

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ZOOTECNIA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS

CAMILY APARECIDA REIS

**Desenvolvimento de filmes ativos incorporados com própolis vermelha bruta
encapsulada em emulsões**

Pirassununga

2024

CAMILY APARECIDA REIS

**Desenvolvimento de filmes ativos incorporados com própolis vermelha bruta
encapsulada em emulsões**

Versão corrigida

Tese apresentada à Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutora em Ciências da Engenharia de Alimentos do programa de pós-graduação em Engenharia de Alimentos.

Área de Concentração: Ciências da Engenharia de Alimentos

Orientador: Prof. Dr. Paulo José do Amaral Sobral

Pirassununga

2024

Ficha catalográfica elaborada pelo
Serviço de Biblioteca e Informação, FZEA/USP,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

R375d Reis, Camily Aparecida
Desenvolvimento de filmes ativos incorporados
com própolis vermelha bruta encapsulada em emulsões
/ Camily Aparecida Reis ; orientador Paulo José do
Amaral Sobral. -- Pirassununga, 2024.
156 f.

Tese (Doutorado - Programa de Pós-Graduação em
Engenharia de Alimentos) -- Faculdade de Zootecnia
e Engenharia de Alimentos, Universidade de São
Paulo.

1. Filmes ativos. 2. Emulsões. 3. Própolis
vermelha. 4. Biopolímeros. 5. Atividade
antioxidante. I. Sobral, Paulo José do Amaral,
orient. II. Título.

*À minha vó Ana,
por aguentar a saudade e
sonhar os sonhos comigo.
Dedico.*

Agradecimentos

Este trabalho não seria possível sem a dedicação e o auxílio de várias pessoas que cruzaram meu caminho.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001. Agradeço também à FAPESP (2013/07914-8) e ao CNPq (40.3746/2021-3) pelos financiamentos que permitiram a realização deste trabalho.

À empresa Essenciale, pela doação da própolis vermelha bruta, obrigada por colaborar com nossa pesquisa.

Ao meu orientador, Professor Dr. Paulo José do Amaral Sobral, por me dar suporte em um momento difícil e acreditar em mim, quando eu mesma já não acreditava. Obrigada pelos ensinamentos, pela paciência, pelo apoio. Obrigada por tudo. O senhor é uma inspiração para mim.

À Dra. Andresa Gomes, por estar a meu lado, por me ensinar, me apoiar, não somente na área acadêmica, mas na vida, pela amizade, pelo suporte nos momentos mais complicados e por estar sempre disposta a me auxiliar. Obrigada por me acompanhar nesta jornada.

Aos técnicos dos laboratórios do departamento de Engenharia de Alimentos, em especial Rodrigo, Ana Mônica, Marcelo, Carla e Alan, pelo suporte e conhecimentos compartilhados.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, em especial a Profa. Dra. Izabel Cristina Freitas Moraes e a Profa. Dra. Samantha Cristina de Pinho, por compartilharem seus conhecimentos e serem inspiração em sala de aula.

Aos meus amigos, aos distantes, aos que fiz em Pirassununga na FZEA ou nas escolas por onde passei, meu eterno agradecimento, a vida é muito melhor quando compartilhada com outras pessoas que tornaram esta jornada menos difícil. Em especial, à Yohanna, minha psicóloga, que me guiou no processo de autoconhecimento, e me fez ser melhor a cada dia, podendo ser possível chegar onde cheguei.

Ao meu namorado, Fábio, por estar ao meu lado, ser meu companheiro, ser meu suporte, meu apoio, obrigada por me compreender e me incentivar, mesmo nos momentos mais difíceis. Aos meus sogros, por ser meu apoio em São Paulo.

Às minhas tias, Sirlene e Simone, nada disso seria possível se não fosse por vocês, obrigada por serem minha segurança e por torcer e vibrar a cada conquista junto comigo.

À minha vó, Ana, meu bem precioso, obrigada por aguentar a distância, riscar cada dia no calendário aguardando a visita, por me apoiar nos meus sonhos e sonhá-los comigo.

Ao meu irmão, Iago, que sempre esteve ao meu lado, e segue meus passos, obrigada por ser meu melhor amigo. Ao meu caçula, Otávio, por aguentar a saudade da madrinha, mas gosta dos presentes de longe.

Ao meu pai, Saumir, que chora nas despedidas por nos deixar longe de casa, mas sempre nos apoia em nossos sonhos e está lá para nos guiar aos próximos caminhos.

À minha mãe, Teresinha, por ser meu porto seguro, a que chora junto, a que sofre junto, que fica feliz junto, a que comemora as conquistas junto. Você já tem uma graduação, um mestrado e agora um doutorado, junto.

À toda minha família, amo vocês.

Em especial, a mim mesma, que conseguiu superar todos os obstáculos, e não foram poucos, conseguiu se reerguer, conseguiu ter determinação, força e coragem. Obrigada por não desistir de você mesma.

À Deus, que sempre esteve ao meu lado, e me guiou nos momentos mais difíceis para que este dia chegasse.

