https://doi.org/10.3390/foods10051009>
- Guo, M., Ma, Y., Wang, C., Liu, H., Li, Q., & Fei, M. (2015). Synthesis, anti-oxidant activity, and biodegradability of a novel recombinant polysaccharide derived from chitosan and lactose. *Carbohydrate Polymers*, *118*, 218–223. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.11.027>
- Hamed, I., Özogul, F., & Regenstein, J. M. (2016). Industrial applications of crustacean by-products (chitin, chitosan, and chitooligosaccharides): A review. *Trends in Food Science and Technology*, *48*, 40–50. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2015.11.007>
- Han, J. H. (2013). Edible Films and Coatings: A Review. In *Innovations in Food Packaging: Second Edition*. Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394601-0.00009-6>
- Hassan, B., Chatha, S. A. S., Hussain, A. I., Zia, K. M., & Akhtar, N. (2018). Recent advances on polysaccharides, lipids and protein based edible films and coatings: A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, *109*, 1095–1107. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.11.097>
- Holdich, D. M., Reynolds, J. D., Souty-Grosset, C., & Sibley, P. J. (2009). A review of the ever increasing threat to European crayfish from non-indigenous crayfish species. *Knowledge and Management of Aquatic Ecosystems*, *2009*, 394–395. <https://doi.org/10.1051/kmae/2009025>
- Hoque, M. S., Benjakul, S., & Prodpran, T. (2011). Properties of film from cuttlefish (*Sepia pharaonis*) skin gelatin incorporated with cinnamon, clove and star anise extracts. *Food Hydrocolloids*, *25*(5), 1085–1097. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2010.10.005>

- Horvitz, S., Chanaguano, D., & Arozarena, I. (2017). Andean blackberries (*Rubus glaucus* Benth) quality as affected by harvest maturity and storage conditions. *Scientia Horticulturae*, *226*, 293–301.
<https://doi.org/10.1016/j.scienta.2017.09.002>
- Hosseinnejad, M., & Jafari, S. M. (2016). Evaluation of different factors affecting antimicrobial properties of chitosan. *International Journal of Biological Macromolecules*, *85*, 467–475. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.01.022>
- Huang, W., Xu, H., Xue, Y., Huang, R., Deng, H., & Pan, S. (2012). Layer-by-layer immobilization of lysozyme-chitosan-organic rectorite composites on electrospun nanofibrous mats for pork preservation. *Food Research International*, *48*, 784–791. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.06.026>
- Ishida, V. F. de C., Negri, G., Salatino, A., & Bandeira, M. F. C. L. . (2011). A new type of Brazilian propolis: Prenylated benzophenones in propolis from Amazon and effects against cariogenic bacteria. *Food Chemistry*, *125*, 966–972.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.09.089>
- Islam, M. S., Khan, S., & Tanaka, M. (2004). Waste loading in shrimp and fish processing effluents: Potential source of hazards to the coastal and nearshore environments. *Marine Pollution Bulletin*, *49*, 103–110.
<https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2004.01.018>
- ISO 21527-1:2008. (n.d.). *Microbiology of food and animal feeding stuffs — Horizontal method for the enumeration of yeasts and moulds — Part 1: Colony count technique in products with water activity greater than 0,95*No Title.
- ISO 4833-1:2013. (2013). *Microbiology of the food chain — Horizontal method for the enumeration of microorganisms — Part 1: Colony count at 30 °C by the pour plate technique.*
- ISO 6887-1:2017. (n.d.). *Microbiology of the food chain — Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination — Part 1: General rules for the preparation of the initial suspension and decimal dilutions.*
- Jeon, Y.-J., Janak, Y. V. A. K., & Fereidoon, S. (2002). Chitosan as an Edible Invisible Film for Quality Preservation of Herring and Atlantic Cod. *Journal of Agricultural*

and *Food Chemistry*, 50,18, 5167–5178. <https://doi.org/10.1021/jf0116931>

- Kaškonienė, V., Adaškevičiūtė, V., Kaškonas, P., Mickienė, R., & Maruška, A. (2020). Antimicrobial and antioxidant activities of natural and fermented bee pollen. *Food Bioscience*, 34. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2020.100532>
- Kaya, M., Khadem, S., Cakmak, Y. S., Mujtaba, M., Ilk, S., Akyuz, L., Salaberria, A. M., Labidi, J., Abdulqadir, A. H., & Deligöz, E. (2018). Antioxidative and antimicrobial edible chitosan films blended with stem, leaf and seed extracts of *Pistacia terebinthus* for active food packaging. *RSC Advances*, 8(8), 3941–3950. <https://doi.org/10.1039/c7ra12070b>
- Kaya, M., Sargin, I., Aylanc, V., Tomruk, M. N., Gevrek, S., Karatoprak, I., Colak, N., Sak, Y. G., & Bulut, E. (2016). Comparison of bovine serum albumin adsorption capacities of α -chitin isolated from an insect and β -chitin from cuttlebone. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 38, 146–156. <https://doi.org/10.1016/j.jiec.2016.04.015>
- Khalil, H. P. S. A. ., Tye, Y. Y. ., Saurabh, C. K. ., Leh, C. P. ., Lai, T. K. ., Chong, E. W. N. ., Fazita, M. R. N. ., Hafidz, J. M., Banerjee, A. ., & Syakir, M. I. . (2017). Biodegradable polymer films from seaweed polysaccharides: A review on cellulose as a reinforcement material. *Express Polymer Letters*, 11, 244–265. <https://doi.org/10.3144/expresspolymLett.2017.26>
- Khan, S. U., Anjum, S. I., Rahman, K., Ansari, M. J., Khan, W. U., Kamal, S., Khattak, B., Muhammad, A., & Khan, H. U. (2018). Honey: Single food stuff comprises many drugs. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 25, 320–325. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2017.08.004>
- Kittur, F. S., Kumar, K. R., & Tharanathan, R. N. (1998). Functional packaging properties of chitosan films. *European Food Research and Technology*, 206, 44–47. <https://doi.org/10.1007/s002170050211>
- Koc, B., Akyuz, L., Cakmak, Y. S., Sargin, I., Salaberria, A. M., Labidi, J., Ilk, S., Cekic, F. O., Akata, I., & Kaya, M. (2020). Production and characterization of chitosan-fungal extract films. *Food Bioscience*, 35, 100545. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2020.100545>
- Kouba, A., Petrusek, A., & Kozák, P. (2014). Continental-wide distribution of crayfish

species in Europe: Update and maps. *Knowledge and Management of Aquatic Ecosystems*, 413. <https://doi.org/10.1051/kmae/2014007>

