

Efeito do extrato de própolis incorporado na qualidade do hambúrguer bovino

Beatriz Marchiore de Souza

Dissertação apresentada à Escola Superior Agrária de Bragança para obtenção do Grau de Mestre em Qualidade e Segurança Alimentar no âmbito da dupla diplomação com o Centro Federal de Educação Tecnológica Celso Suckow da Fonseca (CEFET/RJ) - Campus Valença-RJ

Orientado por

Professora Doutora Maria Leticia Miranda Fernandes Estevinho

Professor Doutor Miguel Meirelles de Oliveira

Bragança

2025

Agradecimentos

Em primeiro lugar, expresso minha profunda gratidão a Deus, por seu cuidado e amparo ao longo de toda minha trajetória acadêmica. Sem sua força e proteção, este percurso teria sido ainda mais desafiador.

Aos meus pais, Adriana e Luiz Humberto minha eterna gratidão por todo apoio incondicional ao longo desses anos. Vocês sempre foram minha maior fonte de motivação. Em especial, à minha mãe, que ainda tão jovem abdicou de seus próprios sonhos para se dedicar inteiramente a mim e ao meu irmão. Minha maior felicidade hoje é poder dizer: Nós conseguimos!

À minha orientadora, Professora Doutora Maria Leticia Miranda Fernandes Estevinho, registro minha imensa gratidão por sua gentileza e pelos valiosos conhecimentos. Sua paciência, apoio e dedicação foram fundamentais, especialmente nos momentos mais desafiadores. Sou imensamente grata pelo cuidado, conhecimento e orientação que recebi.

Ao meu coorientador, Professor Doutor Miguel Meirelles de Oliveira, deixo meus sinceros agradecimentos pela orientação e pelos conhecimentos compartilhados durante o desenvolvimento deste trabalho e ao longo da graduação.

Agradeço a Deus também por ter colocado pessoas tão especiais em minha vida ao longo dessa caminhada. Em particular, faço um agradecimento especial à minha querida amiga Dayana Mara, cuja generosidade e apoio foram fundamentais. Muito obrigada por tudo o que fez por mim.

Às minhas amigas de graduação, minha mais sincera gratidão. Cada momento compartilhado, cada noite de estudos, cada gesto de apoio mútuo foi indispensável para a superação dos desafios. Obrigada, Beatriz Coutinho, Juliana Silva, Márcia Rocha e Tatyane Marchioro, por toda parceria e por tornarem essa jornada muito mais leve.

Ao meu esposo, Guilherme Donato de Oliveira, meu profundo agradecimento pelo apoio, cuidado e incentivo, especialmente nos momentos finais dessa etapa. Sua presença constante ao meu lado foi essencial para que eu pudesse concluir este trabalho.

Expresso ainda minha gratidão ao CEFET, pelo ensino de excelência e pela formação acadêmica que recebi ao longo dessa trajetória, bem como a todos os professores e funcionários que contribuíram de forma significativa para o meu desenvolvimento.

Agradeço também ao Instituto Politécnico de Bragança (IPB), pela valiosa oportunidade de realizar a Dupla Diplomação e de ingressar no mestrado, uma experiência que ampliou meus horizontes acadêmicos e pessoais.

Por fim, um agradecimento especial à minha companheira de mestrado, Mestre Elena Pires. Sua amizade, suas palavras de conforto e seu apoio constante fizeram toda a diferença nesta caminhada. Muito obrigada por estar ao meu lado em cada etapa desse percurso.

A todos vocês, minha eterna gratidão.

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1	1
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Objetivos	3
1.1.1 Objetivo geral.....	3
1.1.2 Objetivos específicos	3
CAPÍTULO 2	4
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	4
2.1. Hambúrguer bovino	4
2.1.1. Oxidação lipídica e proteica na carne e seus derivados	5
2.1.2. Composição, ingredientes e aditivos do hambúrguer bovino	7
2.1.3. Aditivos naturais para hambúrguer bovino	10
2.2. Própolis	11
2.2.1. Composição química da própolis.....	12
2.2.2. Propriedades bioativas do própolis	15
2.2.2.1. <i>Propriedade antimicrobiana</i>	15
2.2.2.2. <i>Propriedade antioxidante</i>	16
2.2.2.3. <i>Propriedade imunomodular</i>	16
2.3. Utilização da própolis na indústria alimentícia	17
2.4. O uso do própolis como antioxidante em produtos cárneos	19
2.4.1. Tempo de vida de prateleira e bioatividade de hambúrguer incorporado com própolis	21
CAPÍTULO 3	24
3. MATERIAIS E MÉTODOS	24
3.1. Amostra	24
3.1.1. Preparação do extrato de própolis	24
3.2. Análises químicas do extrato de própolis	26
3.2.1. Preparação para solução de própolis	26
3.2.2. Determinação de compostos fenólicos totais	26
3.2.3. Determinação de flavonoides totais	27
3.2.4. DPPH	28
3.3. Produção do hambúrguer	28
3.4. Testes microbiológicos da própolis e do hambúrguer	30

3.4.2.	Contagem de mesófilos totais	31
3.4.3.	<i>Escherichia coli</i> /coliformes totais.....	31
3.4.4.	Contagem de <i>Staphylococcus aureus</i>	31
3.4.5.	Contagem de <i>Bacillus Cereus</i>	32
3.4.6.	Contagem de Clostrídios Sulfito-Redutores	32
3.4.7.	Pesquisa de <i>Salmonella</i> spp.	33
3.5.	Testes físico-químicos nos hambúrgueres	33
3.5.1.	pH.....	33
3.5.2.	Teor de proteína	33
3.5.3.	Determinação do teor de gordura.....	34
3.5.4.	Determinação do teor de umidade	35
3.5.5.	Determinação do teor em cinzas	35
3.6.	Análise sensorial das amostras de hambúrguer	36
CAPÍTULO 4	38	
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
4.1.	Composição química do extrato de própolis	38
4.2.	Análise microbiológica da própolis e do hambúrguer	40
4.2.1.	Análise microbiológica da própolis bruta	40
4.2.2.	Análise microbiológica das amostras de hambúrgueres	44
4.3.	Valores físico-químicos das amostras hambúrguer	47
4.4.	Análise sensorial das amostras de hambúrguer	49
4.4.1.	Cor.....	50
4.4.2.	Aroma.....	52
4.4.3.	Sabor	54
4.4.4.	Textura	56
4.4.5.	Impressão global	58
CAPÍTULO 5	73	
5.	CONCLUSÃO	61
REFERÊNCIAS	63	

RESUMO

Foram realizadas análises microbiológicas (mesófilos totais, coliformes totais, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, esporos de clostrídios sulfito-redutores e *Salmonella spp.*) nos dias 0, 4, 8 e 12; físico-químicas (teores de proteína, gordura, umidade, cinzas e pH) nos dias 0 e 12; e sensoriais (cor, aroma, sabor, textura e impressão global). O extrato de própolis foi caracterizado quanto à composição química (fenóis totais, flavonoides e atividade antioxidante via DPPH) e qualidade microbiológica. Os resultados indicam as propriedades funcionais do extrato de própolis, evidenciadas pelos elevados teores de fenóis totais, flavonoides e elevada atividade antioxidante, associados à sua acção antimicrobiana. Na análise microbiológica dos hambúrgueres, verificou-se que as amostras contendo própolis inibiram os microrganismos avaliados, destacando-se a formulação F2 (2%), que se manteve isenta de esporos de clostrídios sulfito-redutores até ao 12.º dia e apresentou a menor contagem de microrganismos mesófilos totais, em comparação com a amostra controlo contendo ascorbato de sódio. As análises físico-químicas revelaram variações ligeiras nos teores de proteína, gordura, cinzas e pH entre as amostras, todas dentro dos padrões esperados. Observou-se uma tendência de redução da umidade nas formulações com própolis ao longo do tempo, particularmente na amostra F2; no entanto, essa diferença foi pouco expressiva. A análise sensorial indicou que os hambúrgueres com adição de extrato de própolis não foram bem aceites pelos consumidores, devido ao impacto negativo em atributos como o aroma e o sabor. Em todos os parâmetros avaliados, as amostras contendo própolis apresentaram um desempenho sensorial significativamente inferior às que continham aditivo sintético, verificando-se uma correlação negativa entre o aumento da concentração de própolis e a aceitação sensorial. Conclui-se que, apesar da comprovada eficácia do extrato de própolis na conservação e segurança microbiológica, a sua aplicação em hambúrgueres requer estratégias que minimizem os impactos sensoriais, nomeadamente através da microencapsulação. Investigações futuras deverão explorar a utilização do extrato de própolis noutros produtos cárneos, assim como o desenvolvimento de tecnologias que preservem a qualidade sensorial dos alimentos.

Palavras-chave: própolis, aditivo alimentar, hambúrguer bovino.

ABSTRACT

The analyses performed included: microbiological analysis, with counts of total mesophiles, total coliforms, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, sulfite-reducing clostridia, and *Salmonella spp.*, on days 0, 4, 8, and 12; physicochemical analysis (% protein, % fat, % moisture, % ash, and pH) on days 0 and 12; and sensory analysis evaluating color, aroma, flavor, texture, and overall impression. The propolis extract was analyzed for its chemical composition (total phenols, flavonoids, and antioxidant potential/DPPH) and microbiological characteristics (counts of molds, yeasts, *Bacillus cereus*, total mesophiles, total coliforms, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, and sulfite-reducing clostridia). The results confirmed the functional properties of propolis extract, such as high levels of total phenols, flavonoids, and antioxidant capacity, which confer antimicrobial and antioxidant actions. In the microbiological analysis of the burgers, samples with incorporated propolis extract were effective in inhibiting the evaluated microorganisms, with F2 (2% propolis) standing out for remaining free of sulfite-reducing clostridia until day 12 and presenting the lowest total mesophile counts, outperforming the sample with sodium ascorbate. The physicochemical analysis showed minor differences between the samples in terms of protein, fat, ash, and pH levels, all within the expected ranges. However, a trend of decreasing moisture over time was observed in the propolis-containing samples, especially in F2. Nevertheless, due to the lack of additional studies and the limited extent of the reduction, the possibility of sampling error cannot be ruled out. Sensory analysis revealed the commercial infeasibility of directly using propolis extract due to its negative impact on attributes such as aroma and flavor, which compromised product acceptance. In all evaluated parameters, samples with propolis performed significantly worse than the sample with the synthetic additive, showing a negative correlation between sensory perception and the increasing concentration of propolis. Aroma and flavor were the most affected attributes. It is concluded that, although effective in conservation and microbiological safety, the use of propolis extract in burgers requires alternatives to minimize sensory impacts, such as microencapsulation. Future research could explore applications in other meat products and techniques that preserve sensory quality.

Keywords: propolis, food additive, beef burger.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura química básica dos flavonoides.	14
Figura 2 - Estrutura química básica do ácido cinâmico (à dir.) e do ácido benzoico (à esq.)..	14
Figura 3 – Amostra de própolis.	24
Figura 4 – Preparação do extrato de própolis.	25
Figura 5 – Extrato da própolis no evaporador rotativo.....	25
Figura 6 - Extrato de própolis.....	26
Figura 7 - Soluções de própolis.	26
Figura 8 - Análise de compostos fenólicos.....	27
Figura 9 – Amostras de hambúrguer	29
Figura 10 – Procedimento de contagem de esporos de clostrídios sulfito-redutores.	32
Figura 11 - Pesquisa de <i>Salmonella</i> spp.	33
Figura 12 – Ficha de avaliação sensorial.....	37
Figura 13 – Local de avaliação.....	37

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Faixa etária dos participantes.	50
Gráfico 2 - Sexo biológico dos participantes.....	50
Gráfico 3 – Resultado sobre a cor da amostra A1 (hambúrguer tradicional).	51
Gráfico 4 – Resultado sobre a cor da amostra B2 (hambúrguer com 1% de extrato de própolis).....	51
Gráfico 5 - Resultado sobre a cor da amostra C3 (hambúrguer com 2% de extrato de própolis).	51
Gráfico 6 - Resultado sobre o aroma da amostra A1 (hambúrguer tradicional).....	53
Gráfico 7 - Resultado sobre o aroma da amostra B2 (hambúrguer com 1% de extrato de própolis).....	53
Gráfico 8 - Resultado sobre o aroma da amostra C3 (hambúrguer com 2% de extrato de própolis).....	53
Gráfico 9 - Resultados sobre o sabor da amostra A1 (hambúrguer tradicional).	54
Gráfico 10 - Resultado sobre o sabor da amostra B2 (hambúrguer com 1% de extrato de própolis).....	55
Gráfico 11 - Resultado sobre o sabor da amostra C3 (hambúrguer com 2% de extrato de própolis).....	55
Gráfico 12 - Resultados obtidos para textura da amostra A1 (hambúrguer tradicional).	56
Gráfico 13 - Resultado obtidos para a textura da amostra B2 (hambúrguer com 1% de extrato de própolis).	57
Gráfico 14 - Resultado sobre a textura da amostra C3 (hambúrguer com 2% de extrato de própolis).....	57
Gráfico 15 - Resultados sobre a impressão global da amostra A1 (hambúrguer tradicional). .	58
Gráfico 16 - Resultado sobre a impressão global da amostra B2 (hambúrguer com 1% de extrato de própolis).	58
Gráfico 17 - Resultado sobre a impressão global da amostra C3 (hambúrguer com 2% de extrato de própolis).	59

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Principais tipos de própolis, região geográfica, origem botânica e principais compostos.....	13
---	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Características físico-químicas do hambúrguer bovino	8
Tabela 2 - Formulações dos hambúrgueres bovino	29
Tabela 3 – Resultados da análise da composição química do extrato de própolis	38
Tabela 4 – Resultados da análise microbiológica da própolis bruta.....	41
Tabela 5 - Resultados da análise microbiológica das amostras de hambúrguer.....	45
Tabela 6 – Resultados da análise físico-química das amostras de hambúrguer bovino	48

CAPÍTULO 1

1. INTRODUÇÃO

A sociedade contemporânea vem passando por inúmeras transformações, incluindo em relação aos seus hábitos alimentares. A busca por alternativas naturais e seguras para a preservação de alimentos tem se tornado uma tendência crescente na indústria alimentícia, impulsionada por uma demanda cada vez maior dos consumidores por produtos mais saudáveis e sustentáveis, que não incluam aditivos quimicamente sintetizados em suas formulações.

Dentre esses insumos, destacam-se os conservantes/antioxidantes sintéticos, que são substâncias muito utilizadas na indústria para aumentar o *shelf life* (tempo de vida de prateleira) dos alimentos, isto é, o período em que o produto alimentício consegue manter todas as suas características sensoriais (sabor, textura, odor, entre outros) em um estado desejável para o consumo. Assim, com o aumento da conscientização sobre os possíveis efeitos adversos dos sintéticos tradicionais em relação à saúde humana e ao meio ambiente, tem ocorrido um grande aumento da investigação na área alimentar para encontrar substitutos naturais que ofereçam os mesmos efeitos desejados.

Neste cenário, o uso de extratos naturais, como a própolis, emerge como uma promissora alternativa. A própolis é uma substância resinosa coletada por abelhas a partir de exsudatos de plantas, combinada com cera e secreções das abelhas, usada para selar e proteger as colmeias. Ao longo dos anos, a própolis tem sido amplamente reconhecida e estudada pelas suas atividades biológicas, incluindo antioxidante, anti-inflamatória e antimicrobiana.

Tais propriedades são atribuídas à complexa composição química da própolis, que inclui flavonoides, ácidos fenólicos, terpenos, entre outros compostos bioativos. Essa alta quantidade de compostos, sobretudo os fenólicos, tornam-no ideal para uso como aditivo natural na conservação de alimentos, oferecendo uma alternativa aos conservantes sintéticos para atenuar preocupações dos consumidores em relação aos possíveis efeitos de aditivos sintéticos na saúde, atendendo a uma exigência atual de mercado.

Entre os produtos cárneos, o hambúrguer bovino destaca-se como um dos mais consumidos mundialmente, sendo um alimento amplamente popular em diversas culturas. No entanto, os hambúrgueres apresentam desafios significativos em termos de preservação e segurança alimentar, os quais decorrem principalmente da alta suscetibilidade à oxidação lipídica, um processo que leva à deterioração da qualidade sensorial e nutricional, e à contaminação microbiológica, que pode comprometer a segurança do alimento e reduzir sua

vida útil.

Assim, a oxidação lipídica não apenas afeta o sabor e o aroma dos hambúrgueres, mas também resulta na formação de compostos nocivos à saúde, como radicais livres e produtos de oxidação secundários. Nesse contexto, a incorporação de extratos de própolis em hambúrgueres bovinos apresenta-se como uma estratégia inovadora para melhorar a estabilidade do produto, prolongar a sua vida útil e agregar valor funcional.

A própolis, com suas comprovadas atividades antioxidante e antimicrobiana, pode não apenas retardar a oxidação lipídica e controlar o crescimento microbiano, mas também oferecer benefícios à saúde dos consumidores, alinhando-se com as tendências atuais de alimentação saudável e natural. Cabe salientar que inúmeros estudos vêm explorando a própolis como aditivo alimentar, cujos resultados apontam para a sua eficácia, tanto em termos de conservação, quanto na qualidade sensorial dos alimentos.

Este estudo teve como objetivo avaliar a aplicação do extrato de própolis como aditivo e bioativo natural em hambúrgueres de bovino, comparando a sua eficácia com o ascorbato de sódio, conservante amplamente utilizado na indústria cárnea. Serão analisados aspectos como a qualidade físico-química da própolis, a caracterização do extrato e sua eficácia na preservação dos hambúrgueres bovinos. Além disso, serão investigadas as atividades biológicas da própolis e seu impacto no *shelf life* dos hambúrgueres, buscando compreender as implicações práticas do uso desse aditivo natural na preservação de alimentos.

A relevância deste estudo está na necessidade permanente de desenvolver soluções que conciliem a eficácia na preservação de alimentos com a segurança e a saúde do consumidor. O desenvolvimento e a introdução de aditivos naturais, como o extrato de própolis, representam um avanço significativo na busca por produtos cárneos mais saudáveis e ambientalmente sustentáveis. Além disso, esse estudo pode abrir caminhos para a inovação na indústria alimentícia, oferecendo alternativas que atendam às demandas dos consumidores e contribuam para a sustentabilidade do setor.

Por fim, este trabalho pretende não só investigar as potencialidades do uso de extrato de própolis como conservante natural, mas também promover uma reflexão mais ampla sobre a transição para práticas alimentares mais sustentáveis e conscientes. Ao explorar as propriedades e aplicações da própolis, este estudo busca contribuir para o desenvolvimento de novos produtos que possam atender às necessidades e expectativas de um mercado cada vez mais exigente e informado.

1.1. Objetivos

1.1.1 Objetivo geral

Avaliar a aplicação do extrato de própolis como aditivo e bioativo natural do hambúrguer bovino.

1.1.2 Objetivos específicos

- Analisar a qualidade da própolis através de análises físico-químicas e determinação do perfil fenólico e atividade biológica;
- Elaborar hambúrguer bovino com ascorbato de sódio, aditivo químico utilizado na produção de produtos cárneos;
- Elaborar hambúrguer bovino incorporando várias concentrações do extrato de própolis, e comparar com o hambúrguer produzido utilizando o ascorbato de sódio;
- Analisar e comparar a atividade biológica sob refrigeração e o tempo de vida de prateleira (análises físico-química e microbiana dos hambúrgueres com incorporação de ascorbato de sódio ou de extrato de própolis).

CAPÍTULO 2

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1. Hambúrguer bovino

O hambúrguer pode ser definido como um produto cárneo, feito a partir de carne moída de animais, principalmente carne bovina, podendo conter ou não gordura e outros ingredientes/aditivos (Guerreiro, 2021). A sua preparação pode incluir uma variedade de ingredientes opcionais, como gorduras, proteínas, açúcares, condimentos, vegetais, queijos, entre outros. Assim, o hambúrguer diz respeito a um produto alimentício produzido a partir de uma técnica em que uma ou mais carnes são processadas, moldadas num determinado formato (tradicionalmente redondo) e processados através de técnica de cozedura (Pinho et al., 2020).

A história do hambúrguer remonta ao século XVIII, na cidade alemã de Hamburgo, origem do produto. Nesta cidade, os germânicos serviam carne picada crua em pratos com cebolas e batatas. Foi durante as viagens dos marinheiros alemães que a prática de cozinhar carne picada em pedaços pequenos, já conhecida pelos povos nômades da Ásia e da Europa Oriental, se popularizou (Smith, 2008).

Influenciados pelos imigrantes alemães, a carne bovina moída em formato de bifés redondo, conhecidos como *hamburger beef* (bife de origem hamburguesa, em alusão a cidade de Hamburgo), chegou à América. No entanto, foi apenas entre as décadas de 1910 e 1920 que o hambúrguer foi transformado em sanduíche (Hogan, 2020). A divulgação do hambúrguer para o grande público foi impulsionada pela *White Castle*, a primeira cadeia de hambúrgueres (sanduíche) do mundo, fundada em 1924 nos Estados Unidos. Desde então, passou por um grande processo de popularização, sendo um dos alimentos mais consumido e conhecido no mundo (Riberio et al., 2022).

Tradicionalmente feito apenas com carne bovina, a receita original do hambúrguer passou por mudanças significativas com a sua industrialização. Para atender à procura em larga escala, começaram a ser incorporadas carnes de diferentes animais (principalmente de aves e suíno) e partes menos nobres, visando reduzir os custos de produção (Lopes et al. 2021).

Além disso, as carnes destinadas à produção do hambúrguer também passaram a ser mais processadas, resultando numa pasta que facilita a moldagem do produto. São também adicionados outros elementos não presentes na receita tradicional, como sal, antioxidantes,

acidulantes, açúcar, farinha de trigo, gordura vegetal, leite em pó, entre outros (Guerreiro, 2021)

Para garantir a qualidade, os hambúrgueres devem apresentar características sensoriais específicas, como textura, cor, sabor e odor, atender a alguns critérios físico-químicos, como teor de gordura e proteína, e parâmetros de qualidade microbiológica (Oliveira et al., 2021).

Nos últimos anos, tem havido uma demanda crescente por alimentos industrializados mais saudáveis e aceitáveis, o que tem impulsionado a adição de ingredientes funcionais de origem natural, como antioxidantes e estabilizadores, que, no caso do hambúrguer e outros produtos cárneos, visam principalmente evitar a oxidação lipídica e proteica (Araújo et al., 2022).

2.1.1. Oxidação lipídica e proteica na carne e seus derivados

A deterioração da carne e de produtos cárneos, incluindo hambúrgueres, resulta do processo de oxidação de lipídios e proteínas, levando à diminuição da qualidade do alimento e à perda de nutrientes essenciais. Além disso, este processo afeta negativamente as características sensoriais, como aroma, sabor e textura (Sampaio et al., 2012). Especificamente em relação à oxidação lipídica, trata-se de um fenômeno no qual os lipídios reagem com o oxigênio, desencadeando uma reação em cadeia que produz compostos oxigenados, como álcoois, aldeídos, cetonas e peróxidos. Isto resulta em alterações no aroma, odor, sabor e textura do alimento, fenômeno comumente conhecido como ranço (Leão et al., 2017).

A oxidação lipídica envolve uma série de reações em cadeia de radicais livres, divididas em três etapas simultâneas: iniciação, propagação e terminação. Durante a iniciação, formam-se radicais livres quando o oxigênio interage com os lipídios insaturados (Sampaio et al., 2012).

Na fase de propagação, esses radicais livres reagem com o oxigênio, produzindo radicais peróxidos, como dienos conjugados e hidroperóxidos, que são os produtos primários da oxidação (Luigi et al., 2020). Posteriormente, estes compostos degradam-se e formam substâncias aromáticas voláteis, como cetonas, compostos carbonílicos, aldeídos e álcoois, responsáveis pelo sabor e odor rançoso, bem como pela alteração da cor característica de carnes oxidadas. Por fim, essas substâncias secundárias também se degradam e formam compostos tóxicos na fase de terminação (Leão et al., 2017).

A oxidação dos lipídios em carnes é predominantemente afetada pela presença de oxigênio, que interage com ácidos graxos insaturados para formar peróxidos. Radicais livres com alto nível de instabilidade, provenientes de nitrogênio, oxigênio e enxofre, dão origem a espécies reativas de nitrogênio (RNS), oxigênio (ROS) e de enxofre (RSS) (Ali et al., 2020).

A taxa de oxidação está diretamente relacionada ao nível de insaturações presentes nos lipídios, afetando a cor e a estabilidade dos produtos de forma significativa. A velocidade e os produtos resultantes das reações de oxidação são influenciados por diversos fatores, como a espécie animal, o tipo de músculo, a presença de enzimas, os níveis de antioxidantes internos e externos à carne, o pH e o processo de preparação (Pateiro et al., 2014).

Em contraste com a oxidação lipídica, as reações de oxidação proteica, já bastante conhecida, têm sido objeto de estudo apenas nas últimas décadas. De maneira geral, esse fenômeno é semelhante ao da oxidação lipídica, exceto pelo fato de que são as proteínas que sofrem o processo oxidativo. Ambos os processos são iniciados por ROS, ao passo que produtos da oxidação lipídica também atuam como ROS na oxidação proteica (Leão et al., 2017).