A todos, que de qualquer forma, contribuíram com esta conquista, meu eterno agradecimento.

*“O correr da vida embrulha tudo.
A vida é assim: esquenta e esfria,
aperta e daí afrouxa,
sossega e depois desinquieta.
O que ela quer da gente é coragem”*

Guimarães Rosa

Resumo

REIS, C. A. **Desenvolvimento de filmes ativos incorporados com própolis vermelha bruta encapsulada em emulsões.** 2024. 156 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2024.

A própolis vermelha apresenta propriedades antioxidante e antimicrobiana, o que faz com que ela apresente grande potencial para aplicação na área de alimentos. Entretanto, sua baixa solubilidade em água pode limitar sua aplicação nesta área. A própolis vermelha bruta pode então ser utilizada na sua forma emulsificada, a fim de proteger seus compostos e permitir sua dispersão em um sistema aquoso, como no caso de filmes ativos biopoliméricos para aplicação como embalagem de alimentos. Assim, o objetivo desta tese foi o desenvolvimento de filmes ativos a base de gelatina ou isolado proteico de soja incorporados de própolis vermelha bruta encapsulada em emulsões óleo em água (O/A) empregando diferentes emulsificantes. Para selecionar as melhores emulsões foi empregado um planejamento experimental Box-Behnken, sendo as variáveis estudadas a concentração de emulsificante (Tween 80 ou saponina), de PGPR (poliricinoleato de poliglicerol) e número de ciclos. As variáveis resposta foram o índice de estabilidade, diâmetro médio de gota e *span*. O caseinato de sódio também foi empregado, variando-se a concentração deste para a produção da melhor emulsão. As emulsões selecionadas foram caracterizadas quanto a sua cor, pH, comportamento reológico, atividade antioxidante e antimicrobiana. Os filmes ativos à base de gelatina ou isolado proteico de soja foram produzidos a partir da incorporação das emulsões selecionadas. Estes foram caracterizados quanto a sua microestrutura, propriedades térmicas, propriedades mecânicas, propriedades ópticas, atividade antioxidante e antimicrobiana. Os resultados mostraram que a concentração de emulsificante apresentou efeito sobre a estabilidade e tamanho de gota das emulsões encapsulando própolis vermelha bruta e que o Tween 80 foi o emulsificante capaz de produzir a emulsão com melhor estabilidade. As emulsões apresentaram um comportamento reológico de fluido newtoniano, atividade antioxidante e atividade antimicrobiana contra bactérias gram positivas. A incorporação das emulsões nos filmes ativos, à base de gelatina ou isolado proteico de soja, produziram filmes com a presença de gotas de óleo na superfície e porosos internamente. O ângulo de contato de água, a solubilidade em água e o brilho diminuíram nos filmes de gelatina e isolado proteico de soja com a incorporação das emulsões. A emulsão causou o aumento da barreira à luz UV/visível e filmes mais resistentes e extensíveis, no caso da gelatina, exceto o filme com incorporação da emulsão emulsificada com

caseinato de sódio. Já para os filmes de isolado proteico de soja, as emulsões provocaram um aumento na elongação na ruptura, mas não afetaram sua resistência. Apesar de as emulsões apresentarem atividade antimicrobiana contra bactérias gram positivas, os filmes ativos não exibiram a formação de halo de inibição. Os filmes ativos apresentaram atividade antioxidante, independente do emulsificante utilizado na produção das emulsões. Assim, observou-se que os filmes ativos incorporados de emulsões encapsulando própolis vermelha bruta apresentou grande potencial para aplicação como embalagem ativa de alimentos passíveis de oxidação.

Palavras – chave: Biopolímeros; Proteínas; Filmes Biodegradáveis; Estabilidade Física; Atividade Antioxidante; Barreira UV/Vis.

Abstract

REIS, C. A. **Development of active films incorporated with crude red propolis encapsulated in emulsions.** 2024. 156 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2024.

Red propolis has antioxidant and antimicrobial properties, which means it has great potential for application in the food sector. However, its low solubility in water may limit its application in this area. Crude red propolis can be used in its emulsified form, in order to protect its compounds and allow their dispersion in an aqueous system, as in the case of biopolymeric active films for application as food packaging. Thus, the objective of this thesis was the development of active films based on gelatin or soy protein isolate incorporated with crude red propolis encapsulated in oil-in-water (O/W) emulsions using different emulsifiers. To select the best emulsions, a Box-Behnken experimental design was used, with the variables studied being the concentration of emulsifier (Tween 80 or saponin), PGPR (polyglycerol polyricinoleate) and number of cycles. The response variables were the stability index, average droplet diameter and polydispersity index. Sodium caseinate was also used, varying its concentration to produce the best emulsion. The selected emulsions were characterized regarding their color, pH, rheological behavior, antioxidant and antimicrobial activity. Active films based on gelatin or soy protein isolate were produced by incorporating the selected emulsions. These were characterized regarding their microstructure, thermal properties, mechanical properties, optical properties, antioxidant and antimicrobial activity. The results showed that the emulsifier concentration had an effect on the stability and droplet size of the emulsions encapsulating crude red propolis and that Tween 80 was the emulsifier capable of producing the emulsion with the best stability. The emulsions showed a rheological behavior of Newtonian fluid, antioxidant activity and antimicrobial activity against gram positive bacteria. The incorporation of emulsions into active films, based on gelatin or soy protein isolate, produced films with the presence of oil droplets on the surface and internally porous. The water contact angle, water solubility and gloss decreased in gelatin and soy protein isolate films with the incorporation of emulsions. The emulsion caused an increase in the barrier to UV/visible light and more resistant and extensible films, in the case of gelatin, except for the film incorporating the emulsion emulsified with sodium caseinate. As for soy protein isolate films, the emulsions caused an increase in elongation at break, but did not affect their resistance. Although the emulsions