- Kumar, S., Mukherjee, A., & Dutta, J. (2020). Trends in Food Science & Technology Chitosan based nanocomposite films and coatings : Emerging antimicrobial food packaging alternatives. *Trends in Food Science & Technology*, 97, 196–209. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.01.002>
- Kumazaki, M., Shinohara, H., Taniguchi, K., Yamada, N., Ohta, S., Ichihara, K., & Akao, Y. (2014). Propolis cinnamic acid derivatives induce apoptosis through both extrinsic and intrinsic apoptosis signaling pathways and modulate of miRNA expression. *Phytomedicine*, 21, 1070–1077. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2014.04.006>
- Kumazawa, S., Hamasaka, T., & Nakayama, T. (2004). Antioxidant activity of propolis of various geographic origins. *Food Chemistry*, 84, 329–339. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(03\)00216-4](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(03)00216-4)
- Kurita, K. (2006). Chitin and chitosan: Functional biopolymers from marine crustaceans. *Marine Biotechnology*, 8, 203–226. <https://doi.org/10.1007/s10126-005-0097-5>
- Laaroussi, H., Bakour, M., Ousaaïd, D., Aboulghazi, A., Ferreira-Santos, P., Genisheva, Z., Teixeira, J. A., & Lyoussi, B. (2020). Effect of antioxidant-rich propolis and bee pollen extracts against D-glucose induced type 2 diabetes in rats. *Food Research International*, 138. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109802>
- Leceta, I., Molinaro, S., Guerrero, P., Kerry, J. P., & De la Caba, K. (2015). Quality attributes of map packaged ready-to-eat baby carrots by using chitosan-based coatings. *Postharvest Biology and Technology*, 100, 142–150. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2014.09.022>
- Li, Z., Lin, S., An, S., Liu, L., Hu, Y., & Wan, L. (2019). Preparation, characterization and anti-aflatoxigenic activity of chitosan packaging films incorporated with turmeric essential oil. *International Journal of Biological Macromolecules*, 131, 420–434. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.02.169>
- Limam, Z., Selmi, S., Sadok, S., & El Abed, A. (2011). Extraction and characterization of chitin and chitosan from crustacean by-products: Biological and

- physicochemical properties. *African Journal of Biotechnology*, *10*, 640–647.
<https://doi.org/10.5897/AJB10.209>
- Lin, Y., Zhang, M., Wang, L., Lin, T., Wang, G., Peng, J., & Su, S. (2020). The in vitro and in vivo wound-healing effects of royal jelly derived from *Apis mellifera* L. during blossom seasons of *Castanea mollissima* Bl. and *Brassica napus* L. in South China exhibited distinct patterns. *BMC Complementary Medicine and Therapies*, *20*, 1–13. <https://doi.org/10.1186/s12906-020-03138-5>
- Loebler, M., Duarte, P., & Cruz, A. (2018). Aplicação de extratos de própolis para conservação pós-colheita de morangos. *Vida Rural*, 38–40.
- Loron, C. C., François, C., Rainbird, R. H., Turner, E. C., Borensztajn, S., & Javaux, E. J. (2019). Early fungi from the Proterozoic era in Arctic Canada. *Nature*, *570*, 232–235. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1217-0>
- Luo, Y., & Wang, Q. (2013). Recent Advances of Chitosan and Its Derivatives for Novel Applications in Food Science Beverages. *Journal of Food Processing & Beverages*, *1*, 1–13. <http://www.avensonline.org/wp-content/uploads/JFPB-2332-4104-01-0002.pdf%5Cnhttp://www.avensonline.org/fulltextarticles/JFPB-2332-4104-01-0002.htmL>
- Ma, Q., Zhang, Y., Critzer, F., Davidson, P. M., Zivanovic, S., & Zhong, Q. (2015). Physical, mechanical, and antimicrobial properties of chitosan films with microemulsions of cinnamon bark oil and soybean oil. *Food Hydrocolloids*, *52*, 533–542. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2015.07.036>
- Malhotra, B., Keshwani, A., & Kharkwal, H. (2015). Antimicrobial food packaging: Potential and pitfalls. *Frontiers in Microbiology*, *6*, 1–9.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00611>
- Marcucci, M. (1995). Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity. *Apidologie*, *26*, 83–99.
<https://doi.org/10.1051/apido:19950202>
- Martinotti, S., & Ranzato, E. (2015). Propolis: a new frontier for wound healing? *Burns & Trauma*, *3*, 1–7. <https://doi.org/10.1186/s41038-015-0010-z>
- Martins, J. T., Cerqueira, M. A., & Vicente, A. A. (2012). Influence of α -tocopherol on

- physicochemical properties of chitosan-based films. *Food Hydrocolloids*, 27(1), 220–227. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2011.06.011>
- Martins, P. M., Balcão, V., & Nunes, B. (2009). Caracterização e valorização do lagostim *Procambarus clarkii*. *Revista Da Faculdade de Ciências Da Saúde*, 6, 110–122.
- Matheson, A. (1993). *World Bee Health Report, Bee World*. <https://doi.org/10.1080/0005772X.1993.11099183>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.08.267>
- Mignet, N., Seguin, J., & Chabot, G. G. . (2013). Bioavailability of polyphenol liposomes: A challenge ahead. *Pharmaceutics*, 5, 457–471. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics5030457>
- Ministério da Agricultura, do D. R. e das P. (1998). Decreto-Lei n° 94/98 de 15 de Abril. *Diário Da República n.º 88/1998, Série I-A de 1998-04-15*.
- Missima, F., Pagliarone, A. C., Orsatti, C. L., Araújo, J. P., & Sforcin, J. M. (2010). The Effect of propolis on Th1/Th2 cytokine expression and production by melanoma-bearing mice submitted to stress. *Phytotherapy Research*, 24, 1501–1507. <https://doi.org/10.1002/ptr.3142>
- Miteluț, A. C., Tănase, E., Popa, V. I., & Popa, M. E. (2015). Sustainable Alternative for Food Packaging: Chitosan Biopolymer-a Review. *AgroLife Scientific Journal*, 4.
- MLalila, N., Hilonga, A., Swai, H., Devlieghere, F., & Ragaert, P. (2018). Antimicrobial packaging based on starch, poly(3-hydroxybutyrate) and poly(lactic-co-glycolide) materials and application challenges. *Trends in Food Science and Technology*, 74, 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.01.015>
- Moreno, M. A., Vallejo, A. M., Ballester, A. R., Zampini, C., Isla, M. I., López-Rubio, A., & Fabra, M. J. (2020). Antifungal edible coatings containing Argentinian propolis extract and their application in raspberries. *Food Hydrocolloids*, 107.