Assim, a avaliação da oxidação das proteínas tornou-se um critério crucial na determinação da qualidade da carne e de seus derivados, uma vez que desempenha um papel fundamental nas características físico-químicas, nutricionais e sensoriais dos produtos cárneos (Ribeiro et al., 2018). A oxidação das proteínas pode ocorrer de diversas formas, como pela alteração de aminoácidos específicos, clivagem do peptídeo por meio de radicais livres e formação de ligações cruzadas de proteínas decorrentes da peroxidação de lipídios. Ainda, a existência de aminoácidos, como cisteína, metionina e histidina, pode aumentar a suscetibilidade das proteínas à oxidação (Libardi et al., 2013).

O processamento da carne, incluindo armazenamento, cocção e cura, pode influenciar o estado químico das proteínas de forma negativa, devido às reações de oxidação. Essas reações podem levar à degradação de aminoácidos benéficos, diminuir a digestibilidade e a biodisponibilidade das proteínas, e provavelmente causar problemas de saúde aos consumidores (Ribeiro et al., 2018).

As carbonilas, como aldeídos e cetonas, são produzidas em reações oxidativas das proteínas, sendo estas não reversíveis e sem a presença de enzimas, principalmente pela oxidação direta das cadeias laterais de determinados aminoácidos como treonina, lisina, prolina e arginina. Além disso, lipídios suscetíveis à oxidação e pigmentos heme também desempenham um papel significativo no processo de oxidação (Junior et al., 2013).

Assim, conforme ressalta Ribeiro et al. (2018), a oxidação de lipídios e proteínas afeta diretamente as características nutricionais e sensoriais da carne e produtos cárneos, além de influenciar a saúde do consumidor. Estes processos resultam na formação de compostos tóxicos, como os carbonílicos e o malonaldeído, que podem levar a problemas de saúde, incluindo doenças neurodegenerativas e câncer (Ribeiro et al., 2018).

Como mencionado anteriormente, o sabor, aroma e cor do produto são afetados. Na

oxidação lipídica, esse processo é principalmente atribuído à oxidação da mioglobina, enquanto na oxidação proteica isso ocorre devido à perda de funções das proteínas e à formação de ligações cruzadas. Em termos de perdas nutricionais, a oxidação lipídica resulta na perda de ácidos gordos essenciais presentes na carne, enquanto a oxidação proteica pode levar à redução de aminoácidos essenciais (Leão et al., 2017).

2.1.2. Composição, ingredientes e aditivos do hambúrguer produzido a partir da carne de bovino

Em relação a composição do hambúrguer bovino, o processo da sua industrialização levou à formulação de inúmeras receitas, com adição de ingredientes diversos. Tradicionalmente, o hambúrguer bovino é feito a partir de 100% de cortes de carne bovina, sendo possível utilizar diferentes partes do animal para se atingir o percentual ideal de gordura, que oscila entre 20 a 25% (Lopes et al. 2021).

Já no hambúrguer bovino industrializado, há a adição de diferentes ingredientes, sendo os mais comuns gordura de outros animais, gordura vegetal, sal, proteína vegetal, leite em pó, açúcar, aditivos intencionais (acidulantes, aromatizantes, antioxidantes e estabilizantes) e condimentos. Uma prática comum na produção de hambúrguer industrializado é o uso de carne mecanicamente separada (CMS), que é a carne retirada de ossos e carcaças dos animais (Guerreiro, 2021).

Também é comum usar proteína texturizada de soja (PTS), um produto produzido a partir do farelo de soja, resíduo sólido obtido após a extração do óleo de soja. Para produzir a PTS, o farelo de soja é primeiramente desengordurado e, posteriormente, submetido a um processo denominado extrusão termoplástica, que consiste na transformação de proteína presente na farinha desengordurada de soja, mediante a aplicação de altas temperaturas, pressão e força de cisalhamento (Masson & Gelinski, 2014). Neste processo, os compostos proteicos tornam-se elásticos, pegajosos e capazes de se reorientarem em algumas estruturas desejadas. O resultado é um produto com textura fibrosa, semelhante à carne (Marques et al., 2015).

A PTS é uma grande fonte de proteína vegetal, sendo composto por, aproximadamente, 50% de proteína (em massa seca), muito superior que na carne bovina, cujo teor de proteína é em torno de 22% (Cassini, 2004). A sua aplicação na indústria alimentícia ocorre, principalmente, como ingrediente na elaboração de alimentos cárneos, como o hambúrguer, de modo a aumentar a quantidade de proteína no alimento, mantendo a sua textura e seu teor de gordura (Oliveira et al., 2013).

As características físico-químicas do hambúrguer bovino, apresentam-se na Tabela 1.

Tabela 1 - Características físico-químicas do hambúrguer bovino.

Parâmetro	Valor
Proteína (%)	15-20
Gordura (%)	10-25
Carboidratos totais (%)	3
Teor de cálcio (%)	0,1

Fonte: Guerreiro (2021)

Relativamente aos aditivos comumente empregados em produtos cárneos, é possível destacar os acidulantes, aromatizantes, antioxidantes e estabilizantes. Especificamente os acidulantes, são utilizados para conferir ao produto um nível de acidez desejado, o que, além de influenciar no sabor, também contribuir para a conservação microbiológica do hambúrguer (Rego et al., 2021).

Dentre os principais acidulantes utilizados em produtos cárneos, evidenciam-se o ácido cítrico, a glucona-delta-lactona e o citrato de sódio. O ácido cítrico é um ácido orgânico de baixa acidez presente naturalmente em seres vivos e produzido industrialmente por meio da fermentação do açúcar com o fungo *Aspergillus niger*. A glucona-delta-lactona é um éster do ácido glucônico que passa por uma hidrólise gradual, resultando numa redução lenta e contínua do pH até atingir o equilíbrio. O citrato de sódio é um sal orgânico fraco formado pela completa neutralização do ácido cítrico (Rego et al., 2021).

Os aromatizantes são substâncias ou combinações de substâncias que possuem características odoríferas e/ou sápidas, sendo capazes de conferir ou intensificar o aroma e/ou sabor dos alimentos. A regulamentação da Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA, estabelecida na RDC nº 272, de 14 de março de 2019, classifica os aromatizantes como naturais, sintéticos idênticos aos naturais e artificiais (Anvisa, 2019).

Esses aromatizantes podem ser combinados entre si, independentemente do número de componentes ou tipo. O resultado da mistura é classificado como: natural, se derivar exclusivamente de aromatizantes naturais; idêntico ao natural, se resultar da combinação de aromatizantes idênticos aos naturais, com ou sem adição de aromatizantes naturais; e, artificial, se derivar de uma mistura em que pelo menos um dos aromatizantes é artificial (Silva et al., 2021).

Os antioxidantes são agentes capazes de combater, retardar e inibir a oxidação

lipídica/proteica em produtos cárneos, o que representa uma abordagem altamente eficaz para evitar as mudanças na qualidade desses produtos. Eles atuam controlando os radicais livres, pró-oxidantes e intermediários da oxidação, reduzindo assim a velocidade da oxidação e mantendo a qualidade do produto por um tempo maior (Barros et al., 2021).

Dentre os principais agentes antioxidantes utilizados na produção de hambúrgueres, encontram-se o Beta Hidroxiácido (BHA), o eritorbato de sódio e o ascorbato de sódio. O BHA consiste em uma mistura de dois isômeros, o 2-terc-butil-4-hidroxianisol e o 3-terc-butil-4-hidroxianisol, formados a partir do 4-metoxifenol e do isobutileno. Destaca-se pela sua eficácia na prevenção da oxidação em gorduras animais, embora seja menos eficaz em óleos vegetais. O eritorbato de sódio, também chamado de D-Isoascorbato de sódio, é o sal do ácido eritórbito. Além de atuar como antioxidante, desempenha um papel estabilizador, contribuindo para a manutenção da estrutura desejada do produto (Rego et al., 2021).

O ascorbato de sódio é um composto salino derivado do ácido ascórbico. A sua produção envolve a dissolução do ácido ascórbico em água, seguida pela adição de bicarbonato de sódio em quantidades equivalentes. Reconhecido como um aditivo alimentar, contém aproximadamente 11,6% de sódio na sua composição total. Sua aplicação em produtos cárneos é devida principalmente à sua função antioxidante (Orvalho, 2010).

Os estabilizantes são compostos que impedem a ocorrência de alterações físicas e químicas no produto final. Isto é, são empregados para preservar a estrutura desejada do produto, ajustando a sua viscosidade e textura. Na indústria de processamento de carnes, alguns dos principais estabilizantes incluem as gomas (como carragena, xantana e guar), a metilcelulose, o pirofosfato de sódio e o tripolifosfato de sódio (Rego et al., 2021).

O tripolifosfato de sódio é um composto químico formado por sódio e fósforo, pertencente à família dos polifosfatos, substância que permitem a dispersão uniforme de duas ou mais substâncias imiscíveis num mesmo alimento, tornando-os excelentes estabilizantes. De modo geral, eles atuam na formação de películas na superfície de separação, além de funcionar como colóides protetores (Queiroz, 2006).

O tripolifosfato de sódio é o único dos tripolifosfatos que tem importância tecnológica, sendo produzido à escala comercial. É obtido através da desidratação térmica de uma mistura de fosfatos dissódicos e monossódicos, mediante reação entre ácido fosfórico e uma base alcalina, como soda cáustica ou carbonato de sódio (Long et al., 2011).

Trata-se de um aditivo amplamente utilizado na indústria alimentar para produtos cárneos, como processados, defumados e congelados, bem como em vegetais enlatados e produtos à base de ovos. O tripolifosfato de sódio previne a perda de líquido da proteína,

aumentando o pH local e a força iônica, o que resulta numa significativa redução da perda de líquido durante o descongelamento e o cozimento, possibilitando a manutenção das propriedades originais (Pizon, 2022).

2.1.3. Aditivos naturais para hambúrguer bovino

Nos últimos anos, consumidores, indústrias de alimentos, políticas governamentais e a mídia em geral tem despertado interesse cada vez maior nos alimentos nutricionalmente saudáveis. Dentre as áreas de investigação, o uso de aditivos naturais é uma das principais, em substituição dos aditivos sintéticos que, embora sejam de suma importância para o modelo atual de alimentação, como, por exemplo, para aumentar o tempo de prateleira, conservando o sabor, aroma e textura por um tempo maior, também estão documentados como responsáveis por problemas de saúde (Lachno et al., 2019).

De acordo com Albuquerque et al. (2012), um aditivo alimentar natural tem a mesma função que um aditivo tradicional, ou sintético. A diferença é que o natural é obtido sem a necessidade de síntese química, ocorrendo natural ou recuperado de uma fonte natural, a exemplo de vegetais ou produtos de origem animal.

Os aditivos naturais em alimentos vão de encontro a tendência mundial de aliar praticidade na alimentação com aspectos como saudabilidade, bem-estar e sustentabilidade. Tem aumentado a procura por produtos alimentícios de “rótulo limpo”, isto é, sem aditivos sintéticos, substituído por aditivos naturais, e que utiliza técnicas tradicionais com um processamento mínimo (Galanakis, 2022).

Os aditivos de origem natural podem ter funções de preservação, cor, ação antioxidante, melhoria no sabor e, inclusive, trazer vantagens para a saúde. Estes extratos naturais podem substituir parcial ou integralmente os aditivos sintéticos na formulação de diversos produtos alimentares, incluindo os hambúrgueres bovinos industrializados e outros produtos cárneos (Manea et al., 2022).

Dentre os aditivos naturais mais estudados para aplicação em produtos cárneos, destacam-se os que apresentam propriedades conservante, antioxidante e estabilizantes. Entre os conservantes, salientam-se o extrato de orégano, extrato de canela, óleo essencial de cravo-da-índia e soro de leite. Em relação aos antioxidantes naturais, destacam-se os extratos de alecrim, laranja e limão. Como estabilizantes, reportam-se a fibra cítrica, proteína de carne desidratada, casca de manga e fibra de bambu. Entre os corantes, tem-se urucum, cúrcuma, betacaroteno, caramelo, entre outros (Delgado-Pando et al., 2021). Além destes, a própolis

também vêm sendo investigada como aditivo alimentar devido as suas propriedades, que iremos apresentar seguidamente.

2.2. Própolis

A própolis é uma substância resinosa, adesiva e aromática, produzida por abelhas a partir resinas vegetais, como líquidos secretados no início do desenvolvimento de botões florais e foliares, pólen e exsudados de certas plantas. A essas resinas, as abelhas adicionam enzimas salivares, especialmente a enzima β -glucosidase, que transforma os flavonoides glicosilados em agliconas. Posteriormente, as abelhas adicionam a cera, tornando a substância moldável (Campos et al., 2021).

Segundo Silva et al. (2023) a própolis é composta por 50% de resinas, 30% de ceras, 10% de óleos essenciais, 5% de pólen e 5% detritos. No entanto, essa distribuição de componentes pode ser influenciada pelas espécies de plantas que as abelhas polinizam e pelo uso específico na colmeia. Para Salgueiro (2016), a composição da própolis varia da seguinte forma: resinas e bálsamos vegetais (30-40%), cera de abelha (20-30%), óleos essenciais (5-10%), grãos de pólen (1-5%), outras substâncias orgânicas (1-5%), detritos de madeira e terra (1-5%). Além disso, pode incluir microelementos como alumínio, cálcio, ferro, estrôncio, cobre, manganês, vitaminas B1, B2, B6, C e E.

A própolis é utilizada pelas abelhas para reparar os alvéolos de criação, proteger a colmeia contra infecções, fechar pequenas fendas e até embalsamar insetos mortos que não podem ser removidos, prevenindo a propagação de doenças. Além disso, possui uma ação importante contra proliferação de bactérias e fungos, criando um ambiente -limpo, atua também como isolante térmico, mantendo a temperatura quase que constante no seu interior. A sua cor varia conforme a sua origem floral, geográfica e com o tempo de armazenamento, variando de o amarelo claro até castanho-escuro/preto (Foguel, 2019).

Historicamente, o uso da própolis pelo ser humano é de longa data. Os antigos egípcios, por exemplo, utilizavam-na para a preservação de corpos devido às suas propriedades antiputrefativas. Na era moderna, o seu uso terapêutico popularizou-se entre as décadas de 1950 e 1960, inicialmente na Europa e espalhando-se depois para os demais continentes (Moreira et al., 2011).

A partir da década de 1980, a própolis assumiu uma relevância significativa na medicina complementar e alternativa, sendo atualmente incorporado na indústria farmacêutica. Em reconhecimento de sua importância, tem havido uma série de estudos sobre a própolis,

abrangendo melhorias nos processos de extração, medidas de controle de qualidade e possíveis aplicações em diferentes setores (Funari et al., 2006).

2.2.1. Composição química da própolis

A composição química da própolis é altamente complexa e está sujeita às características fitogeográficas do local onde as colmeias estão localizadas, bem como da época de recolha da resina. Segundo Sousa et al. (2019), a sua composição química é função do período de recolha da resina, com diferenças significativas entre colmeias, da disponibilidade de resinas, da origem geográfica das substâncias presentes, das variações sazonais ao longo do ano (como chuvas, variações de temperatura e floração) e até mesmo da variabilidade genética das abelhas rainhas.

De acordo com Cabral et al. (2019), em concordância, são inúmeros os fatores que afetam a composição química da própolis, como o tempo em que foi produzido, a flora da região e a sua utilização dentro da colmeia. Segundo Marcucci & Custódio (2021), com o passar do tempo, a própolis sofre perdas em sua atividade microbiana, nas características sensoriais (aroma, sabor, coloração) e na sua composição química. Além disso, a própolis produzida em regiões tropicais, geralmente, é biologicamente mais rico do que a produzida em zonas temperadas, devido à maior variabilidade e disponibilidade vegetal nesses locais.

Em relação às diferenças que ocorrem pelo seu uso específico na colmeia, salienta-se que, quando aplicada para reforçar os favos, é adicionada uma quantidade maior de cera à própolis para conferir maior resistência, enquanto que para reparar outras superfícies da colmeia, é empregue uma proporção menor de cera. É desejável a presença de teores elevados de resinas vegetais, pois as atividades biológicas da própolis estão associadas às substâncias presentes na sua composição (Marini et al., 2009). De fato, existe uma grande variedade da própolis, cuja classificação, geralmente, é realizada pela sua cor.

No Quadro 1 é apresentada uma relação entre a cor, região em que é encontrado e principais compostos químicos de alguns tipos de própolis comerciais.

Quadro 1 – Principais tipos de própolis, região geográfica, origem botânica e principais compostos.

Cor/Tipo	Região geográfica	Origem botânica	Principais compostos
Álamo	América do Norte, Ásia, Europa e Nova Zelândia	<i>Populus</i> spp.	Flavonas, flavanonas, ácidos cinâmicos e seus ésteres
	Argentina, Uruguai e Brasil	<i>Populus alba</i>	
Bétula	Rússia	<i>Betula verrucosa</i>	Flavona e flavonóis
Clusia	Cuba e Venezuela	<i>Clusia</i> spp.	Benzofenonas polipreniladas
Verde	Brasil	<i>Baccharis</i> spp.	Ácidos p-cumárico prenilados, ácidos diterpênicos
Vermelha	Brasil	<i>Dalbergia ecastophyllum</i>	Fenilpropanóides prenilados
	Cuba	<i>Clusia rósea, Dalbergia ecastophyllum</i>	Benzofenonas poliisopreniladas
	Venezuela	<i>Clusia</i> spp.	Benzofenonas polipreniladas
Marrom	Brasil	<i>Araucaria</i> spp. <i>Baccharis</i> spp.	Flavonoides, ácidos cinâmicos e diterpênicos e seus ésteres

Fonte: Adaptado de Kolc (2014)

Lustosa et al. (2008), destacaram que já foram identificados mais de 200 compostos químicos em diferentes amostras de própolis, sendo que, em média, uma amostra contém mais de 100 compostos. De acordo com Menezes (2022), os principais substâncias químicas isolados da própolis até o momento podem ser agrupados em categorias, como: ácidos e ésteres alifáticos, ácidos e ésteres aromáticos, açúcares, álcoois, aldeídos, ácidos graxos, aminoácidos, esteroides, cetonas, chalconas e di-hidrochalconas, flavonoides (flavonas, flavonóis e flavononas), terpenoides, proteínas, além das vitaminas (B1, B2, B6, C e E) e minerais.

Segundo Salgueiro e Castro (2016), foram identificadas mais de trezentas substâncias na própolis, destacando-se os flavonoides, os aldeídos aromáticos (como vanilina e isovanilina), as cumarinas, os ácidos fenólicos, os ácidos orgânicos (como ácido benzóico), os ácidos e ésteres alifáticos e aromáticos, os açúcares, os álcoois, os ácidos graxos, os aminoácidos, os esteroides, as cetonas, as chalconas e dihidrochalconas, os terpenoides e as proteínas.

Dentro desses componentes, merecem destaque os compostos fenólicos, metabolitos

secundários encontrados em várias partes das plantas, como folhas, flores, frutos e outros tecidos vegetais. Na própolis, os compostos fenólicos mais significativos incluem os flavonoides e os ácidos fenólicos. Os flavonoides são um grupo de substâncias naturais, que não são produzidas pelos animais, caracterizados pela presença de dois anéis benzênicos aromáticos ligados por uma cadeia de três átomos de carbono, formando a estrutura básica C₆-C₃-C₆, conforme se pode observar na Figura 1 (Arruda, 2013).

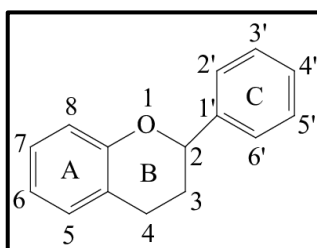


Figura 1 - Estrutura química básica dos flavonoides.
Fonte: Lima & Bezerra (2012, p. 118)

Os principais flavonoides encontrados na própolis incluem flavonas, flavonoides e flavonóis, como galangina, crisina, tectocrisina, pinocembrina, canferol e quercetina (Lustosa et al., 2008). Já os ácidos fenólicos podem ser divididos em duas classes: os ácidos cinâmicos, compostos por nove átomos de carbono, com estrutura C₆-C₃, e os ácidos benzoicos, compostos por sete átomos de carbono, com estrutura C₆-C₁ (Fig.2).

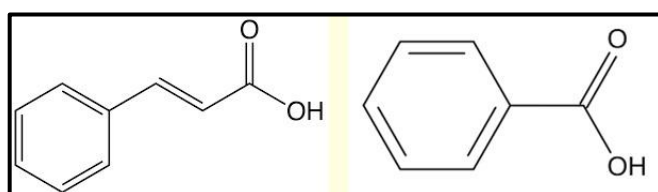


Figura 2 - Estrutura química básica do ácido cinâmico (à dir.) e do ácido benzoico (à esq.).
Fonte: Bertoldo (2020, p. 09)

Os ácidos fenólicos mais relevantes na própolis são o ácido cafeico, ácido ferúlico, ácido cinâmico e ácido p-cumárico. A importância destes compostos reside no fato de serem antioxidantes eficazes, além de exibirem atividade antimicrobiana, sobretudo contra bactérias e fungos (Lustosa et al., 2008). Cabe ressaltar que, embora esses componentes da própolis sejam amplamente estudados, não são os únicos responsáveis por suas propriedades bioativas, pois pesquisas indicam a relevância da interação entre os compostos fenólicos e outros para conferir estas propriedades (Salgueiro & Castro, 2016).

2.2.2. Propriedades bioativas do própolis

O conhecimento sobre as propriedades bioativas da própolis é antigo, uma vez que esta substância é utilizada para diferentes fins terapêuticos desde a antiguidade. Na atualidade, ele vem sendo alvo de diversos estudos que visam investigar estas capacidades, como ação antimicrobiana, anti-inflamatória, antioxidante, imunomoduladora, antiviral, anticancerígena, entre outras (Menezes, 2022). Essas características estão diretamente relacionadas com a composição química da própolis, especialmente aos seus teores de flavonoides e ácidos fenólicos, bem como ao sinergismo entre os seus outros componentes (Lustosa et al., 2008). Assim, iremos seguidamente descrever algumas de suas principais propriedades.

2.2.2.1. Atividade antimicrobiana

A capacidade da própolis de inibir o crescimento de microrganismos é a propriedade mais amplamente reconhecida e alicerçada pela ciência. Embora, conforme já salientado, a composição do própolis apresente grandes variações, a sua atividade antimicrobiana é bastante similar entre os diferentes tipos (Queiroz et al., 2021).

De acordo com Scazzocchio et al. (2006), a capacidade antimicrobiana pode ser atribuída, principalmente, à presença de componentes como a flavonona pinocembrina, o flavonol galangina e o éster feniletil do ácido cafeico, que atuam inibindo a RNA-polimerase bacteriana. Além disso, outros componentes, como os flavonoides, ácido cafeico, ácido benzoico e ácido cinâmico, agem na parede celular dos microrganismos, causando danos funcionais e estruturais.

Especificamente sobre a atividade antibacteriana, diversos estudos apontam para uma maior eficácia da própolis contra bactérias Gram-positivas do que contra as Gram-negativas. Antunes et al. (1996), realizaram testes de antibiose com própolis contra 10 bactérias Gram-positivas e 20 Gram-negativas, tendo constatado que a substância é mais eficaz contra as bactérias Gram-positivas.

Vargas et al. (2004), reportaram que o extrato etanólico de própolis (EEP), a 50%, demonstrou atividade antibacteriana *in vitro*, inibindo o crescimento de 67,70% de diferentes bactérias, incluindo *Nocardia asteroides*, *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Rhodococcus equi*, *Salmonella* spp., *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis* e *Pseudomonas aeruginosa*. As bactérias Gram-positivas mostraram maior sensibilidade (92,6%) ao extrato testado em comparação com as Gram-negativas (42,5%).

Até o momento, ainda não são claros os mecanismos responsáveis pela maior resistência das bactérias Gram-negativas. No entanto, especula-se que esteja ligado ao fato de que estas bactérias possuem uma parede celular mais complexa quimicamente e um teor lipídico mais elevado, o que lhes confere maior resistência aos compostos da própolis em comparação com as Gram-positivas (Vargas et al., 2004).

Além disso, a própolis tem demonstrado excelentes atividades fungistáticas e fungicidas (Longhini et al., 2007). Segundo Sobreira et al. (2020), os componentes ativos da própolis demonstraram uma significativa capacidade fungicida contra várias espécies de leveduras, incluindo *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, *Candida krusei* e *Candida tropicalis*.

2.2.2.2. Capacidade antioxidante

A própolis também apresenta efeitos antioxidantes, sobretudo pela presença de compostos fenólicos, que agem na captura de radicais livres, e conseqüentemente, reduz o efeito oxidativo em matéria orgânica. Dentre estes compostos, os flavonoides são considerados os antioxidantes mais prevalentes e eficazes, sendo vários investigadores observaram uma relação direta entre os altos níveis de flavonoides totais e a capacidade de neutralização de radicais livres de extratos de própolis (Salgueiro & Castro, 2016).

De-Melo et al. (2014), sugerem que os flavonoides desempenham um papel significativo na atividade antioxidante da própolis, embora outros fatores também possam influenciar esta capacidade. Mani et al. (2006), salientam ainda que os EEPs (extrato etanólico) se destacaram por apresentar grande atividade antioxidante e por ser o tipo de extrato mais comum, entretanto, o extrato aquoso também apresenta uma atividade antioxidante notável, atribuída ao elevado teor de compostos fenólicos, por vezes, superior ao do EEP.