showed antimicrobial activity against gram positive bacteria, the active films did not exhibit the formation of an inhibition halo. The active films showed antioxidant activity, regardless of the emulsifier used in the production of the emulsions. Thus, it was observed that active films incorporated into emulsions encapsulating crude red propolis had great potential for application as active packaging for foods subject to oxidation.

Keywords: Biopolymers; Proteins; Biodegradable Films; Physical Stability; Antioxidant activity; UV/Vis barrier.

Lista de figuras

Figura 1 – Própolis vermelha na sua forma bruta.....	30
Figura 2 – Exemplos de ação de emulsificantes utilizados na produção de emulsões.	37
Figura 3 – Esquema de produção e aplicação de filmes ativos biopoliméricos incorporados de emulsões encapsulando compostos ativos.....	41
Figura 4 – Própolis vermelha bruta em corte transversal (a) e após trituração (b).....	46
Figura 5 – Termograma obtido por calorimetria diferencial de varredura da própolis vermelha bruta na 1 ^a e 2 ^a varreduras.	63
Figura 6 – Difratoograma de raios X da própolis vermelha bruta triturada antes (PVBT) e após sua fusão (PVBT – Fundida).	64
Figura 7 – Micrografias do sedimentado obtido na produção das emulsões após filtração em papel filtro em aumento de (a) 100 X, (b) 250 X, (c) 500 X e (d) 1500 X.	65
Figura 8 – Perfis de transmissão das emulsões encapsulando própolis vermelha bruta em diferentes concentrações: 1% m/m (a), 2% m/m (b) e 3% m/m (c).....	66
Figura 9 – Emulsões produzidas pelo planejamento experimental com o emulsificante Tween 80 nos ensaios de 1 a 12 e do ponto central (PC).	67
Figura 10 – Emulsões produzidas pelo planejamento experimental com o emulsificante saponina nos ensaios de 1 a 12 e do ponto central (PC).	67
Figura 11 – Perfis de transmissão das emulsões produzidas pelo planejamento experimental com emulsificante Tween 80 dos ensaios de 1 a 12 e do ponto central (PC). Fotografias das respectivas emulsões dentro das cubetas estão em encarte em cada figura.	71
Figura 12 – Perfis de transmissão das emulsões produzidas pelo planejamento experimental com emulsificante saponina dos ensaios de 1 a 12 e do ponto central (PC). Fotografias das respectivas emulsões dentro das cubetas estão em encarte em cada figura.	72
Figura 13 – Índice de estabilidade em função da concentração de Tween 80 (X_1).....	74
Figura 14 – Índice de estabilidade em função do número de ciclos (X_3) para as emulsões produzidas com saponina.	75
Figura 15 – Distribuição de tamanho de gota das emulsões produzidas com Tween 80 encapsulando própolis vermelha bruta triturada nos ensaios de 1 a 12 e do ponto central (PC) do planejamento experimental.	76