<https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.105973>

- Moura, C. M., Moura, J. M., Soares, N. M., & Pinto, L. A. de A. (2011). Evaluation of molar weight and deacetylation degree of chitosan during chitin deacetylation reaction: Used to produce biofilm. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, *50*, 351–355. <https://doi.org/10.1016/j.cep.2011.03.003>
- Münstedt, K., & Männle, H. (2019). Using bee products for the prevention and treatment of oral mucositis induced by cancer treatment. *Molecules*, *24*. <https://doi.org/10.3390/molecules24173023>
- Nair, M. S., Tomar, M., Punia, S., Kukula-Koch, W., & Kumar, M. (2020). Enhancing the functionality of chitosan- and alginate-based active edible coatings/films for the preservation of fruits and vegetables: A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, *164*, 304–320. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.07.083>
- Nessa, F., Masum, S., Asaduzzaman, M., & Roy, S. K. (2010). BCSIR A Process for the Preparation of Chitin and Chitosan from Prawn Shell Waste. *Bangladesh Journal Of Scientific And Industrial Research*, *45*, 323–330.
- Ngo, D. H., & Kim, S. K. (2014). Antioxidant effects of chitin, chitosan, and their derivatives. In *Advances in Food and Nutrition Research* (1st ed., Vol. 73). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800268-1.00002-0>
- No, H. K. ., Meyers, S. P. ., Prinyawiwatkul, W. ., & Xu, Z. . (2007). Applications of chitosan for improvement of quality and shelf life of foods: A review. *Journal of Food Science*, *72*. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2007.00383.x>
- Norajit, K., Kim, K. M., & Ryu, G. H. (2010). Comparative studies on the characterization and antioxidant properties of biodegradable alginate films containing ginseng extract. *Journal of Food Engineering*, *98*, 377–384. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2010.01.015>
- Núñez, Jesús R. Rodríguez; Santana, Tomás J. Madera; Machado, Dalia I. Sánchez; Cervantes, J. L., & Valdez, H. S. (2014). Chitosan / Hydrophilic Plasticizer-Based Films : Preparation , Physicochemical and Antimicrobial Properties. *Journal of Polymers and the Environment*, 41–51. <https://doi.org/10.1007/s10924-013-0621-z>
- Ojagh, S. M., Rezaei, M., Razavi, S. H., & Hosseini, S. M. H. (2010). Development and

- evaluation of a novel biodegradable film made from chitosan and cinnamon essential oil with low affinity toward water. *Food Chemistry*, 122(1), 161–166. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.02.033>
- Pacheco, Z. N. C., Baños, S. B., García, M. de L. R., González, M. del C. M., & Romano, J. H. (2019). Progress in Organic Coatings Physicochemical characterization and antimicrobial activity of edible propolis-chitosan nanoparticle films. *Progress in Organic Coatings*, 137, 105326. <https://doi.org/10.1016/j.porgcoat.2019.105326>
- Park, Y. K., Koo, M. H., Abreu, J. A. S., Ikegaki, M., Cury, J. A., & Rosalen, P. L. (1998). Antimicrobial Activity of Propolis on Oral Microorganisms. *Current Microbiology*, 36, 24–28. <https://doi.org/10.17485/ijst/2015/v8i36/89174>
- 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*. <https://doi.org/10.1155/2017/1259510>
- Peng, Q., Nunes, L. M., Greenfield, B. K., Dang, F., & Zhong, H. (2016). Are Chinese consumers at risk due to exposure to metals in crayfish? A bioaccessibility-adjusted probabilistic risk assessment. *Environmental International*, 88, 261–268. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2015.12.035>
- Rao, M. S., Kanatt, S. R., Chawla, S. P., & Sharma, A. (2010). Chitosan and guar gum composite films: Preparation, physical, mechanical and antimicrobial properties. *Carbohydrate Polymers*, 82(4), 1243–1247. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.06.058>
- Relier, Ä. P. G., & Ardon, P. A. P. (2004). Antimicrobial and Physicochemical Properties of Chitosan – HPMC-Based Films. *Agricultural and Food Chemistry*, 52, 21, 6585–6591. <https://doi.org/10.1021/jf0306690>
- Rinaudo, M. (2006). Chitin and chitosan: Properties and applications. *Progress in Polymer Science (Oxford)*, 31, 603–632. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2006.06.001>
- Robles, A. F., Ricardo, M. A., & Flores, D. G. (2021). Encapsulation of phenolic compounds with liposomal improvement in the cosmetic industry. *International*

Journal of Pharmaceutics, 593, 120–125.

<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2020.120125>

- Rodrigues, V. (2016). Biomateriais de quitosana/gelatina com resina de jatobá: influência do grau de acetilação da quitosana e da inclusão da resina. *Dissertação Apresentada Ao Instituto de Química de São Carlos Da Universidade de São Paulo*.
- Romanazzi, G., Nigro, F., Ippolito, A., DiVenere, D., & Salerno, M. (2002). Effects of Pre- and Postharvest Chitosan Treatments to Control Storage Grey Mold of Table Grapes. *Food Science*, 67, 1862–1867.
- Rufato, K. B., Galdino, J. P., Ody, K. S., Pereira, A. G. B., Corradini, E., Martins, Alessandro F.; Paulino, A. T., Fajardo, A. R., Aouada, F. A., La Porta, F. A., Rubira, A. F., & Muniz, E. C. (2018). Hydrogels Based on Chitosan and Chitosan Derivatives for Biomedical Applications. *Hydrogels - Smart Materials for Biomedical Applications*. <https://doi.org/10.5772/intechopen.81811>
- Safaei, M., & Roosta Azad, R. (2020). Preparation and characterization of poly-lactic acid based films containing propolis ethanolic extract to be used in dry meat sausage packaging. *Journal of Food Science and Technology*, 57, 1242–1250. <https://doi.org/10.1007/s13197-019-04156-z>
- Sathivel, S., Liu, Q., Huang, J., & Prinyawiwatkul, W. (2007). The influence of chitosan glazing on the quality of skinless pink salmon (*Oncorhynchus gorbuscha*) fillets during frozen storage. *Journal of Food Engineering*, 83(3), 366–373. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2007.03.009>
- Sforcin, J. M. (2007). Propolis and the immune system: a review. *Journal of Ethnopharmacology*, 113(1), 1–14. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2007.05.012>
- Shahbazi, Y. (2017). The properties of chitosan and gelatin films incorporated with ethanolic red grape seed extract and *Ziziphora clinopodioides* essential oil as biodegradable materials for active food packaging. *International Journal of Biological Macromolecules*, 99, 746–753. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.03.065>
- Sharif, Z. I. M., Mustapha, F. A., Jai, J., Yusof, N. M., & Zali, N. A. M. (2017). Revisión de métodos de preservación y conservantes naturales para extender la