Alves & Kubota (2013), em seis amostras comerciais de própolis, verificaram que os produtos possuíam compostos fenólicos, expressos em miligramas (mg) de ácido gálico, e flavonoides, expressos em mg de quercetina, bem como capacidade antioxidante, comprovada pela atividade quelante de metais e sequestrante de radicais livre de extratos etanólicos e aquosos das amostras testadas. Além disso, constatou-se que o extrato aquoso apresentou atividade antioxidante superior ao etanólico.

2.2.2.3. Propriedade imunomodular

A imunomodulação trata-se da ativação ou supressão de componentes do sistema

imunológico de um determinado organismo. Nesse contexto, o uso da própolis como agente imunomodulador tem sido considerado uma alternativa viável para a prevenção e tratamento de diversas enfermidades. A imunomodulação levada a cabo pela própolis é complexa e por vezes contraditória, sendo descrita tanto como estimulante quanto como inibidora de certos eventos imunológicos. Esses efeitos antagônicos podem ser atribuídos, em parte, à diversidade química da própolis (Fischer et al., 2021).

A eficácia da imunomodulação pela própolis também pode estar relacionada ao método de extração dos seus compostos bioativos. Convém salientar que a combinação dos diferentes compostos naturais presentes na própolis e os seus efeitos sinérgicos são relevantes (Bankova, 2005).

Algumas das atividades da própolis no sistema imunológico incluem a ativação de macrófagos, o aumento da atividade citotóxica contra células tumorais e a estimulação da produção de anticorpos. Sy et al. (2006), reportaram que o uso do extrato de própolis reduz as inflamações das vias aéreas em ratos, possivelmente devido à sua capacidade para modular a produção de citocinas. Isto, sugere que pode ser considerado um novo agente terapêutico no tratamento da asma.

2.3. Utilização da própolis na indústria alimentar

Nos últimos anos, o uso da própolis na indústria alimentar tem se destacado, dando particular relevância às suas propriedades antimicrobiana e antioxidante. Dentre as principais aplicações neste setor, destacam-se o seu uso como aditivo alimentar natural e na elaboração de biofilmes e embalagens para proteção de alimentos (Lustosa et al., 2008).

Como aditivo alimentar natural, vários estudos indicam uma variedade de possíveis aplicações para a própolis. Silici e Karaman (2013), investigaram o impacto da própolis na redução da patulina, um contaminante natural (micotoxina) encontrado no suco de maçã, formado principalmente pelo fungo *Penicillium expansum*. Neste trabalho foi avaliado o efeito do extrato etanólico (80%) de própolis turca (EPT) na diminuição da patulina, comparando-o com o conservante sintético benzoato. Adicionando diferentes concentrações do EPT (0,1; 1 e 2 mg/ml) aos sucos de maçã contaminados com a cepa de *P. expansum*, foi observado um significativo efeito inibitório na produção de patulina, similar ao obtido com o benzoato (0,35 mg/ml), sugerindo o potencial da própolis como alternativa aos conservantes sintéticos.

Loebler et al. (2018), investigaram a utilização de extratos de própolis para estender a conservação pós-colheita de morangos. Os autores observaram uma elevada suscetibilidade dos

morangos à deterioração após a colheita, devido à ação de fungos como *Botrytis cinérea* e *Colletotrichum* spp., representando perdas acentuadas no transporte e na comercialização. Com o propósito de avaliar a capacidade antifúngica do extrato de própolis na conservação pós-colheita de morangos, foram realizados testes *in vitro* e *in vivo*, incluindo a pulverização do EEP em diferentes concentrações sobre os morangos após a colheita e o armazenamento a 2°C por 12 dias. Nos testes *in vitro*, todas as concentrações de própolis demonstraram capacidade de inibir o crescimento de *Botrytis cinérea* e *Colletotrichum* spp. Esses resultados foram confirmados pelos testes *in vivo*, evidenciando uma prolongada conservação dos frutos em comparação com os que não receberam tratamento, além das alterações físicas e químicas dos produtos tratados serem menos acentuada (Loebler et al., 2018).

Ainda sobre a sua utilização como aditivo, Vasilaki et al. (2019), avaliaram o uso do extrato de própolis verde (EPV) como substituto do sorbato em bebidas não carbonatadas. Analisaram dois grupos: um contendo EPV a 30% como agente de preservação e outro com sorbato de potássio a 0,03%. As amostras foram armazenadas a temperaturas de 4, 25 e 45°C durante 4 meses. As amostras contendo EPV mostraram uma atividade antioxidante maior, independentemente da temperatura de armazenamento, e uma eficácia na inibição do crescimento de microrganismos de aproximadamente de 77%

Outra área de destaque para o uso de própolis na indústria alimentar é na produção de biofilmes/embalagens para a proteção de alimentos, a fim de aumentar a sua conservação por meio de ação antimicrobiana/antioxidante. Em relação a este tema, Cunha (2017) explorou a viabilidade e o desenvolvimento de embalagens bioativas feitas de amido de mandioca e incorporados com EEP em diferentes concentrações: 0, 30% e 60%. Foram realizadas avaliações da atividade antioxidante e antimicrobiana do biofilme, além de suas características mecânicas. O biofilme demonstrou atividades antioxidante e antimicrobiana, bem como ação bactericida e bacteriostática, contra *S. aureus* (Gram-positivo) e *E. coli* (Gram-negativo). A incorporação do EEP nos filmes melhorou a sua flexibilidade e extensibilidade, tornando-os mais homogêneos e menos ásperos. Além disso, os filmes demonstraram conter compostos fenólicos e atividade antioxidante na matriz polimérica. Os testes realizados nos filmes evidenciaram o seu potencial para serem utilizados como embalagens ativas de alimentos, contribuindo para reduzir a necessidade de antioxidantes sintéticos na conservação de alimentos (Cunha, 2017).

Moreno et al. (2020), avaliaram o efeito da utilização de própolis na elaboração de um biofilme comestível antifúngico para revestimento de framboesas. Fungos (*P. digitatum*, *P. expansum*, *P. italicum*, *A. alternata*, *A. carbonarius* e *B. Cinerea*) foram isolados e cultivados

para posterior contaminação das framboesas. As amostras contaminadas foram revestidas com filmes com e sem EEP e armazenadas por 7 dias sob refrigeração a 5°C. Após 7 dias, as framboesas revestidas apresentaram apenas 20% de incidência de doença, enquanto o grupo controle apresentou incidência de 87%. Assim, a incorporação de extrato de própolis nos filmes de gelatina demonstrou resultados satisfatórios, controlando significativamente os fungos nas framboesas.

Maia et al. (2012), investigaram o potencial antimicrobiano de biofilmes de amido incorporado com própolis vermelha, utilizado como embalagem protetora de folhas de alface. Para tal, folhas de alface inoculadas com *Bacillus cereus*, contaminante muito comum em hortaliças, revestidas com o biofilme, contendo extrato hidroalcólico de própolis vermelha (EHPV), lacradas e armazenadas sob refrigeração durante 5 dias. A contagem bacteriana foi realizada antes e após o período de refrigeração. Os resultados demonstram que o biofilme contendo o EHPV foi eficaz na redução da carga microbiana de *Bacillus cereus*, indicando a possibilidade da sua utilização na proteção de alface e outras hortaliças.

Pires et al. (2019), estudaram o tempo de vida de prateleira de ovos revestidos com um filme feito à base de proteína de arroz e própolis. Os ovos foram imersos em soluções de proteína de arroz contendo 5% e 10% de extrato de própolis e armazenados à temperatura ambiente durante 6 semanas.

Após esse tempo, observaram que o revestimento apresentava um nível satisfatório de hidrofobicidade (tanto para 5% quanto para 10% de EP), proporcionando a vedação necessária e impedindo possíveis perdas de massa devido à desidratação, o que contribuiu para aumentar a sua durabilidade durante o armazenamento. Uma outra aplicação da própolis na indústria alimentar é como aditivo em produtos cárneos, em que as suas propriedades antioxidantes são as mais relevantes (Pires et al., 2019).

2.4. O uso do própolis como antioxidante em produtos cárneos

Em produtos à base de carnes, uma das principais preocupação no que tange a sua conservação está relacionada com o processo de oxidação lipídica/proteica, o qual, conforme já salientado, resulta na redução da qualidade geral do produto e até mesmo na sua perda total. Assim, o uso de aditivos antioxidantes é muito comum em tais alimentos, proporcionando um maior tempo de vida de prateleira. Neste aspecto, a própolis se destaca como potencial aditivo natural, em substituição aos sintéticos, para alimentos cárneos, graças a sua ação antioxidante, além da atividade antimicrobiana, devido à alta concentração de compostos fenólicos (Lacerda

et al., 2011).

De acordo com Assis (2020), o uso de antioxidantes é um dos métodos mais fáceis e eficazes para a redução da oxidação lipídica/proteica em alimentos cárneos, ao passo que estes processos são um dos fatores mais influentes que limitam o seu prazo de validade. Assim, a própolis vem sendo analisada como possível antioxidante natural para carnes e produtos à base de carne, em substituição aos antioxidantes sintéticos, sendo essa uma tendência de mercado, com o aumento na procura por alimentos com rótulo limpo.

Diversas investigações têm sido conduzidas para avaliar o potencial da própolis como aditivo natural. Kunrath et al. (2017), realizaram um estudo com o objetivo de avaliar a capacidade antioxidante do extrato hidroalcolólico de própolis (EHP) a 70% na produção de salame tipo italiano. Foram testadas quatro formulações de salame: 1 (sem antioxidante), F2 (com adição de BHT 0,01%), F3 (com adição de EHP 0,01%) e F4 (com adição de EHP 0,05%). A formulação F4 (com adição de EHP 0,05%) obteve os melhores resultados em comparação com as formulações F3 e F1. No entanto, a formulação F2 (0,01% de BHT) apresentou o menor valor de oxidação lipídica. Os resultados indicaram que a própolis é capaz de inibir a ação oxidativa, podendo ser adicionado em produtos cárneos como um antioxidante natural.

Alves (2009) realizou um estudo sobre o uso de diferentes concentrações (0,1%, 0,2%, 0,3% e 0,4%) de extrato aquoso de própolis (EAP) como aditivo antioxidante em linguiça toscana. Para tanto, as linguiças adicionadas com concentrações do extrato aquoso de própolis foram armazenadas sob refrigeração à 4°C por 27 dias, tendo o valor de Substância Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS) avaliadas nos dias 0, 5, 10, 15, 20 e 27. Os resultados demonstraram que, até o dia 20, todas as concentrações mantiveram o valor de malonaldeído abaixo de 0,50 mg/Kg, indicando a eficácia no controle do processo oxidativo. Já no dia 27, apenas a amostra contendo 0,2% de extrato de própolis manteve um nível de malonaldeído aceitável, sendo essa concentração, portanto, mais eficaz. Também foi analisado o aspecto microbiológico das linguiças com adição de própolis. Observou-se que a inclusão de 0,1%, 0,2% e 0,3% de extrato aquoso de própolis foi eficaz na redução da contagem de microrganismos aeróbios mesófilos, mantendo-a próxima dos valores iniciais ao longo dos 27 dias de armazenamento refrigerado a 4°C (Alves, 2009).

Gutiérrez-Cortés & Suárez (2014) realizaram um estudo para avaliar a atividade antimicrobiana *in vitro* de EEP, além da ação antioxidante quando adicionada a linguiça fresca. Para a análise da atividade antimicrobiana, foi realizado um teste de difusão *in vitro* contra *S. aureus*, *Salmonella* spp., *E. coli* e *Clostridium* spp. com EEP em concentrações de 0,8, 1,2 e 1,6 mg/ml, além de um controle negativo com álcool 96%. Para a análise da atividade

antioxidante, as linguiças foram preparadas de acordo com os seguintes tratamentos: EEP em concentração de 0,8 mg/ml; 0,2 g/Kg de nitrito de sódio e eritorbato de sódio; e álcool 96% (controle). O teor de ácido tiobarbitúrico (TBA), bases nitrogenadas voláteis (TVB-N), propriedades sensoriais e pH foram determinados a cada oito dias, durante quatro semanas. Os resultados da atividade antimicrobiana demonstraram inibição das bactérias patogênicas em todas as concentrações, sem diferenças significativas. Quanto à atividade antioxidante, não foram observadas diferenças significativas entre as concentrações de EEP e o tratamento com nitrito de sódio e eritorbato de sódio nos parâmetros de pH, TVB-N ou propriedades sensoriais ($p > 0,05$). No entanto, foram observadas diferenças significativas nos valores de TBA ($p < 0,05$). Assim, concluíram que o extrato de própolis pode ser utilizado como aditivo, apresentando atividade antioxidante e antimicrobiana (Gutiérrez-Cortés & Suárez, 2014).

2.4.1. Tempo de vida de prateleira e bioatividade de hambúrguer incorporado com própolis

Especificamente sobre hamburguers, alguns estudos têm demonstrado que a própolis pode ser utilizada como aditivo antioxidantes para estes produtos. Vargas-Sanches et al. (2019) investigaram o uso de EEP, BHT e ácido ascórbico contra a oxidação lipídica e proteica de hambúrgueres de carne bovina e suína cruas durante o armazenamento refrigerado (9 dias a 2 °C/). O teor fenólico total (TPC), a capacidade de poder redutor (RPA) e a atividade de eliminação de radicais livres (FRSA) do EEP foram avaliados. Amostras de carne foram avaliadas quanto a oxidação lipídica (TBARS) e oxidação proteica (Carbonyls). Os resultados indicaram que o EEP é rico em conteúdo fenólico e atividade antioxidante, e sua incorporação em hambúrgueres de carne bovina e suína reduziu (a oxidação lipídica e proteica (80% de e 30,6%, respectivamente) ao final dos 9 dias, em relação ao controle (sem aditivos). Além disso, não houve diferença significativa em relação aos resultados de TBARS obtido com o BHT e o ácido ascórbico, ao passo que o EEP foi mais efetivo contra a oxidação proteica, para ambas as carnes. Esses resultados demonstram a possibilidade de substituição de tais aditivos sintéticos antioxidantes por EEP na composição de hambúrgueres suíno e bovino (Vargas-Sanches et al., 2019).

Em outro estudo, Vargas-Sanches et al. (2014), buscaram avaliar a eficácia do EP na redução da oxidação lipídica e do crescimento microbiano em hambúrgueres de carne durante o armazenamento refrigerado. Os hambúrgueres de carne foram produzidos incorporando o EP em 4 tratamentos diferentes: Controle (sem adição de PE); EP comercial 1 (2% p/p); EP comercial 2 (2% p/p); e, EP não comercial (2% p/p). Os hambúrgueres crus foram embalados

com cloreto de polivinila e armazenados a 2 °C por 8 dias. O teor fenólico total (TPC), a FRSA e o teor polifenólico do EP foram avaliados usando cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).

A TBARS, dienos conjugados (CnDs), metamioglobina (MetMb), variação de pH e o crescimento microbiano (bactérias mesofílicas e psicrotróficas) das amostras de hambúrguer foram medidos. O tratamento EP não comercial demonstrou a maior FRS (64,8% a 100 µg/ml), o que se correlacionou com o TPC e a presença de compostos polifenólicos. A oxidação lipídica (78,54%, TBARS; 45,53%, CnD; 58,57%, MetMb) e o crescimento microbiano mesofílico e psicrotrófico (19,75% e 27,03%, respectivamente) foram reduzidos pelos tratamentos com EP em amostras refrigeradas após 8 dias, sendo que o tratamento com EP não comercial apresentou os melhores resultados. Estes resultados indicam que o PE tem grande potencial como aditivo natural antioxidante e antimicrobiano para estender a vida útil de hambúrgueres de carne (Vargas-Sanches et al., 2014).

Reis et al. (2016) avaliaram a atividade antioxidante, características físico-químicas do extrato de própolis microencapsulado (MPC) e seu efeito antioxidante na carne de hambúrguer durante o armazenamento congelado a -15°C por 28 dias. A eficiência do processo de microencapsulação (76,86%), em termos de conteúdo de compostos fenólicos, foi alta, com destaque para o ácido p-cumárico e a epicatequina. Para análise do efeito antioxidantes e de estabilidade oxidativa, foram preparadas três amostras de hambúrguer: T1, com 0,3g de MPC por kg; T2, com 0,1g de eritorbato de sódio por kg; e, T3, sem adição de antioxidante (controle). O efeito antioxidante foi avaliado pelo aumento de malonaldeído (MDA Kg⁻¹ de carne), no dia do processamento e semanalmente durante 28 dias de armazenamento congelado. Os resultados demonstram que os valores de malonaldeído aumentaram para todas as amostras, sendo que o controle (T3) apresentou o maior aumento, seguido do tratamento com eritorbato (T2) e MPC (T1), todos com diferença estatisticamente significativas. T1 mostrou valores mais baixos de malonaldeído durante qualquer dia de armazenamento do T2 e T3. Ainda, em T1, o máximo de valor de malonaldeído (1,08 ± 0,02 mg de malonaldeído por kg) foi alcançado em 14 dias de armazenamento, enquanto no T3 o valor máximo (1,21 ± 0,06 mg de malonaldeído por kg) foi alcançado em 7 dias de armazenamento. Após 14 dias de armazenamento, os valores malonaldeído diminuíram com o tempo de armazenamento em T1 e mostraram em quantidades significativamente menores (p < 0,05) em 28 dias de armazenamento (0,95 ± 0,06 mg de malonaldeído por kg) em comparação com T2 e T3. Esses resultados indicam um forte efeito antioxidante do MPC na carne de hambúrguer, provavelmente é devido à liberação gradual dos compostos bioativos do MPC, corroborando com o uso em substituição aos antioxidantes

sintéticos (Reis et al., 2016).

Na pesquisa de Rodrigues (2019), foram elaborados e avaliados revestimentos biodegradáveis e aditivos alimentares à base de extratos de três tipos de própolis, aplicados em hambúrgueres para conservação. Os extratos foram caracterizados quanto ao perfil químico por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) e utilizados na elaboração de hambúrgueres bovinos, posteriormente armazenados a -18°C por 120 dias. Foram realizadas análises físico-químicas, microbiológicas e sensoriais a cada 30 dias. Os resultados indicaram que os hambúrgueres aditivados com extratos de própolis apresentaram características similares aos tradicionais, atendendo aos padrões de composição estabelecidos pela legislação. Os extratos de própolis também mostraram potencial para reduzir a oxidação lipídica e manter estáveis os parâmetros de pH e acidez, sem afetar as características sensoriais do produto.

CAPÍTULO 3

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Amostra

A amostra de própolis usada neste estudo foi coletada na Serra de Bornes, situada no Norte de Portugal, especificamente na região do Alto Trás-os-Montes, distrito de Bragança. Proveniente de várias colmeias de um apiário local, a própolis estava no estado sólido e apresentava diversas impurezas em sua composição, como abelhas, pedaços de madeira, favos, folhas, traças, entre outros materiais. Dessa forma, foi necessário proceder à remoção física dessas impurezas antes de utilizá-la para análise. Na Figura 3 apresenta-se a amostra antes e depois do processo de purificação.



Figura 3 – Amostra de própolis.

Fonte: A autora (2024)

3.1.1. Preparação do extrato de própolis

Inicialmente, pesaram-se 100,05 g da própolis que foram dissolvidas numa solução de etanol a 80% (v/v). De seguida, a mistura foi transferida para um copo com agitador magnético, mantendo-se em agitação constante por cinco horas em temperatura ambiente. Depois dessa etapa, a amostra foi filtrada com papel de filtro Whatman nº 4 e deixada em processo de filtração durante uma noite. Este processo foi repetido mais quatro vezes, com o objetivo de absorver a maior quantidade de compostos fenólicos (Fig. 4).



Figura 4 – Preparação do extrato de própolis.

Fonte: A autora (2024)

Posteriormente, usou-se um evaporador rotativo com banho-maria para remover o solvente, mantendo a temperatura a 40°C e uma velocidade de 220 rpm (Fig. 5). O frasco com o extrato foi, então, colocado em estufa e pesado repetidamente até atingir peso constante. Na figura 6 é demonstrado o extrato de própolis durante a evaporação e obtido ao final do processo.



Figura 5 – Extrato da própolis no evaporador rotativo.

Fonte: A autora (2024)

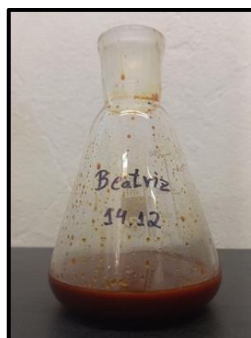


Figura 6 - Extrato de própolis.
Fonte: A autora (2024)

3.2. Análises químicas do extrato de própolis

3.2.1. Preparação da solução de própolis

Para a preparação da solução de própolis, foram pesados 0,2 g do extrato, que foram dissolvidos num balão volumétrico de 25 ml contendo etanol a 80% (v/v). A partir dessa solução inicial, retirou-se 1 ml, que foi transferindo para outro balão volumétrico de 25 ml, que foi completado com água deionizada. Essa solução foi preparada da mesma forma para as análises de fenóis totais, flavonoides totais e atividade antioxidante (DPPH). Na figura 7 apresentam-se as soluções de própolis concentrada e diluída.

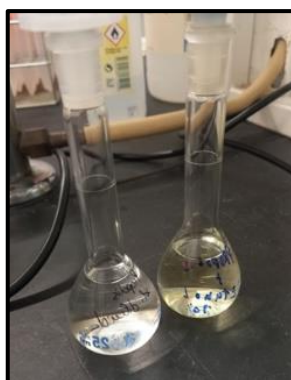


Figura 7 - Soluções de própolis.
Fonte: A autora (2024)

3.2.2. Determinação de compostos fenólicos totais

Para a determinação dos fenóis totais, utilizou-se o método de Folin-Ciocalteu, conforme descrito por Singleton, Orthofer & Lamuela-Raventos (1999), com ligeiras modificações. Em tubos de ensaio, adicionaram-se 0,5 ml da amostra (descrita no item 3.2.1),

2,7 ml do reagente Folin-Ciocalteu a 10% (v/v) e 2 ml de carbonato de sódio (75g/L), que foram colocados em agitação em vórtex. Em seguida, os tubos foram mantidos em repouso, ao abrigo da luz, durante 2 horas. Após esse período, mediu-se a absorvância a 760 nm. Todos os ensaios foram efetuados em triplicado, incluindo o branco com 5 ml de água desionizada (Fig. 8).

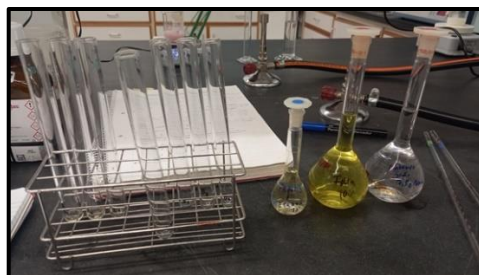


Figura 8 - Análise de compostos fenólicos.
Fonte: A autora (2024)

Para estabelecer a curva de calibração (curva-padrão) dos fenóis totais, o ácido gálico (AG) foi utilizado como padrão. A solução-mãe foi preparada dissolvendo-se 0,1013 g de AG em 100 ml de água desionizada. As concentrações foram obtidas a partir da medição de volumes de 0,5, 0,6, 0,75, 1, 2, 3 e 4 ml da solução-mãe, transferidos para balões volumétricos de 25 ml que foram completados com água desionizada. Em cada tubo de ensaio, adicionaram-se 0,5 ml (descrita no item 3.2.1), 2,7 ml do reagente Folin-Ciocalteu a 10% (v/v) e 2 ml de carbonato de sódio (75g/L). O processo foi repetido para cada concentração. Para solução em branco foi substituída a amostra por 0,5 ml de água desionizada. Após o período de 2 horas, as leituras de absorvância foram realizadas a 760 nm.

3.2.3. Determinação de flavonoides totais

Para a determinação dos flavonoides totais, utilizou-se o método de Woisky & Salatino (1998), com modificações. Em tubos de ensaio, foram adicionados 2,5 ml da amostra (descrita no item 3.2.1) e 2,5 ml de $AlCl_3$ (cloreto de alumínio) a 2% (v/v). Os tubos foram mantidos ao abrigo da luz por 1 hora, e posteriormente leu-se a absorvância a 420 nm. As soluções foram preparadas em triplicado, incluindo um branco com 5 ml de etanol a 80% (v/v).

Para efetuar a curva de calibração para a análise dos flavonoides totais, utilizou-se quercetina (Q) como composto padrão. Para a solução-mãe, dissolveu-se 0,010 g de quercetina em um balão volumétrico de 10 ml com etanol a 100% (v/v). As concentrações foram ajustadas medindo-se volumes de 10, 20, 40, 80, 160, 200, 300 e 400 μ l da solução-mãe, transferindo-os para balões volumétricos de 10 ml e completando com etanol a 80%(v/v). Em seguida, em tubos

de ensaio, foram adicionados 2,5 ml da amostra e 2,5 ml da solução de AlCl_3 , repetindo-se o procedimento para cada concentração. Para o branco, misturou-se 2,5 ml de etanol com 2,5 ml de AlCl_3 . Após um período de 1 hora, realizaram-se as leituras de absorvância a 420 nm.