Figura 16 – Distribuição de tamanho de gota das emulsões produzidas com saponina encapsulando própolis vermelha bruta triturada nos ensaios de 1 a 12 e do ponto central (PC) do planejamento experimental.....	76
Figura 17 – Superfícies de resposta para o diâmetro médio de gota (D_m) em função da concentração de Tween 80 (X_1) e de PGPR (X_2) (a), da concentração de Tween 80 (X_1) e do número de ciclos (X_3) (b) e do número de ciclos (X_3) e da concentração de PGPR (X_2) (c).	79
Figura 18 – Diâmetro médio de gota (D_m) em função da concentração de saponina (X_1).	80
Figura 19 – Superfícies de resposta para o <i>span</i> em função da concentração de Tween 80 (X_1) e de PGPR (X_2) (a) e da concentração de Tween 80 (X_1) e do número de ciclos (X_3) (b).	83
Figura 20 – Emulsões encapsulando própolis vermelha bruta triturada produzidas com emulsificante caseinato de sódio em concentrações de (1) 0,2% m/m; (2) 0,6% m/m; (3) 1,0% m/m e (4) 1,4% m/m.	84
Figura 21 – Perfis de transmissão para as emulsões produzidas com caseinato de sódio nas concentrações de (1) 0,2% m/m; (2) 0,6% m/m; (3) 1,0% m/m e (4) 1,4% m/m. Fotografias das respectivas emulsões dentro das cubetas estão em encarte em cada figura.	86
Figura 22 – Distribuição de tamanho de gota das emulsões encapsulando própolis vermelha bruta triturada produzidas com caseinato de sódio em diferentes concentrações.	87
Figura 23 – Perfis de transmissão das emulsões encapsulando própolis vermelha bruta triturada selecionadas produzidas com Tween 80 (a) e saponina (b) e emulsões nas cubetas Tween 80 (c) e saponina (d) antes (1) e após o ensaio (2).	89
Figura 24 – Distribuição de tamanho de gota e micrografias ópticas das emulsões encapsulando própolis vermelha bruta triturada produzidas com Tween 80 (a,b), saponina (c,d) e caseinato de sódio (e,f).....	91
Figura 25 – Emulsões encapsulando própolis vermelha bruta triturada produzidas com os emulsificantes Tween 80 (T), saponina (S) e caseinato de sódio (C).	92
Figura 26 – Curva de fluxo para as emulsões encapsulando própolis vermelha bruta triturada produzidas com Tween 80 (a), saponina (b) e caseinato de sódio (c).	95
Figura 27 – Atividade antimicrobiana por teste de difusão em disco das emulsões encapsulando própolis vermelha bruta triturada produzidas com Tween 80 (T), saponina (S) e caseinato de sódio (C), controle positivo (+) e negativo (-) para as bactérias <i>E. coli</i> (a), <i>Salmonella</i> (b), <i>S. aureus</i> (c) e <i>L. monocytogenes</i> (d).....	97

Figura 28 – Filmes ativos à base de gelatina controle (G) e incorporados de emulsão encapsulando própolis vermelha bruta triturada produzida com Tween 80 (GT), saponina (GS) e caseinato de sódio (GC).....	99
Figura 29 – Micrografias da superfície (a, c, e, g) da seção transversal (b, d, f, h) de filmes à base de gelatina controle (a,b) e incorporados de emulsão encapsulando própolis vermelha bruta triturada produzida com Tween 80 (c,d), saponina (e,f) e caseinato de sódio (g,h).....	101
Figura 30 – Espectros FTIR (infravermelho por transformada de Fourier) para os filmes à base de gelatina controle (G) e incorporados de emulsão encapsulando própolis vermelha bruta triturada produzida com Tween 80 (GT), saponina (GS) e caseinato de sódio (GC).....	103
Figura 31 – Difratoograma de raios X para os filmes à base de gelatina controle (G) e incorporados de emulsão encapsulando própolis vermelha bruta triturada produzida com Tween 80 (GT), saponina (GS) e caseinato de sódio (GC).	104
Figura 32 – Termogramas das análises térmicas dos filmes à base de gelatina controle (G) e incorporados de emulsão encapsulando própolis vermelha bruta triturada produzida com Tween 80 (GT), saponina (GS) e caseinato de sódio (GC) para a 1ª varredura (—) e 2ª varredura (-----).....	105
Figura 33 – Gotas de água em contato com a superfície dos filmes de gelatina controle (a) e incorporados de emulsão estabilizada por Tween 80 (b), por saponina (c) e por caseinato de sódio (d).....	107
Figura 34 – Espectros UV/Visível dos filmes à base de gelatina controle (G) e incorporados de emulsão encapsulando própolis vermelha bruta triturada produzida com Tween 80 (GT), saponina (GS) e caseinato de sódio (GC).....	114
Figura 35 – Atividade antimicrobiana por teste de difusão em disco de filmes à base de gelatina controle (G) e incorporados de emulsão encapsulando própolis vermelha bruta triturada produzida com Tween 80 (GT), saponina (GS) e caseinato de sódio (GC), para o controle positivo (+) e negativo (-) e para as bactérias <i>E. coli</i> (a), <i>Salmonella</i> (b), <i>S. aureus</i> (c) e <i>L. monocytogenes</i> (d).	117
Figura 36 – Filmes ativos à base de isolado proteico de soja controle (S) e incorporados de emulsão encapsulando própolis vermelha bruta triturada produzida com Tween 80 (ST), saponina (SS) e caseinato de sódio (SC).....	119
Figura 37 – Micrografias da superfície (a, c, e, g) da seção transversal (b, d, f, h) de filmes à base de isolado proteico de soja controle (a,b) e incorporados de emulsão encapsulando própolis	