- longevidad de los alimentos. *Ingeniería Química ...*, 19, 145–153.
<https://www.banglajol.info/index.php/CERB/article/view/33809>
- Shimanuki, H. (1980). *Diseases and pests of honey bees. In Bee Keeping Keeping in the United States; Science and Education Administration, United States Department of Agriculture*. 335, 118–128.
- Siavash, M., Shokri, S., Haghighi, S., Shahtalebi, M. A., & Farajzadehgan, Z. (2015). The efficacy of topical royal jelly on healing of diabetic foot ulcers: A double-blind placebo-controlled clinical trial. *International Wound Journal*, 12(2), 137–142. <https://doi.org/10.1111/iwj.12063>
- Silici, S., & Kutluca, S. (2005). Chemical composition and antibacterial activity of propolis collected by three different races of honeybees in the same region. *Journal of Ethnopharmacology*, 99(1), 69–73. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2005.01.046>
- Silva, V. C., Silva, A. M. G. S., Bas, J. A. D., Xavier, J. A., Nascimento, T. G., Naal, R. M. Z. G., Perpetua, M., Leonelo, L. A. D., Mergulh, N. L. O. N., Maranh, F. C. A., Silva, D. M. W., Owen, R., Duarte, I. F. B., Bulh, L. C. G., Bas, I. D., & Goulart, O. F. (2020). *Constituents , Topical Membrane Formulations and*.
- Siripatrawan & Vitchayakitti, W. (2016). Improving functional properties of chitosan films as active food packaging by incorporating with propolis. *Food Hydrocolloids*, 61, 695–702. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.06.001>
- Siripatrawan, Vitchayakitti, W., & Sanguandeeikul, R. (2013). Antioxidant and antimicrobial properties of Thai propolis extracted using ethanol aqueous solution. *International Journal of Food Science and Technology*, 48, 22–27.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2012.03152.x>
- Sofi, S. A., Singh, J., Rafiq, S., Ashraf, U., Dar, B. N., & Nayik, G. A. (2018). A comprehensive review on antimicrobial packaging and its use in food packaging. In *Current Nutrition and Food Science* (pp. 14, 305–312).
<https://doi.org/10.2174/1573401313666170609095732>
- Sohrabi, F., Jamali, F., Morammazi, S., Saber, M., & Kamita, S. G. (2019). Evaluation of the compatibility of entomopathogenic fungi and two botanical insecticides tondexir and palizin for controlling *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae). *Crop Protection*, 117(November 2018), 20–25.

<https://doi.org/10.1016/j.cropro.2018.11.012>

Sothornvit, R., & Krochta, J. M. . (2005). Plasticizers in edible films and coatings.

Innovations in Food Packaging, 403–433. <https://doi.org/10.1016/B978-012311632-1/50055-3>

Suriyatem, R., Auras, R. A., Rachtanapun, C., & Rachtanapun, P. (2018).

Biodegradable rice starch/carboxymethyl chitosan films with added propolis extract for potential use as active food packaging. *Polymers*, 10.

<https://doi.org/10.3390/polym10090954>

Thakur, R., Saberi, B., Pristijono, P., Golding, J., Stathopoulos, C., Scarlett, C., Bowyer, M., & Vuong, Q. (2016). Characterization of rice starch-ι-carrageenan

biodegradable edible film. Effect of stearic acid on the film properties.

International Journal of Biological Macromolecules, 93, 952–960.

<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.09.053>

Thamnopoulos, I. A. I. ., Michailidis, G. F. ., Fletouris, D. J. ., Badeka, A., Kontominas,

M. G. ., & Angelidis, A. S. . (2018). Inhibitory activity of propolis against *Listeria monocytogenes* in milk stored under refrigeration. *Food Microbiology*, 73, 168–

176. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2018.01.021>

Tharanathan, R. N. ., & Kittur, F. S. . (2003). Chitin - The Undisputed Biomolecule of

Great Potential. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 43, 61–87.

<https://doi.org/10.1080/10408690390826455>

Torlak, E., & Sert, D. (2013). Antibacterial effectiveness of chitosan-propolis coated

polypropylene films against foodborne pathogens. *International Journal of Biological Macromolecules*, 60, 52–55.

<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2013.05.013>

Tournas, V. H., & Katsoudas, E. (2005). Mould and yeast flora in fresh berries, grapes

and citrus fruits. *International Journal of Food Microbiology*, 105, 11–17.

<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2005.05.002>

Tripathi, S., Mehrotra, G. K., & Dutta, P. K. (2009). Physicochemical and bioactivity of

cross-linked chitosan-PVA film for food packaging applications. *International Journal of Biological Macromolecules*, 45(4), 372–376.

<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2009.07.006>

- Twardochleb, L. A., Olden, J. D., & Larson, E. R. (2013). A global meta-analysis of the ecological impacts of nonnative crayfish. *Freshwater Science*, 32(4), 1367–1382. <https://doi.org/10.1899/12-203.1>
- Vadeboncoeur, Y., Jeppesen, E., Vander Zanden, M. J., Schierup, H. H., Christoffersen, K., & Lodge, D. M. (2003). From Greenland to green lakes: Cultural eutrophication and the loss of benthic pathways in lakes. *Limnology and Oceanography*, 48, 1408–1418. <https://doi.org/10.4319/lo.2003.48.4.1408>
- Vargas, M., Albors, A., Chiralt, A., & González-Martínez, C. (2006). Quality of cold-stored strawberries as affected by chitosan-oleic acid edible coatings. *Postharvest Biology and Technology*, 41(2), 164–171. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2006.03.016>
- Velasquez, B. D., & Montenegro Gómez, S. P. (2017). Actividad antimicrobiana de extractos etanólicos de propóleos obtenidos de abejas *Apis mellifera*. *Revista de Investigación Agraria y Ambiental*, 8(1), 185–193. <https://doi.org/10.22490/21456453.1848>
- Vergara, L. D. P., Cifuentes, M. T. ., Franco, A. P. ., Cervera, C. E. P., & Pizarro, R. D. A. (2020). Development and characterization of edible films based on native cassava starch, beeswax, and propolis. *NFS Journal*, 21, 39–49. <https://doi.org/10.1016/j.nfs.2020.09.002>
- Vermeersch, L. A. F. (2014). Processamento de suspensões aquosas de Beta-quitina por irradiação de ultrassom de alta intensidade: Produção e caracterização de filmes autossustentáveis. *Dissertação Instituto de Química de São Carlos, Da Universidade de São Paulo*.
- Vieira, M. G. A., Silva, M. A., Santos, L. O., & Beppu, M. M. (2011). Natural-based plasticizers and biopolymer films: A review. *European Polymer Journal*, 47, 254–263. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2010.12.011>
- Villaroya, A. L., Espina, L., García-Gonzalo, D., Bayarri, S., Pérez, C., & Pagán, R. (2015). Bioactive properties of a propolis-based dietary supplement and its use in combination with mild heat for apple juice preservation. *International Journal of Food Microbiology*, 205, 90–97. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.03.020>
- Vo, T. S., Ngo, D. H., Kang, K. H., Jung, W. K., & Kim, S. K. (2015). The beneficial