3.2.4. Determinação do poder redutor pelo método do DPPH

A atividade antioxidante foi avaliada pelo método do bloqueio de radicais livres utilizando 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH), de acordo com o reportado por Hatano et al. (1988). Primeiramente, preparou-se uma solução com 1,2 g de DPPH diluídos em etanol a 80% (v/v) completando o volume num balão volumétrico de 50 ml. Após a diluição, a solução foi submetida a ultrassom.

Em seguida, 0,3 ml da amostra (descrita no item 3.2.1) foram adicionados a tubos de ensaio junto com 2,7 ml da solução de DPPH. As amostras foram deixadas em repouso no escuro por 60 minutos e, então, a absorvância foi medida a 517 nm. Todas as soluções foram preparadas em triplicado, incluindo o branco com 5 ml de etanol a 80% (v/v) e um controle contendo 0,3 ml de etanol a 80% (v/v) e 2,7 ml de DPPH.

Para determinar a curva de calibração do DPPH, foi utilizado o trolox como padrão. A solução-mãe foi preparada dissolvendo-se 0,0063 g de trolox num balão volumétrico de 50 ml, ajustado com etanol a 80% (v/v). As concentrações foram obtidas transferindo-se volumes de 1, 2, 4, 6 e 8 μl da solução-mãe para balões volumétricos de 10 ml e completando-os com etanol a 80% (v/v).

3.3. Produção do hambúrguer

A produção do hambúrguer e as análises ocorreram na Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Bragança, em Portugal. O hambúrguer foi dividido em três porções, resultando nas seguintes subamostras: (F0) Hambúrguer Convencional (controle), com adição de 0,01% (p/p) de ascorbato de sódio; (F1) Hambúrguer com 1% (p/v) de extrato de própolis; e (F2) Hambúrguer com 2% (p/v) de extrato de própolis. Para a preparação, utilizou-se uma mistura de 80% (p/p) de carne bovina e 20% (p/p) de gordura suína (toucinho), e outros ingredientes adquiridos numa grande superfície, em Bragança, Portugal.

Inicialmente, todos os ingredientes foram pesados numa balança analítica. Em seguida, foram adicionadas as quantidades especificadas de carne moída, gordura, sal, alho em pó, cebola em pó, ascorbato de sódio e extrato de própolis, resultando em três formulações,

conforme apresentado na Tabela 2.

Tabela 2 - Formulações dos hambúrgueres bovino.

Matéria-prima	Formulações (%)		
	F0 (controle)	F1 (própolis 1%)	F2 (própolis 2%)
Carne bovina	80	80	80
Gordura suína	20	20	20
Sal	1	1	1
Alho em pó	0,15	0,15	0,15
Cebola em pó	0,15	0,15	0,15
Pimenta preta	0,1	0,1	0,1
Ascorbato de sódio	0,01	0	0
Extrato da própolis	0	1	2

Fonte: A autora (2024)

Após a homogeneização dos ingredientes de cada formulação, os hambúrgueres foram manualmente prensados e moldados, resultando em unidades com aproximadamente 70 g de peso líquido cada. As amostras foram então armazenadas em placas de Petri de vidro até o momento das análises, como demonstrado na Figura 9.



Figura 9 – Amostras de hambúrguer.

Fonte: A autora (2024)

3.4. Avaliação da qualidade microbiológica da própolis e do hambúrguer

No laboratório, foram realizadas análises microbiológicas da própolis bruta e dos cárneos. A qualidade microbiológica dos hambúrgueres foi avaliada nos dias 0, 4, 8 e 12 após a produção mantidos em refrigeração a 4° C. Estas análises tiveram como objetivo garantir a segurança e a qualidade do produto, estabelecendo os produtos estavam livres de contaminações que possam afetar a saúde dos consumidores.

Assim, a avaliação periódica ao longo do tempo permitiu monitorar possíveis alterações na qualidade microbiológica do hambúrguer e da matéria-prima, fornecendo dados relevantes para se realizar o controle de qualidade e para entender a viabilidade da própolis enquanto agente antimicrobiano para produtos cárneos. Foram avaliados diferentes parâmetros:

3.4.1. Contagem total de bolores e leveduras

Para a contagem total de bolores e leveduras, realizada apenas na própolis bruta, utilizou-se o meio Rose Bengal CAF Agar, conforme reportado na ISO 21527-2:2008. A preparação das placas começou com a diluição do meio em água destilada, seguindo as proporções indicadas pelo fabricante. A mistura foi agitada e, em seguida, esterilizada em autoclave a 121°C por aproximadamente 15 minutos. Após o resfriamento a 45-50°C, a solução foi novamente misturada com cuidado para evitar a formação de espuma e distribuída de forma asséptica em placas de Petri.

O procedimento analítico foi realizado em duplicado, inoculando-se 0,1 ml das diluições de 10⁻² a 10⁻⁴ da amostra de própolis. As placas de Petri foram incubadas a 25°C por 5 dias, com observações do crescimento das culturas iniciando após 48 horas. Esta análise foi conduzida pelo método de espalhamento. Os resultados foram expressos em unidades formadoras de colônias por grama de amostra (UFC/g), utilizando a seguinte fórmula:

$$\text{UFC/g} = \Sigma c / [V \times (n_1 + 0,1 n_2) \times d]$$

Onde:

- Σc - soma das colônias em todas as placas contadas;
- V - volume de inóculo semeado em cada placa;
- n₁ - número de placas da primeira diluição contada;

- n_2 - número de placas da segunda diluição contada;
- d - diluição a partir da qual se obtiveram as primeiras contagens.

3.4.2. Contagem total de aeróbios mesófilos totais

Para a contagem dos mesófilos totais presentes na própolis bruta e nos hambúrgueres, foi empregue o meio de cultura Plate Count Agar (PCA) e o método de incorporação da amostra, conforme reportado na norma NP 4405:2002. O procedimento começou com a adição, em duplicata, de 1 ml de cada diluição (10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} e 10^{-8}) das amostras em placas de Petri esterilizadas, quer para a amostra de própolis quer para as amostras de hambúrguer.

Em seguida, foram adicionados de 15 a 20 ml do meio PCA, e as placas foram agitadas suavemente com movimentos circulares para garantir a homogeneização. Após a solidificação do meio, as placas foram invertidas e incubadas em estufa a 30°C por um período de 48 a 72 horas.

3.4.3. Pesquisa e contagem *Escherichia coli*/coliformes totais

Para a pesquisa e quantificação de coliformes e *Escherichia coli* na própolis bruta e nos hambúrgueres, foi utilizado o kit SimPlate (Biocontrol®) (Biorrad), aprovado pelo método oficial AOAC 989.13 e desenvolvido pelas empresas BioControl e Ambifood. O meio foi preparado seguindo as orientações do fabricante. Primeiramente, adicionou-se 1 mililitro das amostras, nas diluições (10^{-1} e 10^{-2}), a 9 mililitros do meio em tubos de ensaio. Em seguida, o conteúdo foi transferido para placas com 84 poços e incubado a 37°C por 24 horas.

A quantificação dos coliformes foi realizada contando os poços que apresentaram mudança na coloração do meio. A presença de *E. coli* foi confirmada pela observação dos poços sob luz ultravioleta (UV) a 365 nm, verificando-se a fluorescência. A contagem dos coliformes totais e de *E. coli* foi feita mediante a tabela de conversão fornecida pelo fabricante. Os resultados foram expressos em unidades formadoras de colônias por grama de amostra (UFC/g).

3.4.4. Pesquisa e contagem de *Staphylococcus aureus*

A pesquisa e quantificação de *Staphylococcus aureus* foi realizada inoculando 0,1 ml de cada diluição decimal da amostra de própolis e de hambúrguer, inoculadas em placas contendo o meio seletivo Baird-Parker (Merk, Alemanha) enriquecido com gema de ovo. As

placas foram incubadas a 37°C por um período de 24 a 48 horas. Os resultados foram apresentados em unidades formadoras de colônias por grama da amostra (UFC/g), de acordo com as diretrizes estabelecidas na norma NP 4400-1:2002.

3.4.5. Pesquisa e contagem de *Bacillus Cereus*

A pesquisa e quantificação de *Bacillus cereus* foi feita apenas na própolis bruta, utilizando a técnica de contagem em placa, conforme a norma ISO 7932:2004. Para isso, 0,1 ml de cada diluição decimal foi espalhado na superfície de placas de Petri contendo ágar seletivo para *B. cereus*. As placas foram incubadas a 30°C por um período de 24 a 48 horas. Os resultados foram expressos em unidades formadoras de colônias por grama de amostra (UFC/g).

3.4.6. Contagem de esporos de clostrídios sulfito-redutores

A investigação e quantificação de esporos de clostrídios sulfito-redutores, tanto para a própolis bruta como para as amostras de hambúrgueres, foi realizada seguindo a norma ISO 15213:2003, utilizando o método de incorporação. Inicialmente, 1 ml de cada amostra, nas diluições (10^{-1} e 10^{-2}) foi adicionado a tubos de ensaio estéreis, que foram submetidos a um banho-maria a 80°C por 10 minutos. Após o resfriamento, o meio de cultura seletivo e diferencial foi adicionado à amostra. Os tubos foram incubados a 37°C por 5 dias. Após esse período, foram contadas as colônias negras que se formaram (Fig. 10).

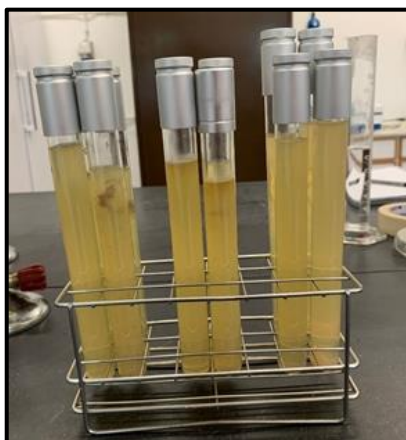


Figura 10 – Procedimento de contagem de esporos de clostrídios sulfito-redutores.

Fonte: A autora (2024)

3.4.7. Pesquisa de *Salmonella* spp.

A pesquisa de *Salmonella* spp., realizada apenas nos hambúrgueres, foi feita com o uso do kit 1-2TEST, aprovado pelo método oficial AOAC 989.13 e desenvolvido pelas empresas BioControl e Ambifood. O procedimento inicia com o pré-enriquecimento da amostra em água peptonada a 37°C por 24 horas. Após esse período, o teste foi realizado conforme as orientações do fabricante e mantido a 37°C por mais 24 horas. Os resultados foram avaliados visualmente pela presença de uma banda de imunoprecipitação. Na Figura 11 estão representados os kits de detecção de *Salmonella* spp. já inoculados.

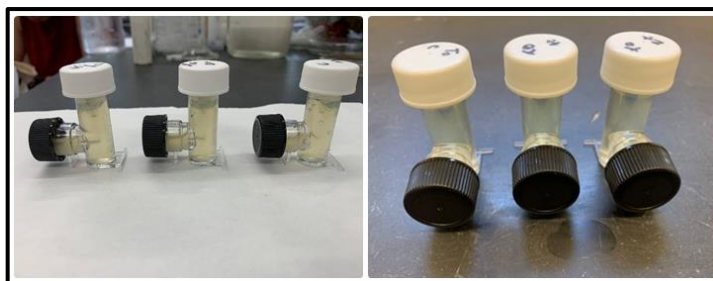


Figura 11 - Pesquisa de *Salmonella* spp.

Fonte: A autora (2024)

3.5. Testes físico-químicos nos hambúrgueres

3.5.1. pH

Para realizar o teste de pH, utilizou-se um medidor digital. Foram pesados 5 g de cada amostra das formulações de hambúrguer, que foram então dissolvidas em 50 ml de água destilada para a análise do pH.

3.5.2. Teor de proteína

Para a determinação do teor de proteína total no hambúrguer, foi adotado o método descrito na AOAC – Análise do Método Oficial 950.36. O procedimento começou com a digestão da amostra, pesando-se 5 g de cada amostra homogeneizada e colocados num tubo Kjeldahl. Posteriormente, adicionou-se 20 ml de ácido sulfúrico concentrado e duas pastilhas de catalisação (composição de 99,9% K₂SO₄ e 0,1% Se).

Os tubos foram então submetidos à mineralização numa unidade de aquecimento

(modelo DK 8-Heating Digester) a uma temperatura de 420°C durante 60 minutos. Após o arrefecimento das amostras (aproximadamente 50°C), deu-se início ao processo de destilação numa unidade destiladora (modelo UDK-Semi-Automatic Distillation Unit), seguido pela titulação com HCl a 0,2 N. Para calcular a percentagem de proteína presente nas amostras de hambúrguer, foi primeiramente determinado o percentual de nitrogênio livre nas amostras utilizando a seguinte fórmula:

$$\% \text{ azoto} = \frac{V \times [HCl] \times 0,014}{m} \times 100$$

Após a quantificação da percentagem de nitrogênio, procedeu-se ao cálculo da percentagem de proteína utilizando a seguinte equação:

$$\% \text{ proteína} = \% \text{ azoto} \times 6,25$$

Utilizando o fator de conversão de $f = 6,25$ para amostras de carne.

3.5.3. Determinação do teor de gordura

O teor total de gordura nas amostras de hambúrguer foi analisado segundo o método AOAC 920.85, que envolve a extração de gordura em um aparelho Soxhlet (modelo Behrotest), utilizando éter de petróleo como solvente. Foram pesados cerca de 2 g da amostra, que foram colocada num cartucho Soxhlet. O cartucho foi, então, posicionado no extrator, que foi acoplado a um balão de fundo achatado previamente tarado a 105°C. Foram adicionados 170 ml de éter de petróleo, e o sistema foi equipado com um condensador. O aquecimento foi mantido com uma manta elétrica durante 6 horas.

Após esse período, o cartucho foi removido, o solvente foi destilado e o balão com o resíduo extraído foi colocado em uma estufa a 105°C por uma hora. Após o arrefecimento até se atingir a temperatura ambiente, o balão foi pesado. A percentagem de gordura foi calculada utilizando a seguinte fórmula:

$$\% \text{ teor de gordura} = \frac{m_{final} - m_{inicial}}{m_{amostra}} \times 100$$

3.5.4. Determinação do teor de umidade

A quantificação do teor de umidade efetuada pela técnica de perda de peso em estufa a 105°C. Inicialmente, os cadinhos foram calcinados e, em seguida, arrefecendo num dessecador até atingirem a temperatura ambiente. No final, foram pesados para determinar a massa do cadinho vazio (m_c). Em seguida, aproximadamente 4 gramas da amostra (massa inicial, m_i) foram colocadas em cadinhos devidamente identificados. Os cadinhos foram pesados em intervalos regulares até peso constante (massa final, m_f). Os resultados foram expressos em percentagem de umidade, utilizando a seguinte fórmula:

$$\% \text{ umidade} = \frac{m_i - m_f}{m_i - m_c} \times 100$$

Em que:

- m_i - massa inicial do cadinho com a amostra (g);
- m_f - massa do cadinho com a amostra após secagem (g);
- m_c - massa do cadinho vazio (g).

3.5.5. Determinação do teor em cinzas

O teor de cinzas foi avaliado pelo método de incineração, de acordo com a norma oficial nº 923.03 da AOAC. Os testes foram realizados em duplicado. Para tal, os cadinhos vazios foram inicialmente colocados numa estufa a 105°C por 1 hora. Após esse período, foram arrefecidos num dessecador até a temperatura ambiente e pesados (massa do cadinho vazio, m_c). Em seguida, cerca de 2 g de cada amostra foram colocadas nos cadinhos identificados (massa inicial, m_i). Os cadinhos foram, então, transferidos para uma mufla (modelo Box Furnace 51894) e incinerados a 600°C por 12 horas. Após a incineração, estes foram resfriados novamente no dessecador até a temperatura ambiente e pesados (massa final, m_f). Os resultados foram expressos em percentual de cinzas utilizando a seguinte fórmula:

$$\% \text{ cinza} = \frac{m_i - m_f}{m_i - m_c} \times 100$$

Em que:

- m_i - massa inicial do cadinho com a amostra (g);
- m_f - massa do cadinho com a amostra após secagem (g);
- m_c - massa do cadinho vazio (g).

3.6. Análise sensorial das amostras de hambúrguer

A análise sensorial das amostras de hambúrguer foi realizada com a participação voluntária de 20 alunos e professores do Instituto Politécnico de Bragança - IPB, com idades entre 18 e 65 anos. O método de investigação utilizado foi uma ficha de avaliação contendo cinco parâmetros de análise sensorial: cor, aroma, sabor, textura e impressão global. Para cada parâmetro, os participantes atribuíam uma nota de 1 a 5, correspondendo às seguintes opções de avaliação:

- 1: Desgostei muito;
- 2: Desgostei moderadamente;
- 3: Nem gostei, nem desgostei;
- 4: Gostei moderadamente.
- 5: Gostei muito.

Para a realização da avaliação, cada participante degustou uma amostra dos hambúrgueres e atribuiu uma nota correspondente à sua experiência em relação a cada parâmetro analisado. Para garantir imparcialidade, as amostras foram codificadas, possibilitando um teste cego. Os códigos utilizados foram: A1 – Hambúrguer tradicional (adicionado de ascorbato de sódio); B2 – Hambúrguer com 1% de extrato de própolis; C3 – Hambúrguer com 2% de extrato de própolis.

Antes da degustação, os participantes foram questionados sobre possíveis alergias alimentares. Somente aqueles que não apresentaram restrições a nenhum dos ingredientes ou aditivos utilizados puderam participar da avaliação. Para evitar interferências no paladar entre as amostras, entre cada degustação, foi disponibilizado no local bolachas de água e sal e água. Na figura 12 apresenta-se a ficha de avaliação utilizada, enquanto na figura 13 é ilustrado o local preparado para a análise sensorial.

Nome: _____ Idade: _____

Você está recebendo três amostras de hambúrguer bovino. Avalie cada uma das amostras codificadas e use a escala abaixo para indicar o quanto gostou ou desgostou de cada uma.

5 – Gostei muito
 4 – Gostei moderadamente
 3 – Nem gostei, nem desgostei
 2 – Desgostei moderadamente
 1 – Desgostei muito

Amostra	Cor	Aroma	Sabor	Textura	Impressão Global

Comentários: _____

Figura 12 – Ficha de avaliação sensorial.
 Fonte: A autora (2024)

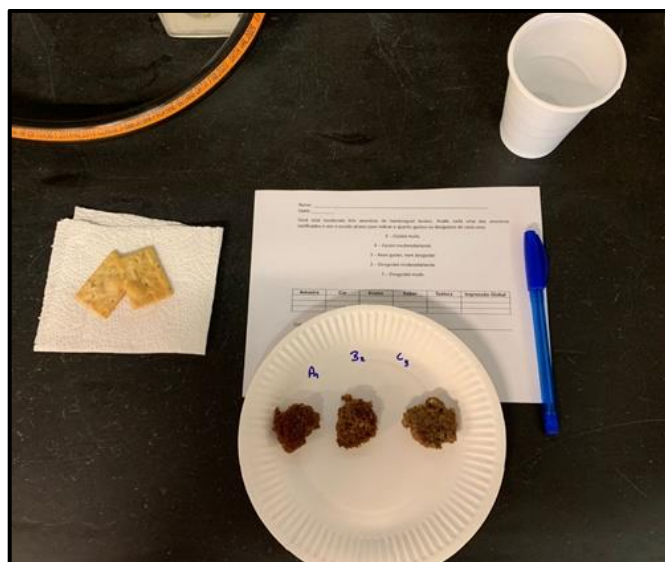


Figura 13 – Local de avaliação.
 Fonte: A autora (2024)

CAPÍTULO 4

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Composição química do extrato de própolis

Os resultados das análises de composição química do extrato de própolis confirmaram a presença de compostos fenólicos na própolis utilizada na pesquisa, os quais segundo o reportado na literatura (Salgueiro & Castro, 2016) são responsáveis pelas capacidades antioxidante, antimicrobiana e outros benefícios que são atribuídos a este produto apícola. Na Tabela 3 observam-se os resultados obtidos.

Tabela 3 – Resultados da análise da composição química do extrato de própolis

	Fenóis Totais (mg eq. Ácido Gálico/g)	Flavonoides (mg eq. Quercetina/g)	DPPH (mg eq. Trolox/g)
Extrato da própolis ¹	433 ± 8,33	65 ± 1,65	4,26 ± 0,030

¹ Resultados expressos em média ± desvio-padrão.

Fonte: A autora (2024)

Na globalidade, os resultados obtidos eram esperados, considerando que a presença de compostos fenólicos, flavonoides e a capacidade antioxidante da própolis, demonstrada pela análise DPPH, são amplamente documentadas na literatura, corroborando os nossos resultados. Conforme descrito por Sousa et al. (2019), embora a composição química da própolis possa variar em função de diversos fatores, como origem geográfica, tipo de abelha, uso dentro da colmeia e disponibilidade de resinas, a presença de compostos fenólicos é uma característica inerente a esta substância.

Isto deve-se ao fato de a própolis ser formada, em parte, por materiais vegetais provenientes de diferentes plantas, as quais possuem naturalmente compostos fenólicos na sua estrutura. Alguns destes compostos têm demonstrado efeitos benéficos, incluindo propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias, antimicrobianas, entre outros (Bertrams et al., 2013).

Os compostos fenólicos têm sido amplamente investigados nos últimos anos, especialmente para formulação de fitoterápicos e outras aplicações em diversas áreas. Sua principal vantagem reside no fato de serem uma substância naturalmente produzida pelas plantas, eliminando a necessidade de processos químicos complexos para a sua síntese (Albuquerque et al., 2021). Essa característica atende à crescente demanda por alternativas

naturais e de baixo impacto ambiental em substituição aos produtos químicos convencionais amplamente utilizados na indústria em diversos setores (Araújo et al., 2016).

No caso específico da própolis, durante a sua produção pelas abelhas, os compostos fenólicos são incorporados a partir das resinas vegetais utilizadas na sua produção, conferindo ao produto as suas propriedades bioativas características (Sousa et al., 2019).

Em relação aos resultados obtidos, outros estudos também identificaram a presença de compostos fenólicos em extrato de própolis, com uma variação nas quantidades, o que é inerente à substância. Araújo et al. (2016), avaliaram a composição química da própolis produzida por três espécies de abelhas (*Apis mellifera*, *Melipona scutellaris* e *Melipona fasciculata*). Em relação ao total de fenóis, os autores relataram valores variando de $121 \pm 3,05$ mg eq. AG/g (*A. mellifera*) a $631 \pm 4,22$ mg eq. AG/g (*M. fasciculata*).

Cabral et al. (2019) indentificaram a presença de fenóis totais, com teor de 257 mg eq. AG/100 g, em extrato etanólico de própolis vermelha produzida por abelhas *A. mellifera* no Brasil. Franz et al. (2018) observaram um valor de $61,15 \pm 11,60$ mg eq. AG/g de fenóis totais para própolis bruta produzida por abelhas *A. mellifera* em apiários localizados no bioma Pantanal, no Brasil. Alves e Kubota (2013) compararam seis amostras comerciais de extrato de própolis quanto ao teor de fenóis totais tendo obtido valores que variaram de $70,60 \pm 0,24$ mg eq. AG/100g a $539 \pm 1,5$ mg eq. AG/100g.

Santini et al. (2021), ao analisarem o impacto da concentração da solução etanólica utilizada no processo de extração sobre o teor de compostos fenólicos em extratos etanólicos de própolis verde, observaram teores de fenóis totais que variaram entre $121,54 \pm 2,13$ (extrato etanólico de própolis com 50% de etanol na solução) a $103,27 \pm 3,67$ (extrato com 90% de etanol na solução).

Assim, constata-se que, embora a presença de compostos fenólicos seja uma característica inerente à própolis, a sua concentração pode variar amplamente devido a fatores que influenciam a sua composição química. Além disso, como sugere o estudo de Santini et al. (2021), o processo de extração também pode interferir na concentração destas substâncias em extratos de própolis.

Relativamente aos flavonoides, são um subgrupo dos compostos fenólicos que se destacam pela sua capacidade antioxidante. A capacidade antioxidante dos flavonoides está associada à sua atuação na neutralização de radicais livres, principais responsáveis pelo processo oxidativo (Arruda, 2013).

Os radicais livres são moléculas cujos átomos possuem número ímpar de elétrons, o que os torna altamente reativos. Os flavonoides desempenham seu papel antioxidante ao inativar

esses radicais tanto em organelos celulares lipofílicos quanto hidrofílicos. Estes possuem a capacidade de doar átomos de hidrogênio, interrompendo, assim, as reações em cadeia desencadeadas pelos radicais livres (Lima & Bezerra, 2012).

Como observado nos resultados deste estudo, o extrato de própolis analisado possui flavonoides na sua composição, com teores de $65 \pm 1,65$ mg eq. Quercetina/g. Franz et al. (2018), observou um teor de $11,15 \pm$ mg eq. Quercetia/g de amostra em extrato de própolis verde. Já Alves e Kubota (2013) constataram um teor de flavonoides que variou de $48,95 \pm 0,13$ a $114,50 \pm 0,13$ mg eq. Quercetina/100g. Deste modo, os flavonoides embora estejam sempre presentes, também apresentam variações entre os diferentes tipos de própolis.