vermelha bruta triturada produzida com Tween 80 (c,d), saponina (e,f) e caseinato de sódio (g,h).....	121
Figura 38 – Espectros FTIR (infravermelho por transformada de Fourier) para os filmes à base de isolado proteico de soja controle (S) e incorporados de emulsão encapsulando própolis vermelha bruta triturada produzida com Tween 80 (ST), saponina (SS) e caseinato de sódio (SC).....	122
Figura 39 – Difratoograma de raios X para os filmes à base de isolado proteico de soja controle (S) e incorporados de emulsão encapsulando própolis vermelha bruta triturada produzida com Tween 80 (ST), saponina (SS) e caseinato de sódio (SC).....	123
Figura 40 – Termogramas das análises térmicas dos filmes à base de isolado proteico de soja controle (S) e incorporados de emulsão encapsulando própolis vermelha bruta triturada produzida com Tween 80 (ST), saponina (SS) e caseinato de sódio (SC) para a 1ª varredura (——) e 2ª varredura (-----).....	124
Figura 41 – Gotas de água em contato com a superfície dos filmes de isolado proteico de soja controle (a) e incorporados de emulsão estabilizada por Tween 80 (b), por saponina (c) e por caseinato de sódio (d).....	127
Figura 42 – Espectros UV/Visível dos filmes à base de isolado proteico de soja controle (S) e incorporados de emulsão encapsulando própolis vermelha bruta triturada produzida com Tween 80 (ST), saponina (SS) e caseinato de sódio (SC).	133
Figura 43 – Atividade antimicrobiana por teste de difusão em disco de filmes à base de isolado proteico de soja controle (S) e incorporados de emulsão encapsulando própolis vermelha bruta triturada produzida com Tween 80 (ST), saponina (SS) e caseinato de sódio (SC), para o controle positivo (+) e negativo (-) e para as bactérias <i>E. coli</i> (a), <i>Salmonella</i> (b), <i>S. aureus</i> (c) e <i>L. monocytogenes</i> (d).	135

Lista de tabelas

Tabela 1 – Principais componentes encontrados na própolis vermelha.....	33
Tabela 2 – Propriedades ativas da própolis vermelha.....	34
Tabela 3 – Estudos sobre filmes ativos à base de biopolímeros incorporados de sistemas emulsificados encapsulando compostos ativos.....	41
Tabela 4 – Variáveis independentes codificadas e reais do delineamento experimental.....	49
Tabela 5 – Matriz do delineamento experimental Box-Behnken em variáveis codificadas e reais.....	49
Tabela 6 – Parâmetros de cor (L^* , a^* , b^*), croma (C^*) e ângulo Hue (H^*) da própolis vermelha bruta (PVB) e triturada (PVBT).....	62
Tabela 7 – Índice de estabilidade das emulsões com diferentes concentrações de própolis vermelha bruta triturada (PVBT).....	67
Tabela 8 – Matriz do delineamento experimental e resultados previstos e experimentais das variáveis resposta índice de estabilidade, diâmetro médio de gota (D_m) e <i>span</i> para as emulsões produzidas com Tween 80 encapsulando própolis vermelha bruta triturada (PVBT).....	68
Tabela 9 – Matriz do delineamento experimental e resultados previstos e experimentais das variáveis resposta índice de estabilidade, diâmetro médio de gota (D_m) e <i>span</i> para as emulsões produzidas com saponina encapsulando própolis vermelha bruta triturada (PVBT).....	69
Tabela 10 – Tabela dos coeficientes de regressão para a variável resposta índice de estabilidade para o planejamento experimental com emulsificante Tween 80 e saponina.....	73
Tabela 11 – Análise de variância da regressão para a variável resposta índice de estabilidade para o planejamento experimental com emulsificantes Tween 80 e saponina.....	73
Tabela 12 – Tabela dos coeficientes de regressão para a variável resposta diâmetro médio de gota para o planejamento experimental com emulsificante Tween 80 e saponina.....	77
Tabela 13 – Análise de variância da regressão para a variável resposta diâmetro médio de gota para o planejamento experimental com emulsificantes Tween 80 e saponina.....	77
Tabela 14 – Tabela dos coeficientes de regressão para a variável resposta <i>span</i> para o planejamento experimental com emulsificante Tween 80 e saponina.....	81
Tabela 15 – Análise de variância da regressão para a variável resposta <i>span</i> para o planejamento experimental com emulsificantes Tween 80 e saponina.....	81
Tabela 16 – Melhores condições para produção de emulsões encapsulando própolis vermelha bruta triturada utilizando os emulsificantes Tween 80 e saponina.....	82