- properties of marine polysaccharides in alleviation of allergic responses. *Molecular Nutrition and Food Research*, 59, 129–138.
<https://doi.org/10.1002/mnfr.201400412>
- Wang, H., Ding, F., Ma, L., & Zhang, Y. (2020). Edible films from chitosan-gelatin: physical properties and food packaging application. *Food Bioscience*, 100871.
<https://doi.org/10.1016/j.fbio.2020.100871>
- Wang, L., Dong, Y., Men, H., Tong, J., & Zhou, J. (2013). Preparation and characterization of active films based on chitosan incorporated tea polyphenols. *Food Hydrocolloids*, 32(1), 35–41. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2012.11.034>
- Weißpflug, J., Vehlow, D., Müller, M., Kohn, B., Scheler, U., Boye, S., & Schwarz, S. (2021). Characterization of chitosan with different degree of deacetylation and equal viscosity in dissolved and solid state – Insights by various complimentary methods. *International Journal of Biological Macromolecules*, 171, 242–261.
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.01.010>
- Willies. (2018). *Willie's Honey Company*.
- Xing, Y., Li, X., Xu, Q., Yun, J., Lu, Y., & Tang, Y. (2011). Effects of chitosan coating enriched with cinnamon oil on qualitative properties of sweet pepper (*Capsicum annuum* L.). *Food Chemistry*, 124, 1443–1450.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.07.105>
- Xu, C.-C., Wang, B., Pu, Y.-Q., Tao, J.-S., & Zhang, T. (2017). Advances in extraction and analysis of phenolic compounds from plant materials. *Chinese Journal of Natural Medicines*, 15, 721–731. [https://doi.org/10.1016/S1875-5364\(17\)30103-6](https://doi.org/10.1016/S1875-5364(17)30103-6)
- Xu, T., Gao, C.-C., Feng, X., Huang, M., Yang, Y., Shen, X., & Tang, X. (2019). Cinnamon and clove essential oils to improve physical, thermal and antimicrobial properties of chitosan-gum arabic polyelectrolyte complexed films. *Carbohydrate Polymers*, 217, 116–125. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.03.084>
- Zahid, N., Ali, A., Manickam, S., Siddiqui, Y., & Maqbool, M. (2012). Potential of chitosan-loaded nanoemulsions to control different *Colletotrichum* spp. and maintain quality of tropical fruits during cold storage. *Journal of Applied Microbiology*, 113, 925–939. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2012.05398.x>

- Zancanela, D. C., Herculano, R. D., Funari, C. S., Marcos, C. M., Almeida, A. M. F., & Guastaldi, A. C. (2017). Physical, chemical and antimicrobial implications of the association of propolis with a natural rubber latex membrane. *Materials Letters*, 209, 39–42. <https://doi.org/10.1016/j.matlet.2017.07.093>
- Zhang, Cen., Li, Y., Wang, P., & Zhang, H. (2020). Electrospinning of nanofibers: Potentials and perspectives for active food packaging. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 19, 479–502. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12536>
- Zhang, Cheng., Wang, Z., Li, Y., Yang, Y., Ju, X., & He, R. (2019). The preparation and physiochemical characterization of rapeseed protein hydrolysate-chitosan composite films. *Food Chemistry*, 272, 694–701. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.08.097>
- Zhang, H., Yang, J., & Zhao, Y. (2015). High intensity ultrasound assisted heating to improve solubility, antioxidant and antibacterial properties of chitosan-fructose Maillard reaction products. *LWT - Food Science and Technology*, 60(1), 253–262. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.07.050>
- Zhang, W., Li, X., & Jiang, W. (2020). Development of antioxidant chitosan film with banana peels extract and its application as coating in maintaining the storage quality of apple. *International Journal of Biological Macromolecules*, 154, 1205–1214. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.10.275>
- Zhang, Y., Xue, C., Xue, Y., Gao, R., & Zhang, X. (2005). Determination of the degree of deacetylation of chitin and chitosan by X-ray powder diffraction. *Carbohydrate Research*, 340, 1914–1917. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2005.05.005>

7. ANEXOS

Anexo A - Avaliação da atividade microbiológica *in vitro* de bactérias, levedura e fungos.

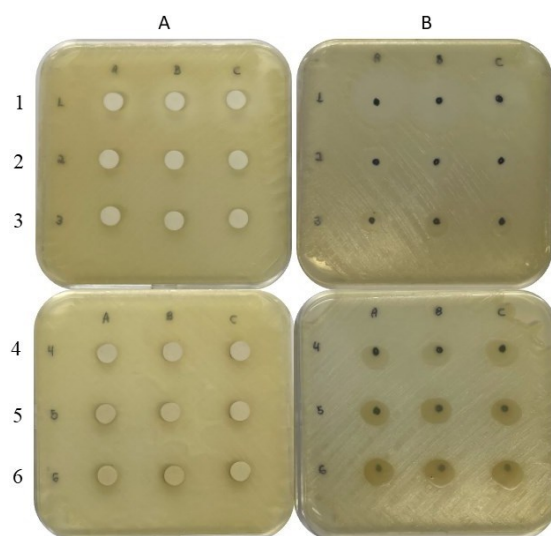


Figura 26 - Atividade antimicrobiana de filmes de própolis *Erwinia* sp. CIMO 21MS006. Colunas: A. Difusão em disco de ágar; B. Difusão em gota de ágar. Linhas: 1. Antifúngico comercial Bayer Teldor (1,5mg/100mL); 2. Controlo negativo; 3. 3. Filme 0%; 4. Filme 5%; 5. Filme 10%; 6. Filme 20% (em triplicado).

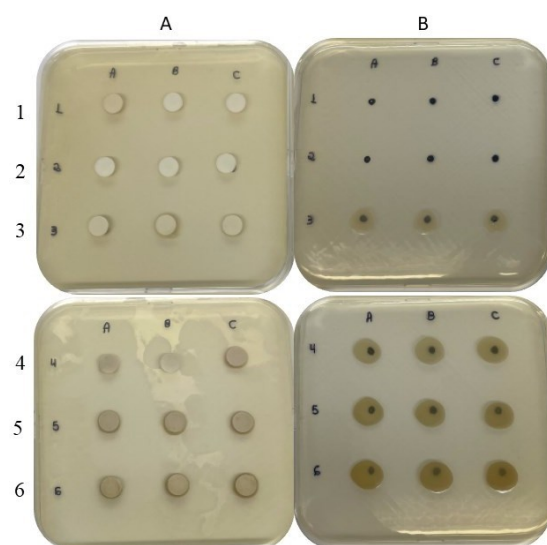


Figura 27 - Atividade antimicrobiana de filmes de própolis *Arthrobacter* sp. CIMO 21MS005. Colunas: A. Difusão em disco de ágar; B. Difusão em gota de ágar. Linhas: 1. Antifúngico comercial Bayer Teldor (1,5mg/100mL); 2. Controlo negativo; 3. 3. Filme 0%; 4. Filme 5%; 5. Filme 10%; 6. Filme 20% (em triplicado).