Por fim, o extrato de própolis analisado também demonstrou potencial antioxidante, como evidenciado nos resultados obtidos pelo método DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil). Segundo Oliveira (2015), a molécula de DPPH é um radical orgânico livre estável, amplamente utilizada para medir a capacidade antioxidante de diversas substâncias. Geralmente, o método consiste em quantificar a capacidade da amostra testada em neutralizar o DPPH, o que reflete diretamente seu potencial antioxidante.

Neste estudo, observou-se um valor de $4,26 \pm 0,030$ mg eq. Trolox/g, o que demonstra que o extrato de própolis utilizado possui potencial antioxidante, como esperado considerando os teores de compostos fenólicos e, sobretudo, o de flavonoides observados, sendo que estes últimos se destacam pela elevada capacidade antioxidante. Esse resultado também foi corroborado por outros autores que evidenciaram o potencial antioxidante de diferentes extratos de própolis, como Santini et al. (2021) ($6,49 \pm 0,11$ a $23,45 \pm 0,12$ $\mu\text{g/mL}$) e Araújo et al. (2016) ($29,81 \pm 2,49$ a $845,38 \pm 31,60$ $\mu\text{g/mL}$).

4.2. Análise microbiológica da própolis e do hambúrguer

4.2.1. Análise microbiológica da própolis bruta

Nas análises microbiológicas realizadas na própolis bruta, foi observada a presença da maioria dos microrganismos investigados (contagem total de bolores e leveduras, contagem total de *Bacillus cereus*, pesquisa e contagem de coliformes totais e *Escherichia coli* e contagem total de aeróbios mesófilos) com exceção de contagem de esporos de clostrídios sulfitorreduzores e contagem de *Staphylococcus aureus* (coagulase positiva), conforme se pode demonstrar na Tabela 4

Tabela 4 – Resultados da análise microbiológica da própolis bruta

Amostra	Bolores e Leveduras (log UFC/mL)	<i>Bacillus cereus</i> (log UFC/mL)	Clostrídios sulfito-redutores (log UFC/mL)	Coliformes totais (UFC/mL)	<i>E. coli</i> (UFC/mL)	<i>S. aureus</i> (UFC/mL)	Mesófilos totais (log UFC/mL)
Própolis bruta	3,65	2,50	<10	1,45x10 ⁴	2,20x10 ²	<10	5,89

Fonte: A autora (2024)

Essa contaminação da própolis bruta por microrganismos justifica-se, considerando as condições inerentes ao seu processo de produção e manipulação. A colmeia, como ambiente natural, abriga não apenas abelhas, mas também uma diversidade de fungos e bactérias, provenientes quer das plantas de onde as resinas são coletadas quer do próprio ecossistema interno (Souza, 2015). Além disso, as plantas utilizadas podem conter esporos de fungos e bactérias oriundas do solo, do ar ou de outros fatores ambientais (Santos, 2007).

A recolha também pode acarretar contaminações. Práticas inadequadas de coleta, como o uso de ferramentas ou recipientes não higienizados, e o armazenamento em condições impróprias, como locais úmidos ou sujos, aumentar os riscos de contaminação. O transporte da própolis em ambientes contaminados ou recipientes mal vedados pode acarretar a exposição a patógenos (Breyer et al., 2016).

Outra possibilidade é a própria composição natural da própolis que, devido à sua textura pegajosa, facilita a retenção de partículas de poeira e microrganismos do ar ou do ambiente. Além disso, fatores climáticos, como alta umidade e temperaturas inadequadas, favorecem o crescimento microbiano, especialmente de fungos e bactérias (Costa et al., 2020). Desta forma, mesmo que a própolis possua propriedades antimicrobianas, que inibem o crescimento de muitos patógenos, essas características não garantem completa proteção contra contaminações.

Relativamente aos parâmetros microbiológicos analisados, os bolores e leveduras têm relevância em alimentos, seja pela produção de micotoxinas prejudiciais aos seres humanos ou pela decomposição de alimentos (Lima et al., 2023).

A presença de bolores e leveduras na própolis é amplamente relatada na literatura, sendo uma observação comum em amostras de própolis bruta. Neste estudo, o valor encontrado foi de log₁₀ 3,65 UFC/mL (4,3 x 10³ UFC/mL, aproximadamente). Lima (2015) verificou a presença destes microrganismos em amostras de geoprópolis de *Mellipona scutellaris* provenientes de dois meliponários distintos, com médias de 6,6 x 10⁷ UFC/g e 1,1 x 10⁸ UFC/g. Santos (2007) também constatou o crescimento de fungos em geoprópolis de *M. scutellaris*. Ferreira (2021) constatou que as contagens de bolores e leveduras na geoprópolis de *M. q. anthidioides*

variaram entre $2,0 \times 10$ UFC/g e $8,1 \times 10^2$ UFC/g.

A presença de bolores e leveduras na própolis está relacionada com diversos fatores. Em períodos de escassez, as abelhas podem recorrer a diferentes substratos, como fungos, solo e matéria orgânica, para atender às suas necessidades. Algumas espécies, apesar do valor nutricional serem inferior, utilizam fungos como alternativa ao pólen, devido à sua elevada disponibilidade (Meireles, 2018).

Além disso, a microbiota associada às abelhas, composta por fungos e leveduras, desempenha papéis essenciais, como a complementação alimentar, a conservação de alimentos e a proteção da colônia contra parasitas (Tiago, 2017). Leveduras do gênero *Candida*, por exemplo, contribuem para a preservação do pólen, enquanto outras, como *Scaptotrigona depilis*, são fundamentais para o desenvolvimento das larvas. Adicionalmente, as leveduras são organismos amplamente disseminados na natureza, quer por vias naturais, como vento e insetos, quer por ações humanas, como a migração (Paludo et al., 2018).

Outro microrganismo analisado foi *Bacillus cereus*, uma bactéria formadora de esporos e aeróbia facultativa, frequentemente encontrada em diversos alimentos crus ou processados. Esse microrganismo é conhecido por sua capacidade de produzir toxinas, sobretudo enterotoxinas. A ingestão de alimentos com concentrações superiores a 10^6 UFC/g dessa bactéria, valor abaixo do detectado nesta pesquisa, pode levar a casos de intoxicação alimentar (Ferreira, 2021). Essa espécie está entre as principais responsáveis por surtos alimentares, sendo associada a sintomas como diarreia e vômitos, causados pela ação de suas enterotoxinas (Barretto & Silva, 2006). Nestes estudo, a análise microbiológica da própolis antes da extração revelou um valor de \log_{10} 2,50 UFC/mL, ou $3,0 \times 10^2$ UFC/mL, aproximadamente. Na pesquisa realizada por Ferreira (2021), foram observados níveis deste microrganismos em geoprópolis de *M. q. anthidioides* variando entre $1,0 \times 10^2$ e $9,6 \times 10^2$ UFC/g. De maneira similar, Ramos (1997) investigou a flora microbiana em colônias de *M. scutellaris*, observando contagens de *Bacillus cereus* de $5,3 \times 10^6$ UFC/g em geoprópolis. A presença de bactérias do gênero *Bacillus* na própolis pode ser explicada pela sua participação em processos de fermentação, como as fermentações acéticas e lácticas, que ocorrem no mel e no pólen (Menezes, 2015).

Os coliformes são um grupo de bactérias que habitam o trato intestinal do homem e dos animais, portanto, são indicadores essenciais para contaminação ambiental. Entre os coliformes, a *Escherichia coli* destaca-se no âmbito da saúde humana (Barretto & Silva, 2006). Embora a maioria das estirpes de *E. coli* integre a flora comensal do intestino de animais de sangue quente, algumas variantes são patogênicas. A infecção por *E. coli* é transmitida

principalmente por três vias: contato direto com animais infectados, interação com outros seres humanos e ingestão de alimentos contaminados (Noronha et al., 2019).

Neste estudo, os níveis de coliformes totais e *E. coli* detectados na própolis bruta foi de $1,45 \times 10^4$ e $2,2 \times 10^2$ UFC/g, respectivamente. Resultados semelhantes foram relatados por Lima (2015), que observou a presença dessas bactérias em amostras de geoprópolis de *M. scutellaris*, com contagens variando de $9,1 \times 10^7$ a $2,8 \times 10^8$ UFC/g para coliformes totais e de $8,1 \times 10^7$ a $1,4 \times 10^8$ UFC/g para *E. coli*. Ferreira (2021) também registrou a presença de coliformes totais e *E. coli* em geoprópolis de abelhas do gênero *M. q. anthidioides*, apresentando valores de $2,1 \times 10^3$ NMP/g (Número Mais Provável por grama) para coliformes totais e 4,0 NMP/g para *E. coli*. O autor salientou ainda que a presença de coliformes termotolerantes, isto é, de origem intestinal, como *E. coli*, em alimentos não implica necessariamente contaminação de origem fecal. Entretanto, pode ser um indicador de falhas na higiene durante o processo de coleta ou de contaminação após o processamento (Ferreira, 2021).

Outra análise realizada foi a contagem total de aeróbios mesófilos. Os mesófilos correspondem a um grande grupo de bactérias e, no âmbito da segurança alimentar, a sua contagem é um parâmetro utilizado para controlar a qualidade comercial dos alimentos (Lozano et al., 2021). Ferreira (2021) destaca que, embora os microrganismos mesófilos não estejam diretamente relacionados com a presença de patógenos ou toxinas, eles são importantes para avaliar a segurança dos alimentos, pois podem indicar falhas nas condições sanitárias. No nosso trabalho para os mesófilos totais, registaram-se valores de $\log_{10} 5,89$ UFC/mL, equivalente a $7,5 \times 10^5$ UFC/mL. Ferreira (2021) detectou um valor de $1,9 \times 10^3$ UFC/g para as bactérias aeróbias mesófilas em amostras de geoprópolis da *M. q. anthidioides*. Lima (2015), por sua vez, reportou uma concentração de $1,0 \times 10^{10}$ UFC/g na geoprópolis de *M. scutellaris*. Dias et al. (2012), em própolis produzida em Portugal, observaram valores médios de $7,16 \times 10^4$ UFC/g para microrganismos aeróbios mesófilos.

Por fim, *Salmonella* spp. e esporos de clostrídios sulfito redutores estavam ausentes na amostra analisada, o que também foi observado por Lima (2015) e Ferreira (2021). As bactérias do gênero *Salmonella* estão amplamente distribuídas em todo o mundo, sendo comuns em ambientes de produção animal, o que as torna um importante problema sanitário para a saúde pública (Domingos et al., 2015).

Já os clostrídios sulfito-redutores são bactérias anaeróbicas que atuam na redução de sulfatos a sulfetos (Pereira et al., 2024). Assim, a ausência de *Salmonella* spp. ou de esporos de clostrídios sulfito-redutores na própolis bruta, pode indicar que há forte atividade antimicrobiana da própolis contra esses microrganismos e/ou que eles não encontraram um

ambiente adequado para proliferação neste tipo de substrato.

4.2.2. Análise microbiológica das amostras de hambúrgueres

Os resultados da análise microbiológica das amostras de hambúrgueres demonstram a eficácia do extrato de própolis como aditivo antimicrobiano, tanto na concentração de 1% (F1) quanto na de 2% (F2). A inclusão do extrato de própolis nas formulações foi capaz de inibir a presença de *Salmonella* spp., clostrídios sulfito-redutores, coliformes totais, *E. coli* e *S. aureus* aos oito dias, tanto nas amostras F1 e F2 quer na amostra controle (F0), à qual foi adicionado ascorbato de sódio a 0,01%. No dia 12, observou-se a presença de clostrídios sulfito-redutores apenas nas amostras F0 (controle) e F1 (própolis 1%), com ausência dessa contaminação na F2 (própolis 2%), o que está correlacionado com a maior concentração do extrato de própolis.

Quanto aos mesófilos totais, todas as amostras apresentaram contagens semelhantes no início do estudo (dia 0), com \log_{10} 7,59 UFC/mL para F0, \log_{10} 7,70 UFC/mL para F1 e \log_{10} 7,33 UFC/mL para F2. No dia 12, a amostra F0 apresentou valores muito elevados. A amostra F1 apresentou uma contagem de \log_{10} 10,38 UFC/mL, um aumento de 2,68 \log_{10} UFC/mL em relação ao dia 0, embora ainda inferior ao aumento observado no controle. A F2 destacou-se com uma contagem de 8,30 \log_{10} UFC/mL, registrando um aumento de apenas 0,97 \log_{10} UFC/mL durante este período. Esses resultados indicam que o extrato de própolis é mais eficaz que o ascorbato de sódio no controle da proliferação de mesófilos totais no hambúrguer, sendo que uma concentração maior de própolis intensifica a inibição dessas bactérias.

Na Tabela 5 apresentam-se os resultados da análise microbiológica das várias formulações de hambúrgueres.

Tabela 5 - Resultados da análise microbiológica das amostras de hambúrguer

Amostra	Tempo (dias)	<i>Salmonella</i> spp.	Clostrídios sulfito-redutores	Coliformes totais	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	Mesófilos totais (log UFC/mL)
F0 ¹	0	ausente	<10	<10	<10	<10	7,59
	4	ausente	<10	<10	<10	<10	8,16
	8	ausente	<10	<10	<10	<10	9,29
	12	ausente	positivo	<10	<10	<10	Incon.
F1 ²	0	ausente	<10	<10	<10	<10	7,70
	4	ausente	<10	<10	<10	<10	7,22
	8	ausente	<10	<10	<10	<10	8,80
	12	ausente	positivo	<10	<10	<10	10,38
F2 ³	0	ausente	<10	<10	<10	<10	7,33
	4	ausente	<10	<10	<10	<10	7,40
	8	ausente	<10	<10	<10	<10	7,56
	12	ausente	<10	<10	<10	<10	8,30

¹ Hambúrguer com adição de ascorbato de sódio (0,01%). ² Hambúrguer incorporado com extrato de própolis a 1% da composição. ³ Hambúrguer incorporado com extrato de própolis a 2% da composição.

Os resultados obtidos demonstram que o extrato de própolis apresenta potencial antimicrobiano significativo quando incorporado em produtos cárneos, como hambúrgueres. A ausência de microrganismos patogénicos — *Salmonella* spp., coliformes totais, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* — em todas as amostras durante os 12 dias de armazenamento indica condições higiénico-sanitárias adequadas na preparação dos produtos, mas também sugere que os compostos bioativos presentes na própolis podem contribuir para a inibição do crescimento de microrganismos contaminantes.

No caso dos esporos de clostrídios sulfito-redutores, a sua deteção apenas ao 12.º dia nas amostras F0 (controlo com ascorbato de sódio) e F1 (1% de extrato de própolis), mas não na F2 (2% de extrato de própolis), reforça a hipótese de que o efeito antimicrobiano do extrato é dose-dependente. A capacidade da própolis em inibir germinação e desenvolvimento de esporos poderá estar relacionada com a presença de compostos fenólicos e flavonoides, os quais atuam por mecanismos como a desestabilização da membrana celular, inibição enzimática e interferência no metabolismo microbiano (Juneja, Marks, 2002).

Adicionalmente, a análise da carga microbiana aeróbia mesófila revelou uma tendência decrescente do crescimento microbiano em função do aumento da concentração de extrato de

própolis. A amostra F0 apresentou a maior carga microbiana, seguida da F1 e, por último, da F2. Este comportamento sugere que o extrato não só prolonga a estabilidade microbiológica do produto, como também poderá atuar retardando o crescimento de flora deterioradora, o que é fundamental para a extensão da vida útil de produtos cárneos minimamente processados (Bankova, 2005).

Estes resultados vão de encontro ao reportado na literatura em relação à capacidade do extrato de própolis enquanto aditivo com capacidade bactericida e bacteriostática. Cunha (2017) observou que o biofilme produzido com extrato etanólico de própolis (EPP), método de extração utilizado nesta pesquisa, foi capaz de inibir a presença de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. Gutiérrez-Cortés & Suárez (2014) também obtiveram resultados positivos para a inibição *in vitro* de *S. aureus*, *Salmonella* spp., *E. coli* e *Clostridium* spp. com EEP. Vargas et al. (2004) observaram que a adição de EEP demonstrou atividade antibacteriana *in vitro*, inibindo o crescimento de bactérias, como *Staphylococcus* spp., *Salmonella* spp. e *E. coli*.

Especificamente como aditivo para produtos cárneos, Vargas-Sanches et al. (2014) avaliaram a eficácia do extrato de própolis no crescimento microbiano em hambúrgueres de carne durante o armazenamento refrigerado. Os seus resultados estão de acordo com os obtidos neste estudo, em que o extrato de própolis reduziu a população de mesófilos totais em 19,75%, após 8 dias de armazenamento refrigerado, em comparação com o hambúrguer sem adição de conservantes.

Rodríguez et al. (2023), investigaram o efeito da adição de extrato de própolis a 0,5% na contagem total de *S. aureus* em hambúrgueres feitos com carne de alpaca durante um mês. Os resultados revelaram que a contagem inicial, inferior a 10 UFC/g na primeira semana, aumentou para 15 UFC/g na quarta semana. O desempenho foi considerado indicativo da eficácia do extrato de própolis como agente bacteriostático para a bactéria testada, uma vez que o limite máximo permitido para *S. aureus* em alimentos cárneos no Peru, país de origem do estudo, é de 10³ UFC/g.

Pereira (2009) investigou o efeito antimicrobiano da incorporação de extrato aquoso de própolis em Carne Mecanicamente Separada (CMS) de aves. Os resultados indicaram que o extrato apresentou ação inibidora sobre mesófilos totais, *Salmonella* spp., *S. aureus*, *Bacillus* spp., *Clostridium perfringens*, coliformes totais e *E. coli*, destacando-se pela eficácia contra os três últimos.

Viera et al. (2016), avaliaram o efeito antimicrobiano do extrato hidroetanólico de própolis incorporado em linguiça toscana. Foram realizadas análises de contagem de mesófilos e psicrotóxicos, coliformes, *Staphylococcus* (coagulase positiva e negativa), clostrídios sulfito-

reduzidor e *Salmonella* spp. Os resultados demonstraram ação bactericida e bacteriostática do extrato de própolis para todos os microrganismos, sendo capaz de prolongar a vida útil da linguiça toscana por 56 dias em armazenamento refrigerado.

No Brasil, a Instrução Normativa – IN nº 161, de 1º de julho de 2022, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária estabelece os padrões para a qualidade microbiológica dos hambúrgueres de bovino. No entanto, apenas estabelece limites para *Salmonella* spp. e *E. coli*. Segundo este regulamento, *Salmonella* spp. tem de estar ausente em 25 gramas, enquanto que para *E. coli* o limite permitido é de 10^3 UFC/g (Anvisa, 2022).

Na União Europeia, aplica-se as determinações da Regulamento da Comissão (CE) nº 2073/2005, a qual também se foca nas bactérias *Salmonella* spp. e *E. coli*, em que ambos devem estar ausentes no hambúrguer (União Europeia, 2005). Com base nestas informações, é possível dizer que as amostras com incorporação de própolis avaliadas neste estudo se encontram de acordo com ambas as norma, pois *Salmonella* spp. e *E. coli* estavam ausentes nas amostras analisadas.

4.3. Valores obtidos nos parâmetros físico-químicos das amostras hambúrguer

Os resultados obtidos nas análises físico-químicas efetuadas às amostras de hambúrgueres bovinos nos dias 0 e 12 apresentam-se na Tabela 6. De modo geral, os resultados atestam a possibilidade de uso do extrato de própolis como aditivo neste tipo de alimento no que concerne os seus parâmetros físico-químicos, uma vez que os valores encontrados para as amostras incorporadas com extrato de própolis a 1% e 2% são idênticos aos obtidos na amostra controle.

Tabela 6 – Resultados da análise físico-química das amostras de hambúrguer bovino

Amostra	Tempo (dias)	% proteína ⁴	% gordura	% umidade	% cinzas	pH
F0 ¹	0	21,42 ± 0,04	20,99 ± 13,99	42,74 ± 0,01	1,72 ± 0,00	5,17 ± 0,01
	12	17,80 ± 0,00	19,15 ± 0,56	41,08 ± 0,02	2,31 ± 0,00	5,62 ± 0,01
F1 ²	0	15,50 ± 0,01	16,14 ± 12,37	41,43 ± 0,01	1,72 ± 0,00	5,26 ± 0,06
	12	18,00 ± 0,01	20,15 ± 1,65	39,05 ± 0,00	1,91 ± 0,00	5,21 ± 0,02
F2 ³	0	15,95 ± 0,02	23,45 ± 3,27	45,62 ± 0,01	2,26 ± 0,00	5,31 ± 0,06
	12	21,20 ± 0,00	15,14 ± 1,96	38,76 ± 0,00	1,71 ± 0,00	5,17 ± 0,06

¹ Hambúrguer com adição de ascorbato de sódio (0,01%). ² Hambúrguer incorporado com extrato de própolis a 1% da composição. ³ Hambúrguer incorporado com extrato de própolis a 2% da composição. ⁴ Para cada parâmetro (proteína, gordura, umidade, teor de cinzas e pH) foi realizada uma análise em duplicato e o valor disposto é a média aritmética dos valores obtidos em cada ensaio.

Fonte: A autora (2024)

Os valores encontrados nas amostras para percentual de proteína e gordura estão dentro dos parâmetros aceitáveis do mercado para hambúrgueres bovinos, que variaram entre 15-20% de proteína e 10-25% de gordura (Guerreiro, 2021). De acordo com a legislação brasileira (Portaria SDA nº 724/2022), o hambúrguer bovino deve conter, no mínimo, 15% de proteína e, no máximo, 25% de gordura (Ministério da Agricultura, 2022).

Em relação ao percentual de umidade, os valores e as variações entre os dias 0 e 12 são similares entre as amostras. A umidade no tempo 0 foi de 41,91% para F0, 40,26% para F1 e 42,19% para F2. Todas as amostras apresentaram perda de umidade ao longo do tempo, com a maior variação observada em F2 (-6,86%), seguida de F1 (-2,38%) e F0 (-1,66%). Esses dados sugerem uma possível relação entre a incorporação do extrato de própolis no hambúrguer bovino e uma redução no seu teor de umidade com o tempo, uma vez que a menor variação ocorreu na amostra controle (F0), na qual foi incorporado o conservante tradicional, seguido de F1, com 1% de extrato de própolis, e F2, com 2% de extrato de própolis. No entanto, não existem outros estudos que investiguem esse aspecto para comparação e confirmação desta diminuição. Além disso, devido à baixa variação observada, é possível que se trate de um erro amostral. Outro aspecto relevante diz respeito à umidade de todos os hambúrgueres produzidos para a realização deste estudo foi inferior à dos hambúrgueres adquiridos no mercado. Lopes et al. (2021), observou que os valores da umidade dos hambúrgueres industrializados e artesanais foi de bovinos de 67,9% e 72,8%, respectivamente. Da mesma forma, Borba et al. (2013) observaram um valor de 60,29% de umidade em hambúrgueres bovinos artesanais. É de salientar que, conforme reportado por Borba et al. (2013), a umidade é um parâmetro crucial

para o aspecto comercial do hambúrguer bovino, uma vez que uma umidade reduzida no produto cru resulta num produto mais seco após a preparação, especialmente devido à perda de umidade durante a cocção, que varia conforme o método utilizado.

Em relação ao teor de cinza, os valores encontrados nas amostras apresentaram uma variação pequena, indicando que a incorporação do extrato de própolis não afetou acentuadamente este parâmetro. O teor de cinza para F0 foi de 2,01%, com variação de 0,59%. Para F1, a média foi de 1,81%, com variação de 0,19%, e para F2, a média encontrada foi de 1,98%, com variação de -0,55%. Lopes et al. (2021) encontraram valores de 2,5% e 2,6% para hambúrgueres industrializados e artesanais, respectivamente.

Por fim, em relação ao pH, os resultados indicaram que o extrato de própolis contribuiu para a estabilização do pH no produto. A menor variação ocorreu em F1 (-0,05, com média de 5,23), seguida de F2 (-0,14, média de 5,24) e F0 (0,45, média de 5,39). Os valores encontrados estão próximos aos observados por Silva et al. (2014), que registraram um pH de 5,5 para hambúrgueres bovinos. De acordo com Boldori et al. (2021) a medição do pH é essencial para determinar a deterioração dos alimentos, incluindo o crescimento de microrganismos, a atividade enzimática, a retenção de sabor e odor. Alterações no pH podem indicar mudanças nas características físico-químicas do produto, o que pode reduzir o seu tempo de vida de prateleira.

4.4. Análise sensorial das amostras de hambúrguer

A análise sensorial foi efetuada por 20 participantes que avaliaram os parâmetros: **cor, aroma, sabor, textura e impressão sensorial global**. Em relação a idade dos intervenientes, no Gráfico 1 apresenta-se distribuição por faixa etária, enquanto que no Gráfico 2 é apresentado a distribuição por sexo biológico.