Tabela 17 – Índice de estabilidade das emulsões encapsulando própolis vermelha bruta triturada produzidas com emulsificante caseinato de sódio em diferentes concentrações.....	85
Tabela 18 – Diâmetro médio de gota (D_m) e <i>span</i> das emulsões encapsulando própolis vermelha bruta triturada produzidas com caseinato de sódio.....	88
Tabela 19 – Valores previstos pelos modelos e experimentais das variáveis índice de estabilidade, diâmetro médio de gota (D_m) e <i>span</i> de emulsões encapsulando própolis vermelha bruta triturada produzidas com Tween 80 e saponina.	88
Tabela 20 – Parâmetros de cor (L^* , a^* , b^*), ângulo Hue (H^*) e croma (C^*) das emulsões encapsulando própolis vermelha bruta triturada produzidas com os emulsificantes Tween 80 (T), saponina (S) e caseinato de sódio (C).	93
Tabela 21 – pH das emulsões encapsulando própolis vermelha bruta triturada produzidas com emulsificantes Tween 80 (T), saponina (S) e caseinato de sódio (C).....	94
Tabela 22 – Viscosidade (μ) e tensão limite de escoamento (τ_0) das emulsões encapsulando própolis vermelha bruta triturada produzidas com Tween 80 (T), saponina (S) e caseinato de sódio (C).....	94
Tabela 23 – Compostos fenólicos totais e atividade antioxidante pelos métodos de ABTS ⁺ (2,2'-azino-bis(3-etilbenzoatiazolin)-6-ácido sulfônico) e FRAP (método de redução do íon férrico) das emulsões (E) encapsulando própolis vermelha bruta triturada produzidas com Tween 80 (T), saponina (S) e caseinato de sódio (C).	96
Tabela 24 – Halo de inibição do controle positivo (cloranfenicol) e das emulsões encapsulando própolis vermelha bruta triturada produzidas com Tween 80 (T), saponina (S) e caseinato de sódio (C).....	98
Tabela 25 – Espessura e umidade de filmes ativos à base de gelatina controle (G) e incorporados de emulsão encapsulando própolis vermelha bruta triturada produzida com Tween 80 (GT), saponina (GS) e caseinato de sódio (GC).	100
Tabela 26 – Temperaturas de transição vítrea (T_g), temperatura de fusão (T_m) e entalpia (ΔH) dos filmes à base de gelatina controle (G) e incorporados de emulsão encapsulando própolis vermelha bruta triturada produzida com Tween 80 (GT), saponina (GS) e caseinato de sódio (GC).	106
Tabela 27 – Ângulo de contato de água (ACA), solubilidade em água e permeabilidade ao vapor de água (PVA) de filmes à base de gelatina controle (G) e incorporados de emulsão encapsulando própolis vermelha bruta triturada produzida com Tween 80 (GT), saponina (GS) e caseinato de sódio (GC).....	107

Tabela 28 – Tensão na ruptura (TR), alongação na ruptura (ER) e módulo elástico (ME) de filmes à base de gelatina controle (G) e incorporados de emulsão encapsulando própolis vermelha bruta triturada produzida com Tween 80 (GT), saponina (GS) e caseinato de sódio (GC).	109
Tabela 29 – Força máxima de perfuração (FP) e deformação na perfuração (DP) de filmes à base de gelatina controle (G) e incorporados de emulsão encapsulando própolis vermelha bruta triturada produzida com Tween 80 (GT), saponina (GS) e caseinato de sódio (GC).....	111
Tabela 30 – Parâmetros de cor (L^* , a^* , b^*), diferença de cor (ΔE^*) e opacidade de filmes à base de gelatina controle (G) e incorporados de emulsão encapsulando própolis vermelha bruta triturada produzida com Tween 80 (GT), saponina (GS) e caseinato de sódio (GC).....	112
Tabela 31 – Brilho a 20° e 60° da superfície de contato com o ar de filmes à base de gelatina controle (G) e incorporados de emulsão encapsulando própolis vermelha bruta triturada produzida com Tween 80 (GT), saponina (GS) e caseinato de sódio (GC).....	113
Tabela 32 – Compostos fenólicos totais e atividade antioxidante pelos métodos de ABTS ^{•+} (2,2'-azino-bis(3-etilbenzoatiazolin)-6-ácido sulfônico) e FRAP (método de redução do íon férrico) de filmes à base de gelatina controle (G) e incorporados de emulsão encapsulando própolis vermelha bruta triturada produzida com Tween 80 (GT), saponina (GS) e caseinato de sódio (GC).	116
Tabela 33 – Espessura e umidade de filmes à base de isolado proteico de soja controle (S) e incorporados de emulsão encapsulando própolis vermelha bruta triturada produzida com Tween 80 (ST), saponina (SS) e caseinato de sódio (SC).	119
Tabela 34 – Temperaturas de transição vítrea (T_g), temperatura de fusão (T_m) e entalpia (ΔH) dos filmes à base de isolado proteico de soja controle (S) e incorporados de emulsão encapsulando própolis vermelha bruta triturada produzida com Tween 80 (ST), saponina (SS) e caseinato de sódio (SC).	125
Tabela 35 – Ângulo de contato de água (ACA), solubilidade em água e permeabilidade ao vapor de água (PVA) de filmes à base de isolado proteico de soja controle (S) e incorporados de emulsão encapsulando própolis vermelha bruta triturada produzida com Tween 80 (ST), saponina (SS) e caseinato de sódio (SC).	126
Tabela 36 – Tensão na ruptura (TR), alongação na ruptura (ER) e módulo elástico (ME) de filmes à base de isolado proteico de soja controle (S) e incorporados de emulsão encapsulando própolis vermelha bruta triturada produzida com Tween 80 (ST), saponina (SS) e caseinato de sódio (SC).....	129