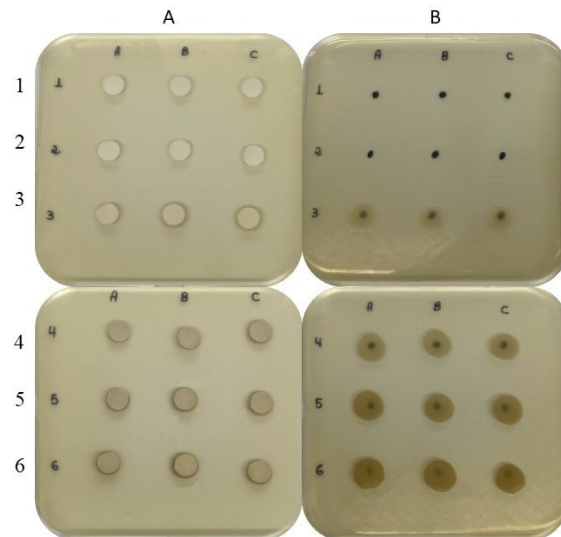


Figura 28 - Atividade antimicrobiana de filmes de própolis *Pantoea* sp. CIMO 21MS004. Colunas: A. Difusão em disco de ágar; B. Difusão em gota de ágar. Linhas: 1. Antifúngico comercial Bayer Teldor (1,5mg/100mL); 2. Controlo negativo; 3. Filme 0%; 4. Filme 5%; 5. Filme 10%; 6. Filme 20% (em triplicado).

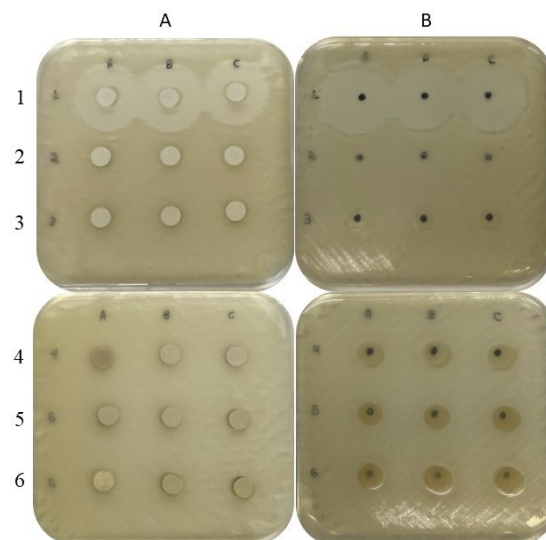


Figura 29 - Atividade antimicrobiana de filmes de própolis *Staphylococcus hominis*. CIMO 21MS001. Colunas: A. Difusão em disco de ágar; B. Difusão em gota de ágar. Linhas: 1. Antifúngico comercial Bayer Teldor (1,5mg/100mL); 2. Controlo negativo; 3. Filme 0%; 4. Filme 5%; 5. Filme 10%; 6. Filme 20% (em triplicado).

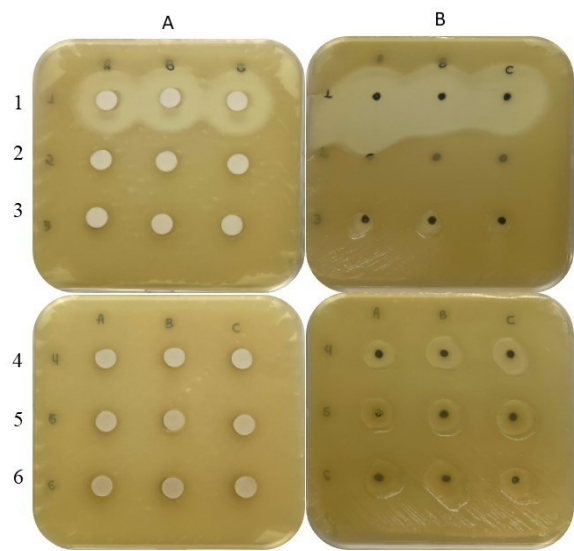


Figura 30 - Atividade antimicrobiana de filmes de própolis *Escherichia coli*. Colunas: A. Difusão em disco de ágar; B. Difusão em gota de ágar. Linhas: 1. Antifúngico comercial Bayer Teldor (1,5mg/100mL); 2. Controlo negativo; 3. Filme 0%; 4. Filme 5%; 5. Filme 10%; 6. Filme 20% (em triplicado).

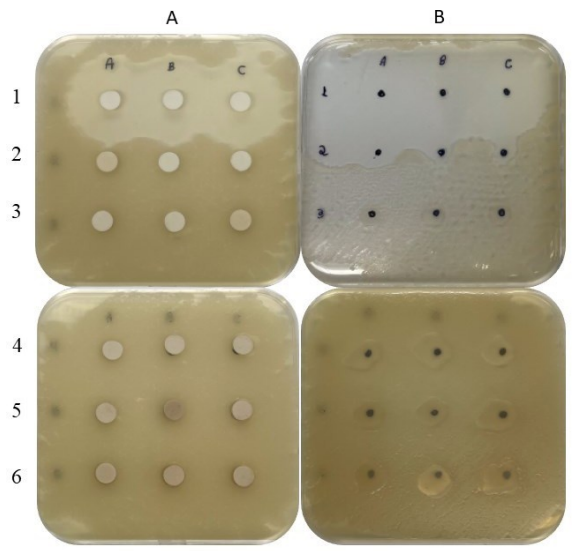


Figura 31 - Atividade antimicrobiana de filmes de própolis *Bacillus cereus*. Colunas: A. Difusão em disco de ágar; B. Difusão em gota de ágar. Linhas: 1. Antifúngico comercial Bayer Teldor (1,5mg/100mL); 2. Controlo negativo; 3. Filme 0%; 4. Filme 5%; 5. Filme 10%; 6. Filme 20% (em triplicado).

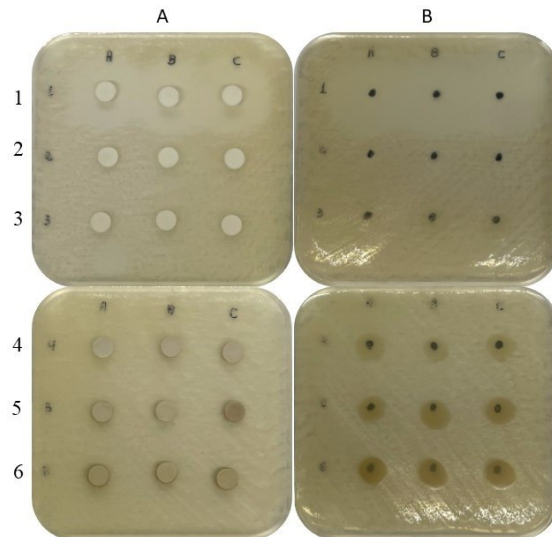


Figura 32 - Atividade antimicrobiana de filmes de própolis *Metchnikowia rancensis*. CIMO 21MS010. Colunas: A. Difusão em disco de ágar; B. Difusão em gota de ágar. Linhas: 1. Antifúngico comercial Bayer Teldor (1,5mg/100mL); 2. Controlo negativo; 3. Filme 0%; 4. Filme 5%; 5. Filme 10%; 6. Filme 20% (em triplicado).