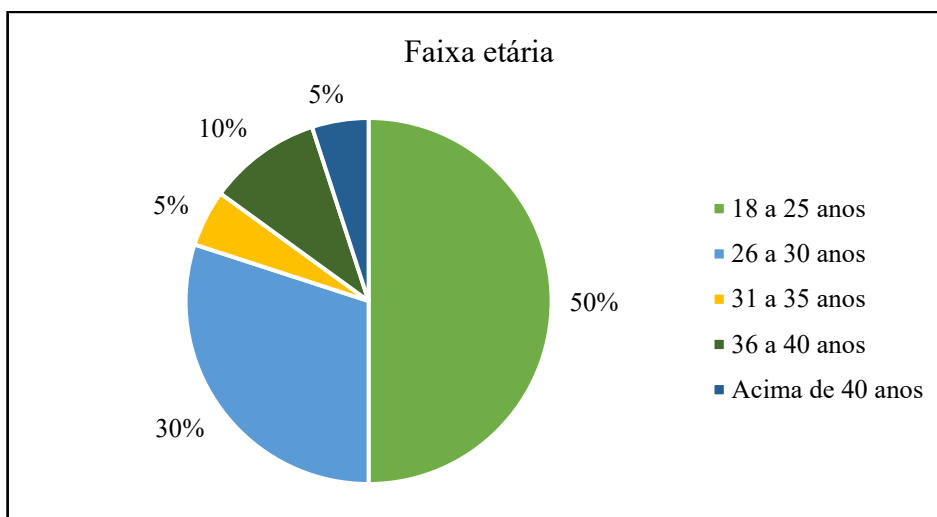


Gráfico 1 – Faixa etária dos participantes.
Fonte: A autora (2024)

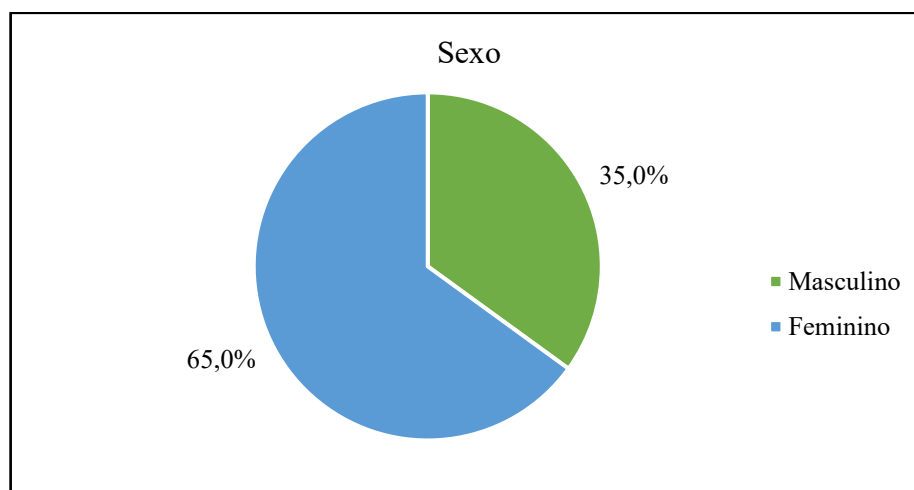


Gráfico 2 - Sexo biológico dos participantes.
Fonte: A autora (2024)

Como pode ser observado nos gráficos, a maior parte dos participantes são jovens entre 18 a 25 anos (50%), seguidos dos que possuem entre 26 a 30 anos (30%). Apenas 20% dos elementos tinham mais de 30 anos. Já em relação ao sexo biológico, a maior dos participantes era do sexo feminino (65%; 13 participantes).

4.4.1. Cor

Nos Gráficos 3, 4 e 5 são apresentados os resultados obtidos para a cor das amostras A1 (hambúrguer tradicional, com adição de ascorbato de sódio), B2 (hambúrguer com 1% de extrato de própolis) e C3 (hambúrguer com 2% de extrato de própolis), respectivamente.

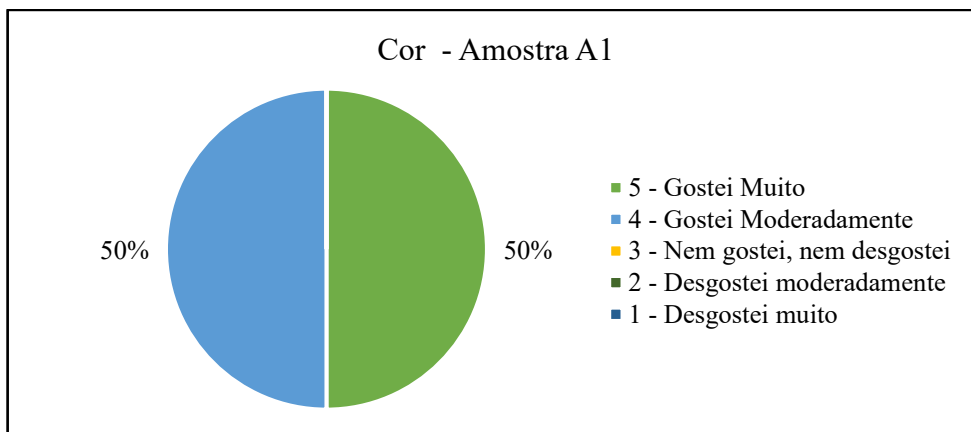


Gráfico 3 – Resultado sobre a cor da amostra A1 (hambúrguer tradicional).
Fonte: A autora (2024)

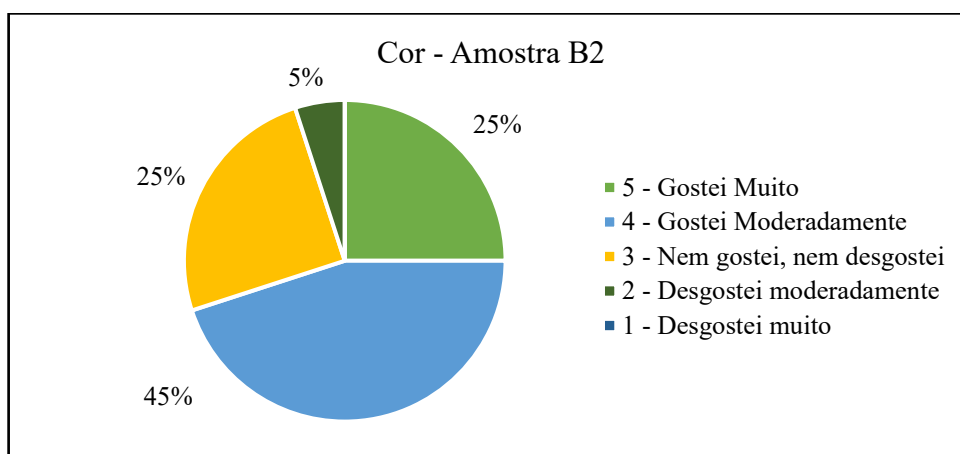


Gráfico 4 – Resultado sobre a cor da amostra B2 (hambúrguer com 1% de extrato de própolis).
Fonte: A autora (2024)

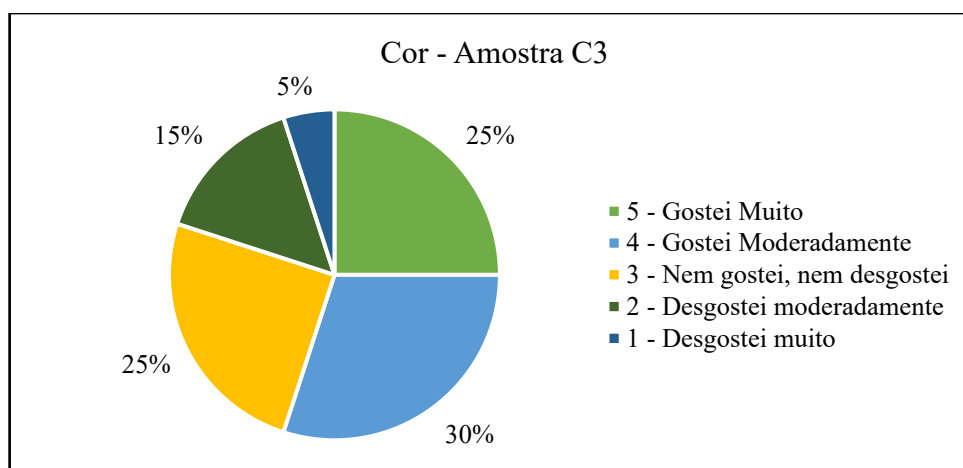


Gráfico 5 - Resultado sobre a cor da amostra C3 (hambúrguer com 2% de extrato de própolis).
Fonte: A autora (2024)

Como demonstrado nos gráficos, os participantes apresentaram uma resposta negativa em relação à cor dos hambúrgueres com adição de extrato de própolis. De um total de 100

pontos (cenário em que todos os participantes atribuíssem nota 5 – “gostei muito”), o somatório de notas para as amostras no que tange a cor foi: A1 – 90 pontos; B2 – 78 pontos; C3 – 71 pontos.

Assim, os resultados revelam um aumento progressivo de avaliações negativas ao comparar a amostra A1 (hambúrguer tradicional) com a B2 (contendo 1% de extrato de própolis) e, posteriormente, com a C3 (contendo 2% de extrato de própolis). Esses dados sugerem que a inclusão do extrato de própolis influenciou negativamente a percepção da cor do produto, evidenciando uma relação direta, isto é: quanto maior foi a concentração de própolis, maior foi o número de opiniões desfavoráveis relacionadas à cor do hambúrguer.

Conforme observado na Figura 9, as amostras dos hambúrgueres preparadas com a adição de própolis apresentaram uma perda da coloração avermelhada característica da carne e aparecimento de tons acastanhados e amarelados. Esta diferença também se destacou nas amostras após a cocção, conforme ilustrado na Figura 13. Enquanto a amostra A1 (hambúrguer tradicional) manteve a cor tradicional após a preparação (castanho), as amostras B2 e C3, contendo própolis, apresentaram colorações mais claras, com tonalidades tendendo ao amarelo. Essas alterações visuais podem justificar o menor desempenho sensorial das amostras nas quais foi incorporado o própolis, considerando uma associação do consumidor entre cor e qualidade percebida.

4.4.2. Aroma

Nos Gráficos 6, 7 e 8 estão apresentados os resultados obtidos para o aroma das amostras A1, B2 e C3, respectivamente.

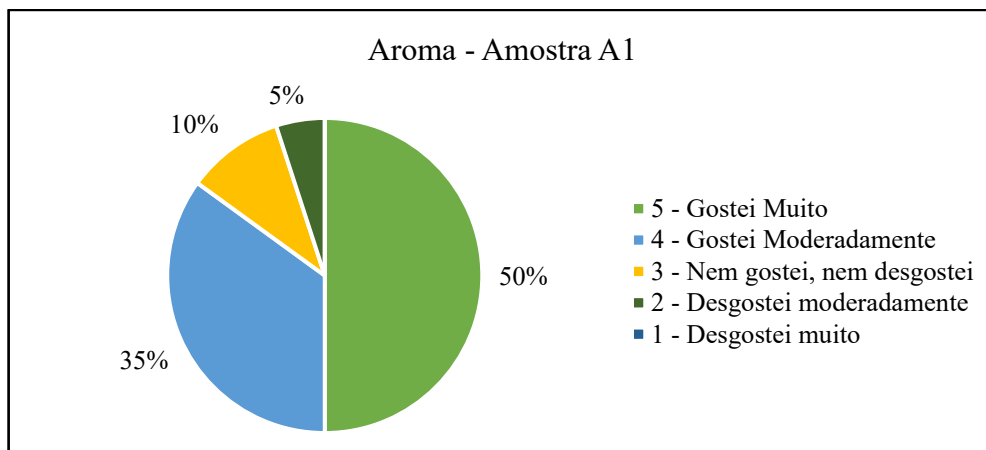


Gráfico 6 - Resultado sobre o aroma da amostra A1 (hambúrguer tradicional).

Fonte: A autora (2024)

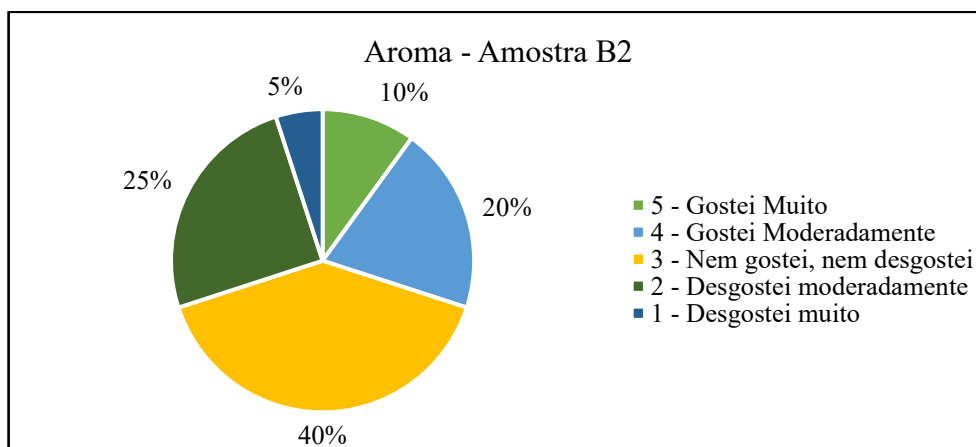


Gráfico 7 - Resultado sobre o aroma da amostra B2 (hambúrguer com 1% de extrato de própolis).

Fonte: A autora (2024)

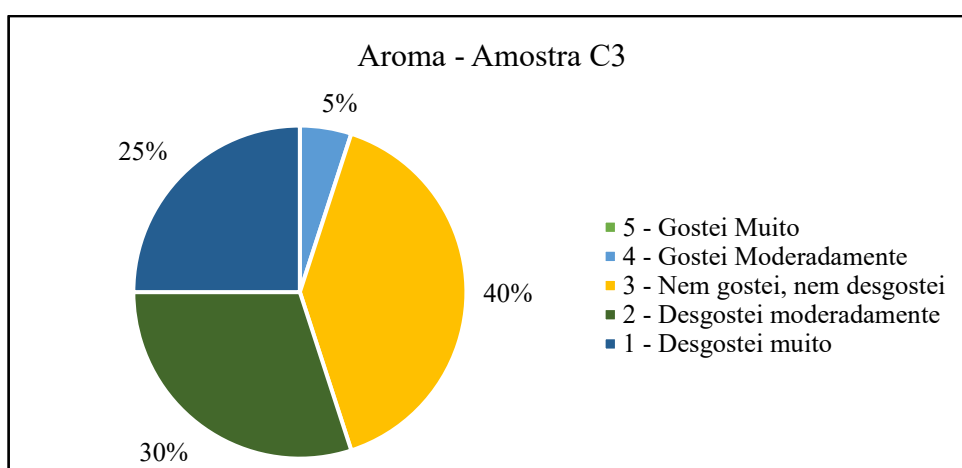


Gráfico 8 - Resultado sobre o aroma da amostra C3 (hambúrguer com 2% de extrato de própolis).

Fonte: A autora (2024)

Assim como a cor, a adição de própolis também influenciou negativamente a percepção dos participantes em relação ao aroma dos hambúrgueres. Conforme demonstrado nos gráficos,

houve um aumento das respostas negativas de A1 (hambúrguer tradicional) para B2 (com 1% de extrato de própolis) e de B2 para C3 (com 2% de extrato de própolis). O somatório de notas para as amostras em relação ao aroma foi: A1 – 86 pontos; B2 – 61 pontos; C3 – 45 pontos. Isso revela que o aroma foi ainda mais influenciado pela adição do extrato de própolis do que a cor.

Esses resultados indicam não apenas uma pior percepção do aroma entre o hambúrguer tradicional e aqueles com adição de própolis, mas também que essa percepção negativa se intensifica com o aumento da concentração do extrato no produto. É importante destacar que o extrato de própolis possui um aroma característico e bastante pronunciado (Soares et al., 2017), que, mesmo em baixas concentrações, como nas amostras avaliadas, tende sobressair. No contexto deste estudo, essa característica resultou numa avaliação negativa do aroma pelos intervenientes, sugerindo que o odor peculiar do própolis não foi bem aceite no produto cárneo final.

4.4.3. Sabor

Nos Gráficos 9, 10 e 11 são apresentados os resultados obtidos para o sabor das amostras A1, B2 e C3, respectivamente.

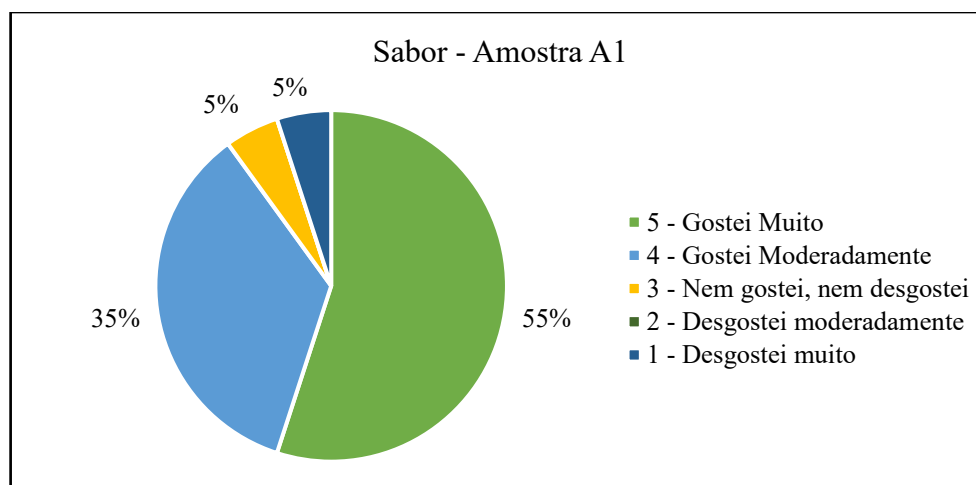


Gráfico 9 - Resultados sobre o sabor da amostra A1 (hambúrguer tradicional).
Fonte: A autora (2024)

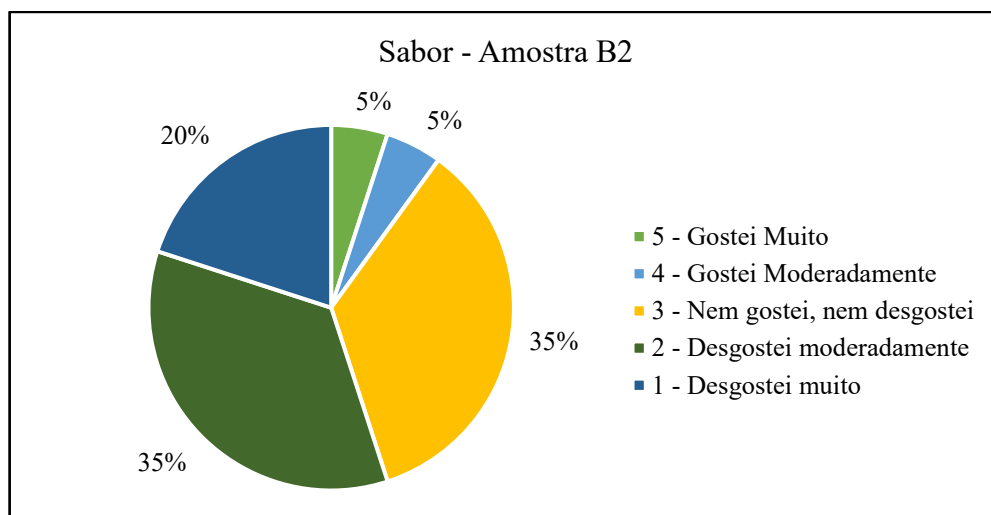


Gráfico 10 - Resultado sobre o sabor da amostra B2 (hambúrguer com 1% de extrato de própolis).

Fonte: A autora (2024)

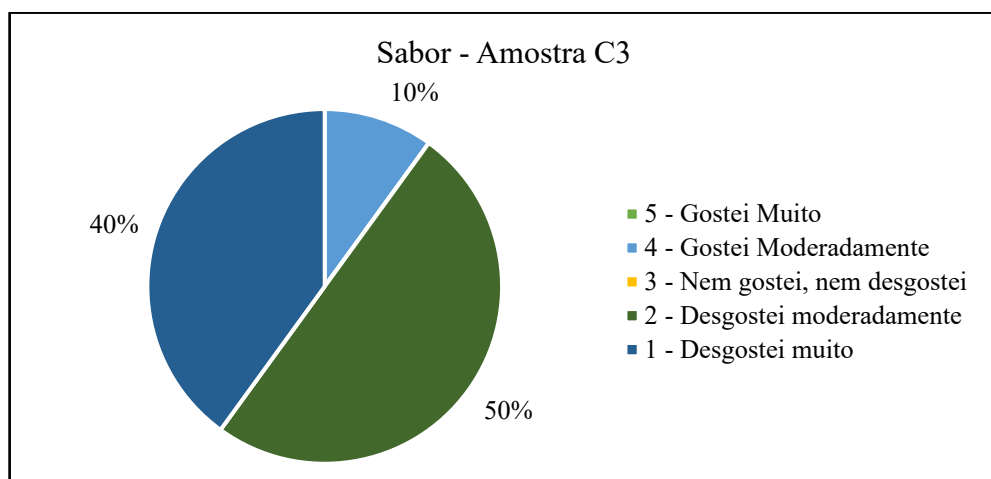


Gráfico 11 - Resultado sobre o sabor da amostra C3 (hambúrguer com 2% de extrato de própolis).

Fonte: A autora (2024)

De maneira semelhante aos parâmetros anteriores, a percepção de sabor das amostras de hambúrguer foi acentuadamente influenciada pela adição de extrato de própolis. Como ilustram os gráficos apresentados, o sabor foi o parâmetro sensorial mais afetado, evidenciando uma forte relação negativa entre a presença de própolis e a aceitação pelos participantes. O somatório de notas para as amostras no que tange o sabor foi: A1 – 87 pontos; B2 – 48 pontos; C3 – 36 pontos.

Na amostra A1 (hambúrguer tradicional), 55% dos participantes (11 pessoas) atribuíram nota 5 (gostei muito), e apenas 5% deram nota 1 (desgostei muito). Por outro lado, na amostra C3 (hambúrguer com 2% de extrato de própolis), a maior nota foi 4 (gostei moderadamente;

10%, dois participantes), enquanto 50% (10 pessoas) atribuíram nota 2 (desgostei moderadamente) e 40% (8 participantes) deram nota 1 (desgostei muito).

Além disso, observa-se uma relação clara entre o aumento da concentração de própolis nas amostras e a redução na aceitação do sabor. Segundo Soares et al. (2017), o sabor da própolis é uma de suas características sensoriais mais marcantes, descrito frequentemente como amargo e picante. Embora existam variações entre os diferentes tipos de própolis, essas características são predominantes e podem explicar o impacto negativo sobre a percepção do sabor nas amostras adicionadas com o extrato. Neste contexto, é possível dizer que o forte sabor característico do própolis influenciou a aceitação sensorial do produto.

4.4.4. Textura

Nos Gráficos 12, 13 e 14 podem observar-se os resultados obtidos para a textura das amostras A1, B2 e C3, respectivamente.

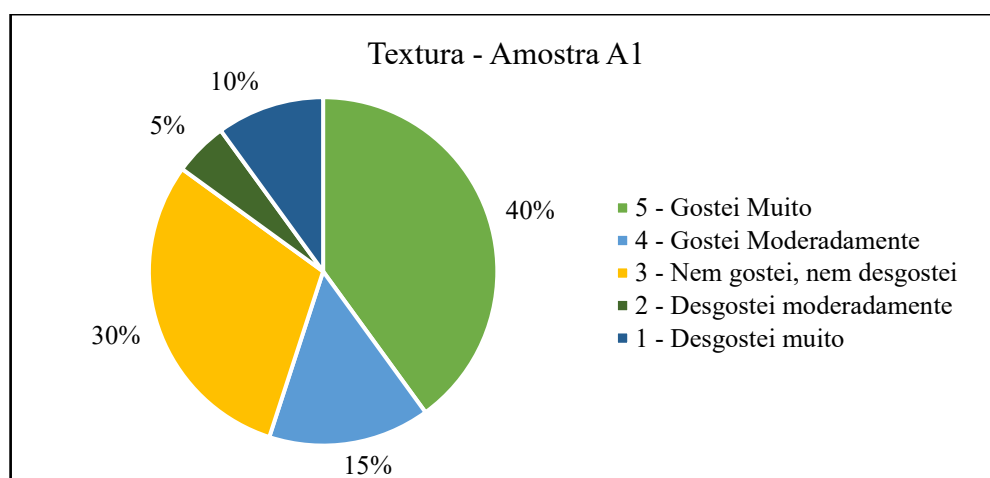


Gráfico 12 - Resultados obtidos para textura da amostra A1 (hambúrguer tradicional).