Tabela 37 – Força máxima de perfuração (FP) e deformação na perfuração (DP) de filmes à base de isolado proteico de soja controle (S) e incorporados de emulsão encapsulando própolis vermelha bruta triturada produzida com Tween 80 (ST), saponina (SS) e caseinato de sódio (SC).	130
Tabela 38 – Parâmetros de cor (L^* , a^* , b^*), diferença de cor (ΔE^*) e opacidade de filmes à base de isolado proteico de soja controle (S) e incorporados de emulsão encapsulando própolis vermelha bruta triturada produzida com Tween 80 (ST), saponina (SS) e caseinato de sódio (SC).	131
Tabela 39 – Brilho a 20° e 60° da superfície de contato com o ar de filmes à base de isolado proteico de soja controle (S) e incorporados de emulsão encapsulando própolis vermelha bruta triturada produzida com Tween 80 (ST), saponina (SS) e caseinato de sódio (SC).	132
Tabela 40 – Compostos fenólicos totais e atividade antioxidante pelos métodos de ABTS ^{•+} (2,2'-azino-bis(3-etilbenzoatiazolin)-6-ácido sulfônico) e FRAP (método de redução do íon férrico) de filmes à base de isolado proteico de soja controle (S) e incorporados de emulsão encapsulando própolis vermelha bruta triturada produzida com Tween 80 (ST), saponina (SS) e caseinato de sódio (SC).	134

Lista de abreviações e siglas

A/O = Água em óleo

ABTS = 2,2'-azino-bis(3-etilbenzoatiazolin)-6-ácido sulfônico

AGE = Ácido gálico equivalente

ANOVA = Análise de variância

ASTM = *American Society for Testing and Materials*

BHI = *Brain Heart Infusion*

C = Emulsão produzida com caseinato de sódio

C* = Croma

CMC = Carboximetilcelulose

Cod. = Variável codificada

D_m = diâmetro médio de gota

DP = Deformação na perfuração

DPPH = 2,2-difenil-1-picril-hidrazila

DRX = Difração de raios X

DSC = Calorimetria diferencial de varredura

E = Emulsão

ER = Elongação da ruptura

Exp. = Experimental

F = F calculado

FP = Força na perfuração

FRAP = Método de redução do ferro

FTIR = Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier

G = Filme controle à base de gelatina

g.l. = Graus de liberdade

GC = Filme à base de gelatina incorporado de emulsão estabilizada por caseinato de sódio

GS = Filme à base de gelatina incorporado de emulsão estabilizada por saponina

GT = Filme à base de gelatina incorporado de emulsão estabilizada por Tween 80

H* = Ângulo Hue

IPS = Isolado proteico de soja

MC = Metilcelulose

ME = Módulo elástico

MEV = Microscopia eletrônica de varredura
NaBr = Brometo de sódio
NaOH = Hidróxido de sódio
NCCLS = *National Committee for Clinical Laboratory Standards*
O/A = Óleo em água
OE = Óleo essencial
ORAC = Capacidade de absorção do radical de oxigênio
p = p-valor
PC = Ponto central
PGRP = Poliricinoleato de poliglicerol
Prev. = Previsto
PVA = Permeabilidade ao vapor de água
PVB = Própolis vermelha bruta
PVBT = Própolis vermelha bruta triturada
QM = Quadrado médio
S = Emulsão produzida com saponina
S = Filme controle à base de isolado proteico de soja
S = Solubilidade em água
SC = Filme à base de isolado proteico de soja incorporado de emulsão estabilizada por caseinato de sódio
FFF = Formulação formada de filme
SQ = Soma de quadrados
SS = Filme à base de isolado proteico de soja incorporado de emulsão estabilizada por saponina
ST = Filme à base de isolado proteico de soja incorporado de emulsão estabilizada por Tween 80
T = Emulsão produzida com Tween 80
TE = Trolox equivalente
T_g = Temperatura de transição vítrea
T_m = Temperatura de fusão
TPTZ = 2,4,6-Tri-(2-piridil)-1,3,5-Triazina
TR = Tensão na ruptura
U = Umidade
UATR = *Universal Attenuator Total Reflectance*

UR = Umidade relativa

UV = Ultravioleta

Vis = visível

X_1 = Concentração de emulsificante

X_2 - Concentração de PGPR

X_3 - Número de ciclos

ΔE^* = Diferença total de cor

ΔH = Entalpia

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	26
2	OBJETIVOS E HIPÓTESE	29
2.1	OBJETIVO GERAL.....	29
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	29
2.3	HIPÓTESE	29
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	30
3.1	PRÓPOLIS	30
3.1.1	<i>Própolis vermelha.....</i>	<i>31</i>
3.2	EMULSÕES	36
3.2.1	<i>Emulsificantes.....</i>	<i>37</i>
3.2.2	<i>Emulsões O/A como carreadoras de compostos ativos</i>	<i>38</i>
3.3	FILMES BIOPOLIMÉRICOS ATIVOS	39
3.3.1	<i>Filmes ativos incorporados com emulsões.....</i>	<i>40</i>
4	MATERIAL E MÉTODOS	45
4.1	MATERIAL.....	45
4.2	CARACTERIZAÇÃO DA PRÓPOLIS VERMELHA BRUTA.....	45
4.2.1	<i>Parâmetros de cor.....</i>	<i>46</i>
4.2.2	<i>Calorimetria diferencial de varredura (DSC).....</i>	<i>46</i>
4.2.3	<i>Difração de raios X (DRX).....</i>	<i>47</i>
4.3	PRODUÇÃO DE EMULSÕES.....	47
4.3.1	<i>Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....</i>	<i>48</i>
4.4	PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL PARA OBTENÇÃO DAS MELHORES CONDIÇÕES DE PRODUÇÃO DA EMULSÃO ENCAPSULANDO A PRÓPOLIS VERMELHA BRUTA	48
4.4.1	<i>Análise de regressão</i>	<i>50</i>
4.5	CARACTERIZAÇÃO DAS EMULSÕES	50
4.5.1	<i>Índice de estabilidade</i>	<i>50</i>
4.5.2	<i>Diâmetro médio de gota e span.....</i>	<i>50</i>
4.6	PRODUÇÃO DAS EMULSÕES COM EMULSIFICANTE CASEINATO DE SÓDIO.....	51
4.7	CARACTERIZAÇÃO DAS MELHORES EMULSÕES	51
4.7.1	<i>Microscopia óptica</i>	<i>51</i>
4.7.2	<i>Parâmetros de cor.....</i>	<i>52</i>
4.7.3	<i>pH.....</i>	<i>52</i>