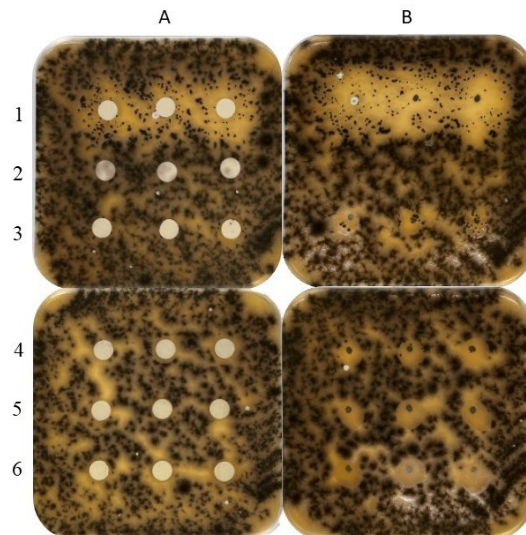


Figura 33 - Atividade antimicrobiana de filmes de própolis *Alternaria* sp. CIMO 21MS020. Colunas: A. Difusão em disco de ágar; B. Difusão em gota de ágar. Linhas: 1. Antifúngico comercial Bayer Teldor (1,5mg/100mL); 2. Controlo negativo; 3. Filme 0%; 4. Filme 5%; 5. Filme 10%; 6. Filme 20% (em triplicado).

Anexo B: Soluções da própolis e filmes usados para realização da caracterização e atividade antimicrobiana.

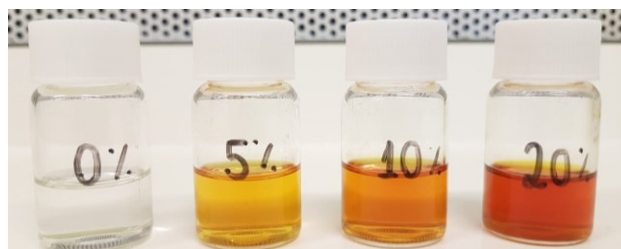


Figura 34 - Soluções de própolis para realização dos filmes.



Figura 35 - Filmes 0%, 5%, 10% e 20%, usados para realização da caracterização.

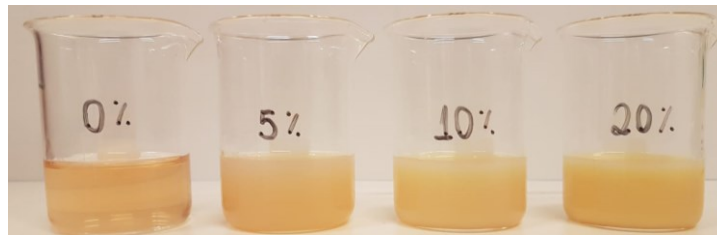


Figura 36 - Soluções dos filmes para aplicação em amoras.

Anexo C: Amoras envolvidas com os filmes 0% e 10% para avaliação da atividade antimicrobiana.

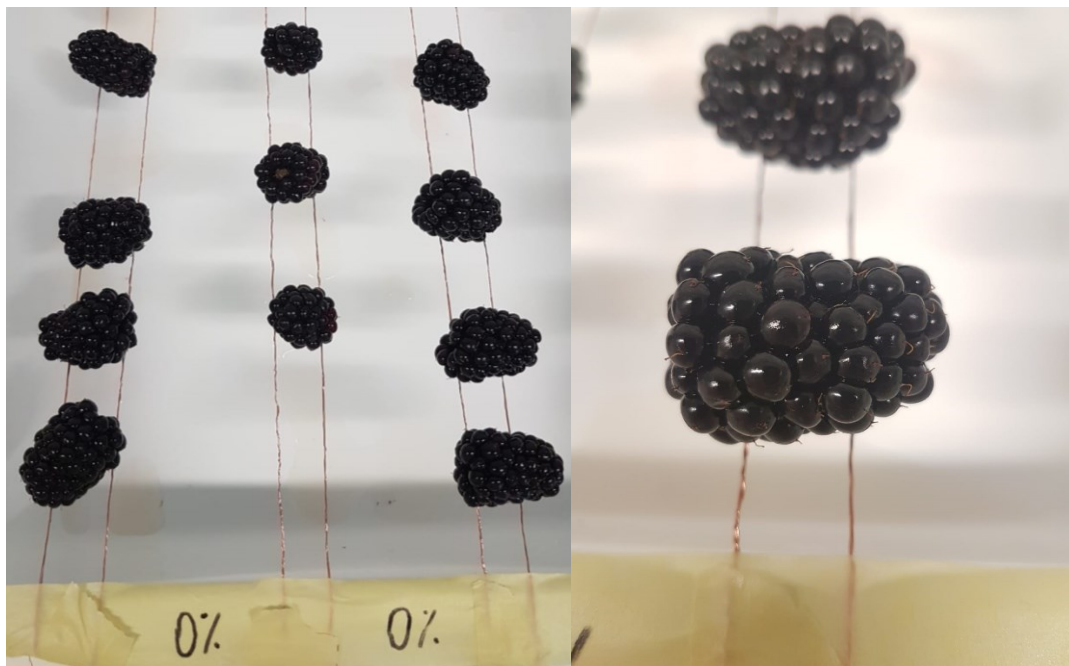


Figura 37 – Amoras envolvidas com a solução de filme 0%.