Fonte: A autora (2024)

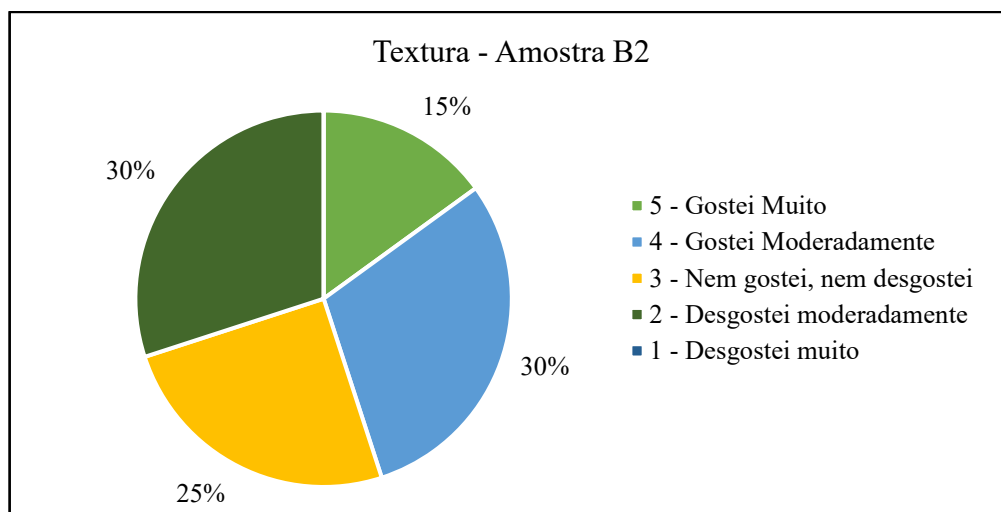


Gráfico 13 - Resultado obtidos para a textura da amostra B2 (hambúrguer com 1% de extrato de própolis).
Fonte: A autora (2024)

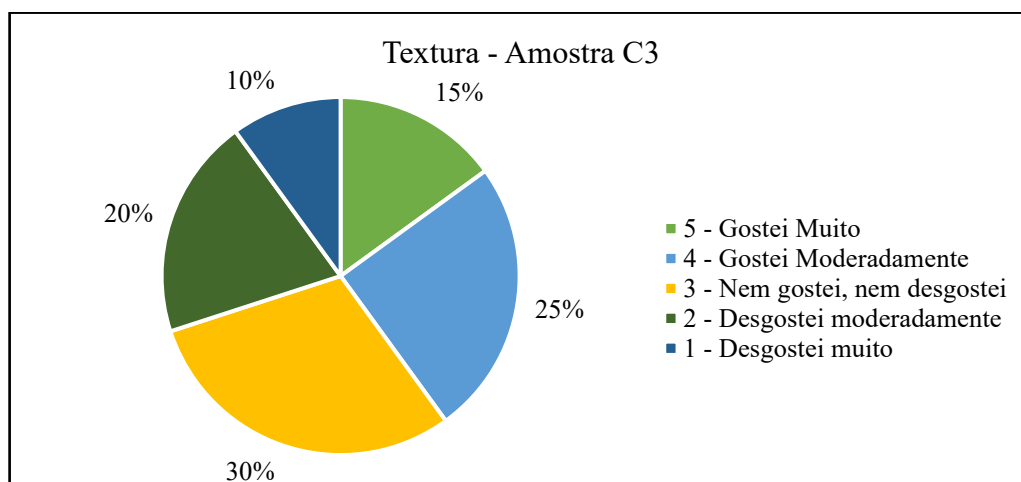


Gráfico 14 - Resultado sobre a textura da amostra C3 (hambúrguer com 2% de extrato de própolis).
Fonte: A autora (2024)

A adição de extrato de própolis também influenciou negativamente a textura do hambúrguer, embora esse impacto tenha sido menos acentuado em comparação com os demais parâmetros analisados. O somatório de notas para as amostras no que concerne a textura foi: A1 – 74 pontos; B2 – 66 pontos; C3 – 63 pontos.

Tal como observado para os outros parâmetros sensoriais também se verificou uma redução nas notas atribuídas pelos participantes entre as amostras A1 (hambúrguer tradicional) e B2 (com 1% de extrato de própolis) e entre B2 e C3 (com 2% de extrato de própolis). Isso demonstra que o aumento na concentração do extrato no produto afetou negativamente a percepção de textura.

4.4.5. Impressão global

Nos Gráficos 15, 16 e 17 são apresentados os resultados obtidos sobre a impressão global das amostras A1, B2 e C3, respectivamente.

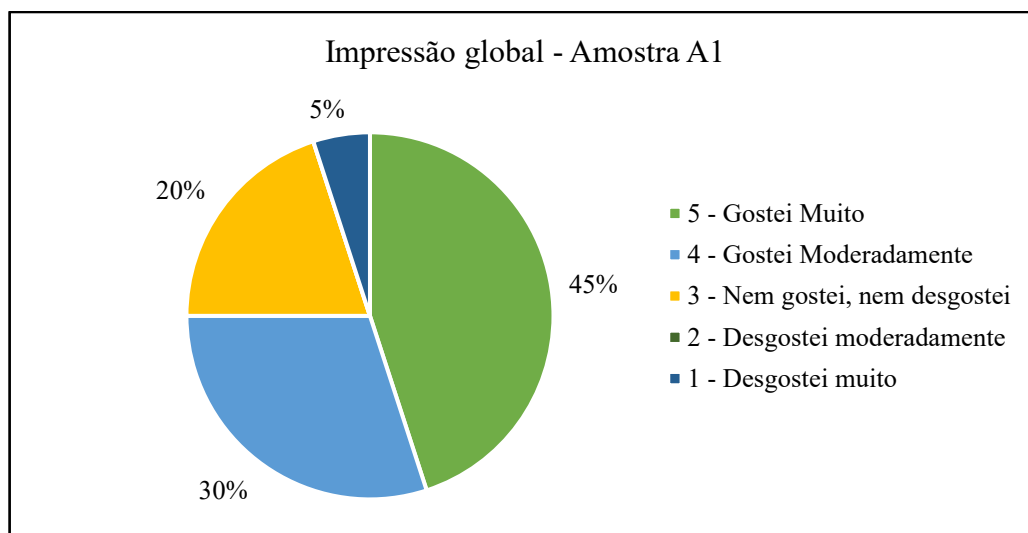


Gráfico 15 - Resultados sobre a impressão global da amostra A1 (hambúrguer tradicional).
Fonte: A autora (2024)

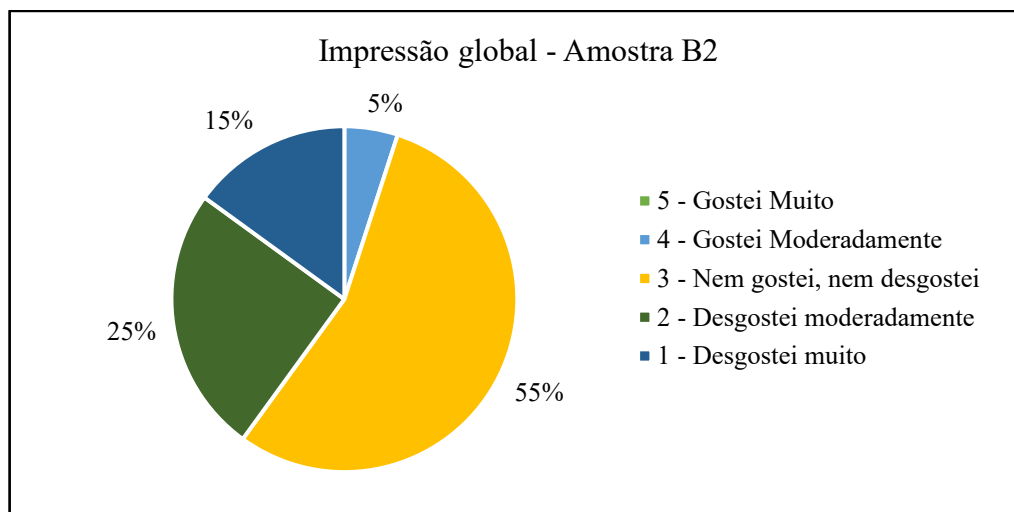


Gráfico 16 - Resultado sobre a impressão global da amostra B2 (hambúrguer com 1% de extrato de própolis).
Fonte: A autora (2024)

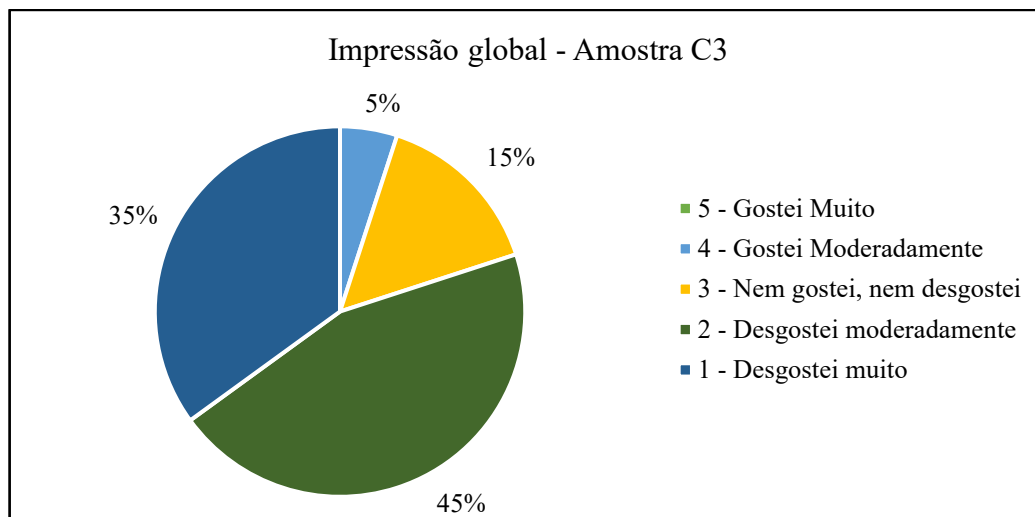


Gráfico 17 - Resultado sobre a impressão global da amostra C3 (hambúrguer com 2% de extrato de própolis).
Fonte: A autora (2024)

Conforme ilustrado nos gráficos e corroborado pelos resultados anteriores, a introdução do extrato de própolis afetou negativamente a impressão sensorial global do hambúrguer, com uma clara relação entre o aumento da concentração do extrato e a redução na avaliação da qualidade sensorial pelos participantes. O somatório de notas das amostras para apreciação global foi: A1 – 82 pontos; B2 – 50 pontos; C3 – 39 pontos.

Estes resultados evidenciaram que a adição de extrato de própolis ao hambúrguer bovino gera um efeito negativo na percepção sensorial, abrangendo atributos como cor, aroma, sabor e textura. Este resultado é relevante, pois, uma avaliação sensorial positiva é crucial para a aceitação e comercialização de produtos alimentares. No caso deste estudo, os resultados indicam a inviabilidade do uso do extrato de própolis, nas condições testadas, como aditivo alimentar para hambúrgueres. A inclusão do extrato prejudicou as características sensoriais essenciais para o apelo comercial do produto, o que pode influenciar negativamente sua aceitação no mercado.

Além disso, observou-se que a concentração do extrato de própolis influencia diretamente esta percepção. A amostra C3, contendo 2% de extrato, apresentou as menores notas em todos os parâmetros sensoriais quando comparada à amostra B2, com 1% de extrato. A amostra com melhor desempenho sensorial foi A1, o hambúrguer tradicional com adição de ascorbato de sódio, sem própolis. Neste sentido, é possível constatar que o uso da própolis enquanto aditivo alimentar deve considerar as alterações sensoriais que causa, sendo necessário, portanto, encontrar formas de incorporá-lo e ao mesmo tempo manter as características sensoriais tradicionais do hambúrguer bovino.

Uma alternativa promissora para resolver o problema identificado nesta pesquisa é o uso da técnica de microencapsulação. Esta abordagem envolve o revestimento de partículas sólidas, líquidas ou dispersões com uma fina camada de material protetor, resultando na formação de microcápsulas. Essas microcápsulas permitem a liberação controlada do conteúdo encapsulado (Alves, 2018). Entre os benefícios do microencapsulamento estão a proteção contra condições ambientais adversas, como luz, umidade, oxigênio e radiação UV, a preservação de componentes sensíveis durante o armazenamento, o mascaramento de sabores indesejáveis, a manutenção do aroma, tornando o produto mais atraente para o consumidor (Nascimento, 2018).

Dessa forma, a aplicação do extrato de própolis microencapsulado no hambúrguer bovino apresenta-se como uma possível solução para minimizar as alterações sensoriais causadas pela adição direta do extrato, ao mesmo tempo que permite preservar as propriedades antibacterianas e antioxidantes da própolis que a tornam uma opção eficaz, e natural, como aditivo alimentar.

CAPÍTULO 5

5. CONCLUSÃO

Conforme tem sido evidenciado, nos últimos anos tem-se verificado um aumento do interesse, quer por parte dos consumidores quer da indústria alimentar, por substâncias de origem natural passíveis de serem utilizadas como aditivos alimentares, em substituição dos conservantes químicos sintéticos tradicionalmente utilizados na preservação de alimentos.

No nosso trabalho, no que respeita à composição química do extrato de própolis, verificou-se que este contém quantidades significativas de compostos fenólicos totais, flavonoides e apresenta uma expressiva capacidade antioxidante, avaliada através do ensaio com o radical DPPH. Estas propriedades poderão conferir ao extrato funcionalidades bioativas relevantes, designadamente atividades antimicrobianas e antioxidantes, as quais se revelam particularmente pertinentes no contexto da sua potencial aplicação como aditivo alimentar.

A análise microbiológica das amostras de hambúrguer permitiu avaliar a eficácia das substâncias presentes no extrato de própolis. Os resultados obtidos para *Salmonella spp.*, coliformes totais, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* foram negativos em todas as amostras ao longo do período experimental (do dia 0 ao dia 12). No que respeita aos esporos de clostrídios sulfito-redutores, observaram-se resultados negativos do dia 0 ao dia 8, tendo-se registado positividade no dia 12 para as amostras F0 (hambúrguer tradicional com ascorbato de sódio) e F1 (hambúrguer com 1% de extrato de própolis). Importa salientar que a amostra F2 (hambúrguer com 2% de extrato de própolis) manteve resultados negativos durante todo o período avaliado. Relativamente à contagem de microrganismos mesófilos totais, verificou-se um crescimento progressivamente inferior nas amostras F0, F1 e F2, respetivamente.

Esses dados indicam que o extrato de própolis possui ação antioxidante comparável à do conservante alimentar tradicional (ascorbato de sódio). Além disso, demonstrou-se que concentrações mais elevadas de própolis na formulação do hambúrguer proporcionam maior eficácia antimicrobiana, embora essa superioridade tenha sido notada apenas nos resultados para clostrídios sulfito-redutores e mesófilos totais.

Na análise físico-química das amostras de hambúrguer, não foram observadas grandes variações entre os grupos, exceto no teor de umidade. Verificou-se uma tendência de redução da umidade ao longo do tempo nas amostras com extrato de própolis, especialmente em F2. Os demais parâmetros analisados (teor de proteína, gordura, cinzas e pH) apresentaram valores dentro das faixas esperadas para hambúrgueres bovinos.

A análise sensorial, revelou uma possível inviabilidade da utilização do extrato de própolis, quando incorporado diretamente, em hambúrgueres bovinos. Em todos os parâmetros avaliados (cor, aroma, sabor, textura e impressão global), a amostra de hambúrguer bovino tradicional apresentou desempenho sensorial superior em relação às amostras contendo extrato de própolis. Além disso, observou-se que o aumento da concentração do extrato intensificou o impacto negativo nos atributos sensoriais. Entre os aspectos analisados, o aroma e o sabor foram os mais afetados pela adição do extrato de própolis. Convém salientar que a aceitação sensorial é um fator determinante para a comercialização de produtos alimentícios. Assim, a perda de qualidade sensorial decorrente da incorporação direta do extrato de própolis pode inviabilizar a sua utilização como aditivo alimentar, apesar dos seus benefícios em termos de conservação.

Nesse contexto, conclui-se que o extrato de própolis possui potencial para ser utilizado como aditivo alimentar em hambúrgueres bovinos, devido à sua capacidade para prolongar o *shelf life* do produto por meio de ação antimicrobiana e antioxidante. Contudo, a sua incorporação direta é inviável, uma vez que resulta em perdas significativas na qualidade sensorial, comprometendo a atratividade comercial.

Futuros estudos devem explorar técnicas alternativas de incorporação do extrato de própolis em hambúrgueres bovinos que minimizem o impacto negativo na qualidade sensorial, nomeadamente o uso de microencapsulação. Além disso, seria pertinente investigar a sua aplicação noutros tipos de produtos cárneos, como embutidos e carnes processadas.

REFERÊNCIAS

- Albuquerque, B. R., Heleno, S. A., Oliveira, M. B. P., Barros, L., & Ferreira, I. C. (2021). Phenolic compounds: Current industrial applications, limitations and future challenges. *Food & function*, 12(1), 14-29. DOI: 10.1039/D0FO02324H.
- Albuquerque, M. V., Santos, S. D., Cerqueira, N. D. V., & Silva, J. D. (2012). Educação alimentar: uma proposta de redução do consumo de aditivos alimentares. *Química nova na escola*, 34(2), 51-57. http://www.educadores.diaadia.pr.gov.br/arquivos/File/dezembro2012/quimica_artigos/educacaoalimentar.pdf.
- Ali, F. H., Kassem, G. M., & Atta-Alla, O. A. (2010). Propolis as a natural decontaminant and antioxidant in fresh oriental sausage. *Vet Ital.*, 46(2), 167-72. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20560126/>.
- Ali, S. S., Ahsan, H., Zia, M. K., Siddiqui, T., & Khan, F. H. (2020). Understanding oxidants and antioxidants: Classical team with new players. *Journal of food biochemistry*, 44(3), e13145. DOI: 10.1111/jfbc.13145.
- Alves, C. J. (2018). *Microencapsulação de própolis utilizando matrizes proteicas para aplicação como ingrediente funcional em alimentos*. (Dissertação de Mestrado, Departamento de Ciências e Tecnologia Agroindustrial, Universidade Federal de Pelotas). Repositório Institucional da UFPel. <https://guaiaca.ufpel.edu.br/handle/prefix/4131>.
- Alves, E. (2009). *Atividade antioxidante de extratos de própolis comercializados em Santa Maria-RS e aplicação em linguiça toscana refrigerada*. (Dissertação de Mestrado, Universidade de Santa Maria). Manancial – Repositório Digital da UFSM. <https://repositorio.ufsm.br/handle/1/5678>.
- Alves, E., & Kubota, E. H. (2013). Conteúdo de fenólicos, flavonoides totais e atividade antioxidante de amostras de própolis comerciais. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*, 34(1), p. 37-41. <https://rcfba.fcfar.unesp.br/index.php/ojs/article/view/233>.
- Alves, E., & Kubota, E. H. (2013). Conteúdo de fenólicos, flavonoides totais e atividade antioxidante de amostras de própolis comerciais. *Revista de ciências farmacêuticas básica e aplicada*, 34(1), 37-41. <https://rcfba.fcfar.unesp.br/index.php/ojs/article/view/233>.
- Alves, R. D. A., Silva, A. A. S., Dutra, R. P., & Abreu, V. K. G. (2023). *Avaliação sensorial de hambúrgueres de frango contendo própolis vermelha como antioxidante natural*. In: Anais do 15º SLACAN - Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos e Nutrição.
- Antunes, R. M. P., Catao, R. M. R., & Cevallos, B. S. O. (1996). Antimicrobial activity of propolis. *Revista Brasileira de Farmácia*, 77, 15-18.
- Anvisa, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Instrução Normativa – IN nº 161, de 1º de julho de 2022. *Diário Oficial da União*, 126 (julho), 235. <https://www.in.gov.br/en/web/dou/-/instrucao-normativa-in-n-161-de-1-de-julho-de-2022-413366880>.
- Anvisa, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada – RCD nº

272, de 14 de março de 2019. *Diário Oficial da União*, 52 (março), 194. <https://encurtador.com.br/BTtna>.

Araújo, K. S. D. S., Santos, J. F. D., Sato, M. O., Finco, F. D. B. A., Soares, I. M., Barbosa, R. D. S., ... & Mariano, S. M. B. (2016). Physicochemical properties and antioxidant capacity of propolis of stingless bees (Meliponinae) and Apis from two regions of Tocantins, Brazil. *Acta Amazonica*, 46(1), 61-68. DOI: 10.1590/1809-4392201501045.

Araújo, M. R., Costa, É. S., da Costa, J. C. N., de Moraes, E. C., Rodrigues, E. C., Picanço, N. F. M., ... & de Faria, R. A. P. G. (2022). Qualidade de hambúrguer misto com alecrim como substituto de antioxidante sintético: caracterização físico-química. *Research, Society and Development*, 11(9), 1-11. DOI: 10.33448/rsd-v11i9.31708.

Arruda, V. A. S. (2013). *Pólen apícola desidratado: composição físico-química, qualidade microbiológica, compostos fenólicos e flavonoides, capacidade antioxidante e origem botânica*. (Tese de Doutorado, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo). DOI:10.11606/T.9.2013.tde-22062015-172352.

Baines, D., & Seal, R. (Eds.). (2012). *Natural food additives, ingredients and flavourings*. Elsevier.

Bankova, V. (2005). Chemical diversity of propolis and the problem of standardization. *Journal of ethnopharmacology*, 100(1-2), 114-117. DOI: 10.1016/j.jep.2005.05.004.

Bankova, V., Boudourova-Krasteva, G., Sforcin, J. M., Frete, X., Kujungiev, A., Maimoni-Rodella, R., & Popov, S. (1999). Phytochemical evidence for the plant origin of Brazilian propolis from São Paulo State. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 54(5-6), 401-405. DOI: 10.1515/znc-1999-5-616.

Bankova, V. (2005). *Recent trends and important developments in propolis research*. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2(1), 29-32

Barretto, J. R., & Silva, L. R. (2006). *Intoxicações alimentares*. Universidade Federal da Bahia. <https://encurtador.com.br/9sSnh>.

Barros, J. R., Soares, F. M., de Santana Silva, E., & Constant, P. B. L. (2021). Conservação de alimentos pelo uso de aditivos: uma Revisão. *Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos*, 37(2), 18-29. DOI: 10.5380/bceppa.v37i2.55962.

Bertoldo, D. B. (2020). Espectroscopia Raman de baixa frequência-THZ-Raman. *Holos*, 36(2), 1-11. DOI: 10.15628/holos.2020.4396.

Bertrams, J., Kunz, N., Müller, M., Kammerer, D., & Stintzing, F. C. (2013). Phenolic compounds as marker compounds for botanical origin determination of German propolis samples based on TLC and TLC-MS. *Journal of Applied Botany and Food Quality*, 86(1), 143-153. DOI: 10.5073/JABFQ.2013.086.020.

Boldori, J. R., Cogo, A. B., Rabuske, B. P. F., Munieweg, F. R., & Denardin, C. C. (2021). Desenvolvimento, aceitabilidade e vida de prateleira de hambúrgueres “light” enriquecidos com chia (*Salvia hispanica* L.). In: Verruck, S. (org.). *Avanços em ciência e tecnologia de alimentos*

– vol. 4. Científica Digital. 661-676. <https://downloads.editoracientifica.com.br/books/978-65-87196-95-4.pdf>.

Borba, C. M.; Oliveira, V. R.; Montenegro, K. R.; Hertz, P. F.; Venzke, J. G. (2013). Avaliação físico-química de hambúrguer de carne bovina e de frango submetidos a diferentes processamentos térmicos. *Braz. J. Food Nutr.*, (24)1, 21-27. <https://encurtador.com.br/dfMLN>.

Breyer, E. D., Breyer, H. F., & Cella, I. (2016). *Produção e beneficiamento da própolis*. Epagri. <https://publicacoes.epagri.sc.gov.br/BD/article/view/405/301>.

Cabral, I. S. R., Oldoni, T. L. C., Prado, A., Bezerra, R. M. N., Alencar, S. M. D., Ikegaki, M., & Rosalen, P. L. (2009). Composição fenólica, atividade antibacteriana e antioxidante da própolis vermelha brasileira. *Química Nova*, 32(6), 1523-1527. DOI: 10.1590/S0100-40422009000600031.

Campos, J. V., Assis, O. B. G., & Bernardes Filho, R. (2021). Processamento e análise de extratos de própolis verde como potencial sanitizante de uso hortifrutícola. *Brazilian Journal of Animal and Environmental Research*, 4(3), 2991-3002. DOI: 10.34188/bjaerv4n3-018.

Cassini, A. S. (2004). *Análise das características de secagem da proteína texturizada de soja*. (Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul). LUME – Repositório Digital da UFRGS. <https://lume.ufrgs.br/handle/10183/4737>.

Costa, A. C. O., Santos, A. C., Silva, B., Biluca, F. C., Braghini, F., Bergamo, G., ... & Seraglio, S. K. T. (2020). *Qualidade do mel de abelhas *Apis mellifera*: Boas práticas de produção e extração*. Epagri. <https://publicacoes.epagri.sc.gov.br/BD/article/view/1064/953>

Cunha, G. F. D. (2017). *Biofilmes à base de amido incorporados com extrato etanólico de própolis*. (Dissertação de Mestrado, Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano). Repositório IFGoiano. <https://repositorio.ifgoiano.edu.br/handle/prefix/40>.

Dams, R. I. (2023). *Microbiologia Geral e de Alimentos*. Freitas Bastos.

Delgado-Pando, G., Ekonomou, S. I., Stratakos, A. C., & Pintado, T. (2021). Clean label alternatives in meat products. *Foods*, 10(7), 1615. DOI: 10.3390/foods10071615.

De-Melo, A. A. M., Matsuda, A. H., Freitas, A. D. S. D., Barth, O. M., & Almeida-Muradian, L. B. D. (2014). Capacidade antioxidante da própolis. *Pesquisa Agropecuária Tropical*, 44(3), 341-348. DOI: 10.1590/S1983-40632014000300004.

Dias, L. G., Pereira, A. P., & Estevinho, L. M. (2012). Comparative study of different Portuguese samples of propolis: Pollinic, sensorial, physicochemical, microbiological characterization and antibacterial activity. *Food and Chemical Toxicology*, 50(12), 4246-4253. DOI: 10.1016/j.fct.2012.08.056.

Domingos, I., Brunelli, S. R., & Baldotto, S. B. (2015). Salmonella spp.: uma revisão. *Revista FAIT*, 2(3), 1-15. <https://encurtador.com.br/YNfpX>.

Ferreira, R. D. C. (2013). *Avaliação das características físico-químicas e microbiológicas do pólen da *Melipona scutellaris* Latreille submetido a diferentes processos de desidratação*.

(Dissertação de Mestrado em Ciência de Alimentos, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal da Bahia). Repositório Institucional UFBA. <https://repositorio.ufba.br/handle/ri/8799>.

Ferreira, R. D. C. (2021). *Elaboração de formulação semissólida com potencial farmacêutico à base de extrato da Geoprópolis da Melipona Quadrifasciata Anthidioides (Mandaçaia)*. (Tese de Doutorado em Biotecnologia, Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia). Repositório Institucional UFBA. <http://repositorio.ufba.br/ri/handle/ri/34244>.

Fischer, G., Hübner, S. O., Vargas, G. D., & Vidor, T. (2021). Imunomodulação pela própolis. *Arquivos do Instituto Biológico*, 75(2), 247-253. DOI: 10.1590/1808-1657v75p2472008.

Foguel, I. (2019). *O Mundo Das Abelhas*. Clube de Autores.

Franz, G. M., Ferreira, J. O., Longo, L., Loureiro, E. M., da Cruz Mendonça, J., Bárbara, K. G., & Galbiati, C. (2018). Análise polínica e compostos fenólicos de mel e própolis do Pantanal, Mato Grosso, Brasil. *Revista Ibero-Americana de Ciências Ambientais*, 9(1), 13-25. DOI: 10.6008/SPC2179-6858.2018.001.0002.

Funari, C. S., & Ferro, V. O. (2006). Análise de própolis. *Food Science and Technology*, 26(1), 171-178. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0101-20612006000100028>.

Galanakis, C. M. (2022). *The age of clean label foods*. Springer.

Guerreiro, L. (2021). *Dossiê técnico - produção de hambúrguer*. REDETEC.

Gutiérrez-Cortés, C., & Suárez, H. (2014). Antimicrobial activity of propolis and its effect on the physicochemical and sensorial characteristics in sausages. *Vitae*, 21(2), 90-96. <https://www.redalyc.org/pdf/1698/169831493003.pdf>.

Hogan, D. G. (2020). *Selling'em by the sack: White Castle and the creation of american food*. New York University Press.

Juneja, V. K., & Marks, H. M. (2002). Thermal inactivation of *Clostridium perfringens* spores in ground beef. *Journal of Food Protection*, 65(1) 124–130.

Kolc, C. S. M. (2014). *Composição química de própolis amarela do Mato Grosso do Sul: comparação com os tipos de própolis verde, vermelha e marrom*. (Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual do Centro-Oeste) – Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da Unicentro. <http://localhost:8080/tede/handle/tede/294>.

Kunrath, C. A., Savoldi, D. C., Mileski, J. P. F., Novello, C. R., Alfaro, A. D. T., Marchi, J. F., & Tonial, I. B. (2017). Application and evaluation of propolis, the natural antioxidant in Italian-type salami. *Brazilian Journal of Food Technology*, 20. DOI: 10.1590/1981-6723.3516

Lacerda, R. C. C., Tiveron, A. P., & de Alencar, S. M. (2011). Própolis e segurança alimentar. *Segurança alimentar e nutricional*, 18(2), 99-106. DOI: 10.20396/san.v18i2.8634682.

Lachno, A. S., Dutra, R., Severo, J., dos Santos Oliveira, M., & de Oliveira, L. R. C. (2019). Bioaditivos e aditivos naturais em alimentos: Corantes, antioxidantes e aromatizantes. *Boletim Técnico-Científico*, 5(2), 79-93. DOI: 10.26669/2359-2664.2019.233.

Leão, L. L., Oliveira, F. S., Souza, R. S., Farias, P. K. S., da Fonseca, F. S. A., Martins, E. R., & de Souza, R. M. (2017). Uso de antioxidantes naturais em carnes e seus subprodutos. *Caderno de Ciências Agrárias*, 9(1), 94-100. <https://periodicos.ufmg.br/index.php/ccaufmg/article/view/2951>.

Libardi, S. H., Pindstrup, H., Cardoso, D. R., & Skibsted, L. H. (2013). Reduction of ferrylmyoglobin by hydrogen sulfide: kinetics in relation to meat greening. *Journal of agricultural and food chemistry*, 61(11), 2883-2888. DOI: 0.1021/jf305363e.

Lima, E. E. L., Nascimento, T. R., de Souza, D. M., da Silva, I. A., Rodrigues, M. C., Jordão, J. L., ... & de Oliveira Toss, A. F. (2023). The importance of microbiological analysis in food. *Concilium*, 23(5), 74-85. <https://www.clium.org/index.php/edicoes/article/view/1031>

Lima, F. O., & Bezerra, A. S. (2012). Flavonoides e radicais livres. *Disciplinarum Scientiam*, 13(1), 111-124. <https://periodicos.ufrn.edu.br/index.php/disciplinarumNT/article/view/1298>.

Lima, R. D. (2015). *Características biológicas da geoprópolis da abelha social sem ferrão Uruçu (Melipona scutellaris Latreille, 1811) proveniente da Baía do Iguape-BA*. (Dissertação de Mestrado Acadêmico em Ciências Agrárias, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas, Universidade Federal do Recôncavo da Bahia). Repositório Institucional UFRB. <http://ri.ufrb.edu.br/jspui/handle/123456789/923>.

Loebler, M., Sánchez, C., Santos, M., Vasilenko, P., Duarte, M. P., Cruz, A., & Gonçalves, M. (2018). Aplicação de extratos de própolis para conservação pós-colheita de morangos. *Vida rural*, 1837, 38-40.

Long, N. B. S., Gál, R., & Buňka, F. (2011). Use of phosphates in meat products. *African Journal of Biotechnology*, 10(86), 19874-19882. DOI: 10.5897/AJBX11.023.

Longhini, R., Raksa, S. M., Oliveira, A. C. P., Svidzinski, T. I., & Franco, S. L. (2007). Obtenção de extratos de própolis sob diferentes condições e avaliação de sua atividade antifúngica. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 17(3), 388-395. DOI: 10.1590/S0102-695X2007000300015.

Lopes, A. C. C. B., Reinaldo, I. B., Lima, N. P., Silva, A. M., Firmino, E. G., & Melo, N. M. V. (2021). Caracterização química e comparação entre hambúrguer artesanal e o industrializado. *Acta Tecnológica*, 16(1), 73-86. DOI: 10.35818/acta.v16i1.952.

Lozano, C., de Paula Castania, V., de Rezende-Lago, N. C. M., de Marchi, P. G. F., Silva, L. A., de Amorim, G. C., ... & Messias, C. T. (2021). Qualidade microbiológica de alimentos. *Research, Society and Development*, 10(14), e572101422344-e572101422344. <https://rsdjournal.org/index.php/rsd/article/view/22344>.

Luiggi, F. G. G., Pacheco, P. D. G., Racanicci, A. M. C., Muynarsk, E. D. S. M., Sartori, M. M. P., & Sartori, J. R. (2020). O uso da bixina como antioxidante natural em dietas de frangos de corte formuladas com óleo de soja fresco ou oxidado. *Arch Vet Sci*, 25(2), p. 79-93. DOI: 10.5380/avs.v25i2.67918.

- Maia, Y. L. F., de Souza, C. O., Druzian, J. I., Padilha, F. F., & Orellana, S. C. (2012). Uso de biofilme de amido à base de própolis vermelha para a conservação de folhas de alface (*Lactuca sativa*). *Scientia Plena*, 8(12), p 1.13. <https://www.scientiaplenu.org.br/sp/article/view/1159>.
- Manea, A. I. M., Moigradean, D., Raba, D. N., Stoin, D., Popa, V. M., Ravis, A., & Poiana, M. A. (2022). Challenges and approaches in the use of natural antioxidants of plant origin as food additives in meat and meat products. *Journal of Agroalimentary Processes & Technologies*, 28(1), 46-53. <https://journal-of-agroalimentary.ro>.
- Mani, F., Damasceno, H. C. R., Novelli, E. L. B., Martins, E. A. M., & Sforcin, J. M. (2006). Propolis: Effect of different concentrations, extracts and intake period on seric biochemical variables. *Journal of ethnopharmacology*, 105(12), 95-98. DOI: 10.1016/j.jep.2005.10.011.
- Marcucci, M. C., & Custódio, Â. R. (2002). Própolis: correlação química e biológica. *Revista Chemkeys*, (10), 1-23. DOI: 10.20396/chemkeys.v0i10.9640.
- Marini, D., Kotz, T. E., Dartora, J., Freiburger, M. B., Pauletti, D. R., & Stangarlin, J. R. (2009). Atividade Antimicrobiana In Vitro de Extratos Alcoólicos de Própolis contra *Elsinoe ampelina*. *Revista Brasileira de Agroecologia*, 4(2), 1447-1450. <https://revistas.aba-agroecologia.org.br/rbagroecologia/article/view/8276>.
- Marques, E. C., Marques, R. C., & da Costa, S. R. R. (2015). Aspectos da tecnologia de extrusão termoplástica em alimentos sobre a saúde do consumidor. *Revista Gestão & Saúde*, 6(2), 1935-1951. <https://periodicos.unb.br/index.php/rgs/article/view/3037>.
- Masson, J., & Gelinski, J. L. N. (2014). Aspectos tecnológicos e de segurança de alimentos no processo de soja texturizada para a alimentação humana. *Unoesc & Ciência-ACET*, 5(1), 7-22.
- Meireles, S. D. F. (2018). *Leveduras associadas ao ninho das abelhas sem ferrão Melipona interrupta e Cephalotrigona femorata (Apidae: Meliponini): identificação e aspectos biotecnológicos*. (Dissertação de Mestrado em Biotecnologia, Universidade Federal do Amazonas). Biblioteca Digital Brasileira de Teses e Dissertações – BTDT. <https://tede.ufam.edu.br/handle/tede/6771>.
- Menezes, C. (2015). *Abelhas sem ferrão e microrganismos*. Associação Brasileira de Estudos das Abelhas. <https://abelha.org.br/abelhas-sem-ferrao-e-microrganismos-parte-1/>
- Menezes, H. (2022). Própolis: uma revisão dos recentes estudos de suas propriedades farmacológicas. *Arquivos do Instituto biológico*, 72(3), 405-411. DOI: <https://doi.org/10.1590/1808-1657v72p4052005>.
- Ministério da Agricultura. Portaria SDA nº 724, de 23 de dezembro de 2022. *Diário Oficial da União*, 242 (dezembro), 10. <https://www.in.gov.br/en/web/dou/-/portaria-sda-n-724-de-23-de-dezembro-de-2022-453548742>.
- Moreira, L., Rogão, M., & Estevinho, L. M. (2011). Propólis ao longo da história da humanidade. *O Apicultor*, 20(73), 21-24. <http://hdl.handle.net/10198/10089>.
- 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, 105973. DOI: 10.1016/j.foodhyd.2020.105973.

Nascimento, N. M. D. (2018). *Desenvolvimento e caracterização de cookie sem glúten enriquecido com extrato e microencapsulados de própolis vermelha*. (Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Sergipe). Repositório Institucional UFS. <https://ri.ufs.br/jspui/handle/riufs/16121>.

Noronha, T. H., Vieira, D. G., da Silva Andrade, E. G., & dos Santos, W. L. (2019). Indicador de contaminação fecal alimentar e prevenção de doenças. *Revista JRG de Estudos Acadêmicos*, 2(4), 150-157. DOI: 10.5281/zenodo.4458735.

Oliveira, D. F. D., Coelho, A. R., Burgardt, V. D. C. D. F., Hashimoto, E. H., Lunkes, A. M., Marchi, J. F., & Tonial, I. B. (2013). Alternativas para um produto cárneo mais saudável: uma revisão. *Brazilian Journal of Food Technology*, 16, 163-174. DOI: 0.1590/S1981-67232013005000021.

Oliveira, G. L. D. S. (2015). Determinação da capacidade antioxidante de produtos naturais in vitro pelo método do DPPH•: estudo de revisão. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, 17(1), 36-44. DOI: 10.1590/1983-084X/12_165.

Oliveira, L. D. P. G., de Souza Gomes, G., Silva, J. R. G., Azevedo, T. C., Marques, J. S., Silva, V. R. O., ... & Franco, F. S. C. (2021). Desenvolvimento de hambúrguer bovino substituindo teores de cloreto de sódio por cloreto de potássio adicionando potenciador de sabor. *Brazilian Journal of Development*, 7(2), 13396-13415. DOI: 10.34117/bjdv7n2-114.

Orvalho, R. J. S. (2010). *Redução do teor de sódio em fiambre: implicações tecnológicas, organolépticas e de prazo de validade*. (Dissertação de Mestrado, Universidade Técnica de Lisboa). Repositório da Universidade Técnica de Lisboa. <http://hdl.handle.net/10400.5/2587>

Paludo, C. R., Menezes, C., Silva-Junior, E. A., Vollet-Neto, A., Andrade-Dominguez, A., Pishchany, G., ... & Pupo, M. T. (2018). Stingless bee larvae require fungal steroid to pupate. *Scientific reports*, 8(1), 1122. DOI: 10.1038/s41598-018-19583-9.

Pateiro, M., Lorenzo, J. M., Amado, I. R., & Franco, D. (2014). Effect of addition of green tea, chestnut and grape extract on the shelf-life of pig liver pâté. *Food Chemistry*, 147, 386-394. DOI: 10.1016/j.foodchem.2013.09.153.

Pereira, K. A. S., Souza, M. L. P., Cangirana, Y. M., Kale, V. Y. S., dos Santos, I. O. S., & da Silva, V. B. (2024). Principais espécies de Clostridium spp. veiculados por alimentos. *Brazilian Journal of Health Review*, 7(1), 2215-2227. DOI: 10.34119/bjhrv7n1-174.

Pereira, M. G. (2009). *Aplicação de antioxidantes naturais em carne mecanicamente separada (CMS) de ave*. (Dissertação de Mestrado, Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria). Manancial – Repositório Institucional da UFSM. <https://repositorio.ufsm.br/handle/1/5669>.

Pinho, J. P. A., de Sousa, J. V. B., Bezerra, K. C. B., & de Carvalho, L. M. F. (2020). Qualidade microbiológica de sanduíches tipo hambúrguer: uma revisão. *Research, Society and Development*, 9(10), 1-14. DOI: 10.33448/rsd-v9i10.9479.

Pinzon, C. (2022). *Avaliação da substituição de estabilizante sintético por alternativa natural em corte temperado e resfriado de frango*. (Dissertação de Mestrado, Universidade Tecnológica Federal do Paraná). RIUT – Repositório Institucional da UTFPR. <https://riut.utfpr.edu.br/jspui/handle/1/30346>.

Pires, P. G. D. S., Pires, P. D. D. S., Cardinal, K. M., Leuven, A. F. R., Kindlein, L., & Andretta, I. (2019). Effects of rice protein coatings combined or not with propolis on shelf life of eggs. *Poultry science*, 98(9), 4196-4203. DOI: 10.3382/ps/pez155.

Queiroz, A. M. P. D. (2006). *Efeitos do tripolifosfato de sódio sobre as características microbiológicas, físico-químicas e vida-de-prateleira em linguiça frescal de frango*. (Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul). LUME – Repositório Digital da UFRGS. <https://lume.ufrgs.br/handle/10183/6758>.

Queiroz, A. P. M., Rocha, E. L., dos Reis Rocha, L., & Dias, R. M. F. (2021). Atividade antimicrobiana do extrato de própolis: uma revisão. *Revista Ciência (In)Cena*, 1(8), 42-55. estacio.periodicoscientificos.com.br/index.php/cienciaincenabahia/article/view/5.

Ramos, M. A. (1997). *Estudo da flora microbiana em colméia de *Melipona scutellaris* Latreille, 1811*. (Dissertação de Mestrado, Centro de Ciências Biomédicas, Universidade Federal de Uberlândia). Repositório Institucional da UFU. <https://repositorio.ufu.br/bitstream/123456789/28985/1/EstudoFloraMicrobiana.pdf>.

Rego, R. A., Vialta, A., & Madi, L. F. C. (2021). *Hambúrgueres industrializados: nutrição prática de forma segura e sustentável*. BB.

Reis, A. S., Diedrich, C., de Moura, C., Pereira, D., de Flório Almeida, J., da Silva, L. D., ... & Carpes, S. T. (2017). Physico-chemical characteristics of microencapsulated propolis co-product extract and its effect on storage stability of burger meat during storage at -15 °C. *LWT-Food Science and Technology*, 76, 306-313. DOI: 10.1016/j.lwt.2016.05.033.

Ribeiro, A. L. C., Santos, R. P. D., Cassiano, V. A., Louvandini, H., Takabatake, T. T., Rufino, M. N., ... & Ribeiro, G. F. (2022). Processo de fabricação do hambúrguer. *Open science research*, 7(1), 972-982. DOI: 10.37885/221010675.

Ribeiro, J. S., Santos, M. J. M. C., Silva, L. K. R., Pereira, L. C. L., Santos, I. A., da Silva Lannes, S. C., & da Silva, M. V. (2019). Natural antioxidants used in meat products: A brief review. *Meat science*, 148(esp.), 181-188. DOI: 10.1016/j.meatsci.2018.10.016.

Rodrigues, M. S. A. (2019). *Uso de revestimento e aditivo a base de extratos de própolis na conservação de hambúrguer bovino*. (Tese de Doutorado, Universidade Federal de Campina Grande). Repositório da UFCG. <http://dspace.sti.ufcg.edu.br:8080/jspui/handle/riufcg/28000>.

Rodriguez, A. R., Areche, F. O., Landeo, O. T., Pacovilca-Alejo, O. V., Zea Montesinos, C. C., Malpartida Yapias, R. J., ... & Ullah, S. (2023). Effect of propolis as a preservative applied to alpaca (Vicugna pacos) meat hamburger, Huancavelica, Peru. *Current Research in Nutrition &*

Food Science, 11(1), 401. DOI: 10.12944/CRNFSJ.11.1.30.

Salgueiro, F. B. (2016). *Caracterização da própolis verde brasileira: substâncias fenólicas, atividade biológica e análise quimiométrica*. (Tese de Doutorado, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro). RIAM – Repositório Digital da UFRRJ. <https://rima.ufrj.br/jspui/handle/20.500.14407/10259>.

Salgueiro, F. B., & Castro, R. N. (2016). Comparação entre a composição química e capacidade antioxidante de diferentes extratos de própolis verde. *Química Nova*, 39(10), 1192-1199. DOI: 10.21577/0100-4042.20160136.

Sampaio, G. R., Saldanha, T., Soares, R. A. M., & Torres, E. A. F. S. (2012). Effect of natural antioxidant combinations on lipid oxidation in cooked chicken meat during refrigerated storage. *Food chemistry*, 135(3), 1383-1390. DOI: 10.1016/j.foodchem.2012.05.103.

Santini, A. T., Silva, C. L., Galera, F. A., Santini, P. T., Martins, E. A. N., Ikegaki, M., & Ribeiro, I. S. (2021). Otimização do método de extração e efeito sazonal nas atividades biológicas e compostos fenólicos da própolis verde brasileira. *Holos*, 37(7), 1-17. DOI: 10.15628/holos.2021.11316.

Santos, A. L. (2007). *Identificação da flora microbiana em colméias de meliponina*. (Dissertação de Mestrado em Ciências Biológicas, Instituto de Genética e Bioquímica, Universidade Federal de Uberlândia). Repositório Institucional UFU. <https://repositorio.ufu.br/handle/123456789/15899>.

Scazzocchio, F., D'auria, F. D., Alessandrini, D., & Pantanella, F. (2006). Multifactorial aspects of antimicrobial activity of propolis. *Microbiological research*, 161(4), 327-333. DOI: 10.1016/j.micres.2005.12.003.

Silici, S., & Karaman, K. (2014). Inhibitory effect of propolis on patulin production of *Penicillium expansum* in apple juice. *Journal of food processing and preservation*, 38(3), 1129-1134. DOI: 10.1111/jfpp.12072.

Silva, F. L., Silva, T. D. S., Vargas, F. C., Franzolin, R., & Trindade, M. A. (2014). Nota Científica: Características físico-químicas e aceitação sensorial de hambúrguer de búfalo em comparação com hambúrguer bovino. *Brazilian Journal of Food Technology*, 17(4), 340-344. DOI: 10.1590/1981-6723.2614.

Silva, L. M., de Paula, K. C. S. E., & Fausta, K. Y. (2021). *Aditivos Alimentares*. Essentia.

Smith, A. F. (2008). *Hamburger: a global history*. Reaktion Books.

Soares, A. L. F., Bilezikdjian, P. J., Elias, P. C., Medeiros, P. C. M., & Souza, L. A. (2017). Identidade e qualidade de diferentes extratos de propolis. *Revista Gestão em Foco*, 9, 255-275. <https://encurtador.com.br/IcFM4>.

Sobreira, A. L., de Araújo Silva, M. M., Okamura, L. S., de Souza, J. B. P., & Carmo, E. S. (2020). Atividade antifúngica do extrato etanólico de própolis vermelha contra isolados patogênicos de *Candida* spp. *Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável*, 15(4), 429-433. DOI: 10.18378/rvads.v15i4.7969.

Sousa, J. P. L. M., Pires, L. D. O., Prudêncio, E. R., Santos, R. F., Sant'Ana, L. D., Ferreira, D. A. S., & Castro, R. N. (2019). Estudo químico e potencial antimicrobiano da própolis brasileira produzida por diferentes espécies de abelhas. *Revista Virtual de Química*, 11(5), 1480-1497. <https://rvq-sub.sbq.org.br/index.php/rvq/article/view/3493>.

Souza, E. A. D. (2015). *Própolis na dieta de abelhas Apis mellifera L. e seu efeito no sistema imune, expressão de genes após o desafio bacteriano e detoxificação frente ao agroquímico fipronil*. (Tese de Doutorado, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista). Repositório Institucional UNESP. <http://hdl.handle.net/11449/132422>.

Sy, L. B., Wu, Y. L., Chiang, B. L., Wang, Y. H., & Wu, W. M. (2006). Propolis extracts exhibit an immunoregulatory activity in an OVA-sensitized airway inflammatory animal model. *International Immunopharmacology*, 6(7), 1053-1060. DOI: 10.1016/j.intimp.2006.01.015.

Tiago, M. R. M. (2017). *Microbiota fúngica cultivável associada às colmeias e castas de Melipona interrupta e Melipona seminigra (Apidae, Meliponini)*. (Dissertação de Mestrado, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia). Repositório Institucional INPA. <https://repositorio.inpa.gov.br/handle/1/37597>.

União Europeia. (2005). Regulamento (CE) n.º 2073/2005 da comissão de 15 de novembro de 2005. *Diário Oficial da União Europeia*, 388 (novembro). <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/PT/TXT/HTML/?uri=CELEX:32005R2073>.

Vargas, A. C. D., Loguercio, A. P., Witt, N. M., Costa, M. M. D., Silva, M. S., & Viana, L. R. (2004). Atividade antimicrobiana “in vitro” de extrato alcóolico de própolis. *Ciência Rural*, 34(1), 159-163. DOI: 10.1590/S0103-84782004000100024.

Vargas-Sánchez, R. D., Torrescano-Urrutia, G. R., Acedo-Félix, E., Carvajal-Millán, E., González-Córdova, A. F., Vallejo-Galland, B., ... & Sánchez-Escalante, A. (2014). Antioxidant and antimicrobial activity of commercial propolis extract in beef patties. *Journal of Food science*, 79(8), C1499-C1504. DOI: 10.1111/1750-3841.12533.

Vargas-Sánchez, R. D., Torrescano-Urrutia, G. R., Torres-Martínez, B. D. M., Pateiro, M., Lorenzo, J. M., & Sánchez-Escalante, A. (2019). Propolis extract as antioxidant to improve oxidative stability of fresh patties during refrigerated storage. *Foods*, 8(12), 614. DOI: 10.3390/foods8120614.

Vasilaki, A., Hatzikamari, M., Stagkos-Georgiadis, A., Goula, A. M., & Mourtzinis, I. (2019). A natural approach in food preservation: Propolis extract as sorbate alternative in non-carbonated beverage. *Food chemistry*, 298, 125080. DOI: 10.1016/j.foodchem.2019.125080.

Viera, V. B., Piovesan, N., Moro, K. I. B., Rodrigues, A. S., Scapin, G., Rosa, C. S. D., & Kubota, E. H. (2016). Preparation and microbiological analysis of Tuscan sausage with added propolis extract. *Food Science and Technology*, 36(suppl 1), 37-41. DOI: 10.1590/1678-457X.0045.