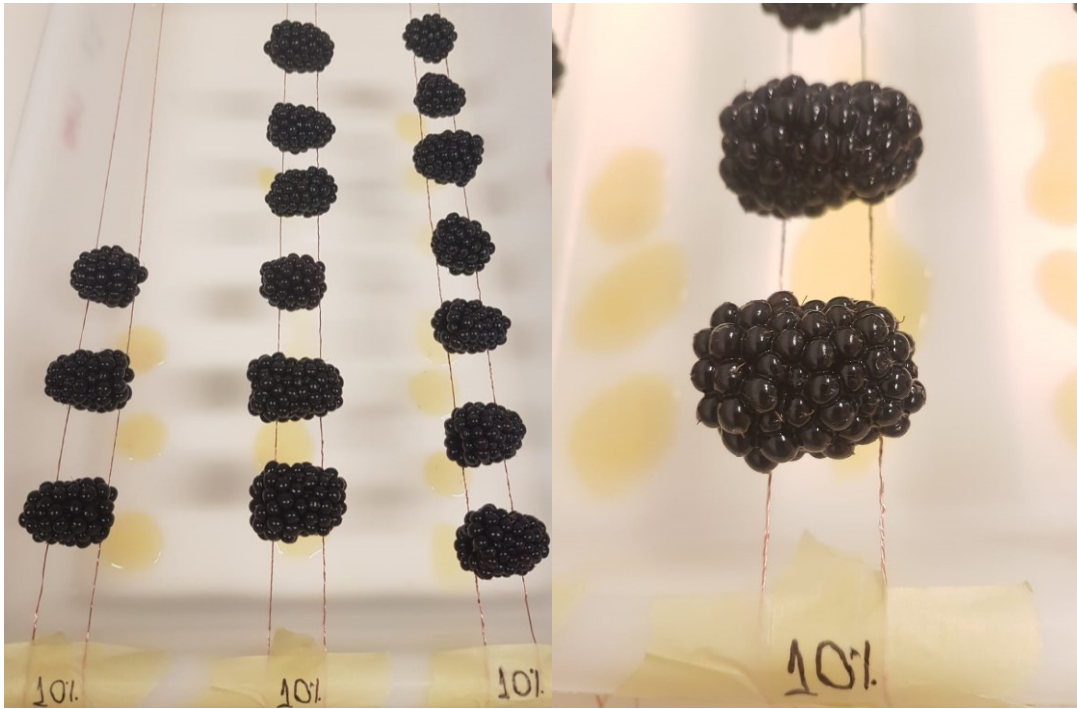


Figura 38 – Amoras envolvidas com a solução de filme 10%.

Anexo C: Resumo das duas comunicações realizadas com o presente estudo.

Propolis application in food preservation: development of chitosan-based edible films

Cristiane De Carli^{1,2}, Volkan Aylanc¹, Arantzazu Santamaria-Echart¹, Celeide Pereira², Miguel Sousa¹, Filomena Barreiro¹, Paula Rodrigues¹, Miguel Vilas-Boas¹, Soraia I. Falcão^{1*}

¹Mountain Research Centre (CIMO), Instituto Politécnico de Bragança, Campus de Sta. Apolónia, 5300-253, Bragança, Portugal; ²Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR, Campus Medianeira, 85884-000, Medianeira, Brasil

ABSTRACT

Edible films derived from chitosan highlight for its potential as coating packages, due to their antimicrobial activity and low oxygen permeability, while propolis has shown effective as a natural additive due to its antimicrobial and antioxidant properties. Thus, its combination to produce edible films, provides a promising approach to enhance the life span of easily perishable foods. The present study describes the development of edible films based on chitosan produced from chitin extracted crawfish shell, modified with propolis.

Chitosan-based films prepared incorporating different concentrations of poplar propolis extracts (0% to 20%), where characterized by FTIR, TGA and SEM. Additionally, mechanical properties, water-solubility, colour and optical transmittance tests were performed to assess the film specificities. The antioxidant and antimicrobial activity of the coating were also studied.

The FTIR spectra of the extracted material enable the identification of all major peaks associated to chitosan, corroborating the extraction procedure of chitin/chitosan from crawfish. The addition of propolis to the films decreased the water solubility compared to control. Besides, all films exhibited antioxidant and antimicrobial activity. The output clear indicates that films enriched with propolis may be an alternative candidate for food packing.

Acknowledgments

The authors are grateful to the Foundation for Science and Technology (FCT, Portugal) for financial support by national funds FCT/MCTES to CIMO (UIDB/00690/2020). Thanks to the Programa Apícola Nacional 2020-2022 (National Beekeeping Program) for funding the project "Standardization of production procedures and quality parameters of bee products" and to Project PDR2020-1.0.1-FEADER-031734: "DivInA-Diversification and Innovation on Beekeeping Production". National funding by FCT- Foundation for Science and Technology, through the institutional scientific employment program-contract with Soraia I. Falcão.

PCF-19

**CHITIN ISOLATION AND CHITOSAN PRODUCTION FROM AN INVASIVE
CRAYFISH PRESENT IN PORTUGUESE FRESHWATERS**

Cristiane De Carli^{1,2}, Volkan Aylanc¹, Filomena Barreiro¹, Miguel Vilas-Boas¹, Celeide Pereira²,
Arantzazu Santamaria-Echart¹, Soraia I. Falcão^{1*}

¹Centro de Investigação de Montanha (CIMO), Instituto Politécnico de Bragança, Bragança, Portugal; ²Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR, Medianeira, Brasil.

*sfalcao@ipb.pt

Chitin, considered to be the most abundant biopolymer after cellulose and usually extracted from crustaceans exoskeletons, can be used as source to produce chitosan, a biopolymer with attractive characteristics including non-toxicity, antimicrobial activity, biocompatibility and biodegradability [1], showing potential to be used in diverse areas, namely biomedicine, tissue engineering or agricultural applications. Obtaining chitin from natural sources has been positioned as a challenging strategy in the development of sustainable processes. Among other approaches, the gradual elimination of invasive species from specific ecosystems to produce green materials such as chitin, has become a key topic the last decades.

In this context, *Procambarus clarkii* is a species of freshwater crayfish, native to northern Mexico, and southern/southeastern of United States, but also introduced elsewhere, where it is often an invasive pest. The ability of crayfish to adapt to different environments is huge, causing great damage to local fauna and flora, and significantly affect the biodiversity of the ecosystems [2]. In the present study, we explored the abundance of *Procambarus clarkii* in local rivers and used their shells for the extraction of chitin and production of pure chitosan, with the application of classical methodology which includes demineralization, deproteinization, decolorization and sodium hydroxide treatment. The chitosan content in the shells, analyzed by FTIR, was recorded as 15%. The FTIR spectra of the extracted material enable the identification of all major peaks associated to chitosan, corroborating the extraction of chitin and chitosan production by this approach.

References

- [1] M. Kaya, M. Mujtaba, H. Ehrlich, A.M. Salaberria, T. Baran, C.T. Amemiya, R. Galli, L. Akyuz, I. Sargin, J. Labidi, Carbohydrate Polymers 176 (2017) 177-186.
[2] J.M. Bernardo, A.M. Costa, S. Bruxelas, A. Teixeira, Knowledge and Management of aquatic Ecosystems (401) (2011) 28.

Acknowledgments

The authors are grateful to the Foundation for Science and Technology (FCT, Portugal) for financial support by national funds FCT/MCTES to CIMO (UIDB/00690/2020). National funding by FCT- Foundation for Science and Technology, through the institutional scientific employment program-contract with Soraia I. Falcão.