4.7.4	<i>Reologia</i>	52
4.7.5	<i>Atividade antioxidante</i>	52
4.7.5.1	Compostos fenólicos totais.....	53
4.7.5.2	Método de redução do íon férrico (FRAP).....	53
4.7.5.3	Método ABTS ⁺⁺	53
4.7.6	<i>Atividade antimicrobiana</i>	54
4.8	PRODUÇÃO DOS FILMES ATIVOS.....	54
4.8.1	<i>Preparo da formulação formadora de filme à base de gelatina</i>	54
4.8.2	<i>Preparo da solução formadora de filme à base de isolado proteico de soja</i>	55
4.8.3	<i>Produção dos filmes ativos</i>	55
4.9	CARACTERIZAÇÃO DOS FILMES.....	55
4.9.1	<i>Espessura</i>	55
4.9.2	<i>Umidade</i>	56
4.9.3	<i>Microscopia eletrônica de varredura (MEV)</i>	56
4.9.4	<i>Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)</i>	56
4.9.5	<i>Difração de raios X (DRX)</i>	56
4.9.6	<i>Calorimetria diferencial de varredura (DSC)</i>	57
4.9.7	<i>Ângulo de contato de água</i>	57
4.9.8	<i>Solubilidade em água</i>	57
4.9.9	<i>Permeabilidade ao vapor de água (PVA)</i>	58
4.9.10	<i>Propriedades mecânicas</i>	58
4.9.10.1	Teste de tração uniaxial.....	58
4.9.10.2	Teste de perfuração	59
4.9.11	<i>Propriedades ópticas</i>	59
4.9.11.1	Parâmetros de cor.....	59
4.9.11.2	Opacidade	59
4.9.11.3	Brilho.....	60
4.9.11.4	Propriedades de barreira a luz UV/Visível.....	60
4.9.12	<i>Atividade antioxidante</i>	60
4.9.13	<i>Atividade antimicrobiana</i>	61
4.10	ANÁLISE ESTATÍSTICA	61
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	62
5.1	CARACTERIZAÇÃO DA PRÓPOLIS VERMELHA BRUTA.....	62
5.1.1	<i>Parâmetros de cor</i>	62

5.1.2	<i>Calorimetria diferencial de varredura (DSC)</i>	62
5.1.3	<i>Difração de raios X (DRX)</i>	64
5.2	CARACTERIZAÇÃO DA EMULSÃO PRODUZIDA NOS TESTES PRELIMINARES ..	65
5.3	PRODUÇÃO DE EMULSÕES E PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL.....	67
5.3.1	<i>Índice de estabilidade</i>	69
5.3.2	<i>Diâmetro médio de gota</i>	75
5.3.3	<i>Índice span</i>	80
5.3.4	<i>Parâmetros de produção das melhores emulsões</i>	82
5.4	EMULSÕES PRODUZIDAS COM CASEINATO DE SÓDIO	84
5.4.1	<i>Estabilidade física</i>	85
5.4.2	<i>Diâmetro médio de gota, distribuição de tamanho de gota e span</i>	87
5.5	CARACTERIZAÇÃO DAS EMULSÕES SELECIONADAS.....	88
5.5.1	<i>Estabilidade física</i>	88
5.5.2	<i>Diâmetro médio de gota</i>	90
5.5.3	<i>Parâmetros de cor</i>	92
5.5.4	<i>pH</i>	93
5.5.5	<i>Reologia</i>	94
5.5.6	<i>Atividade antioxidante</i>	96
5.5.7	<i>Atividade antimicrobiana</i>	97
5.6	CARACTERIZAÇÃO DOS FILMES ATIVOS À BASE DE GELATINA.....	98
5.6.1	<i>Espessura</i>	99
5.6.2	<i>Umidade</i>	100
5.6.3	<i>Microscopia eletrônica de varredura (MEV)</i>	100
5.6.4	<i>Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)</i>	102
5.6.5	<i>Difração de raios X (DRX)</i>	103
5.6.6	<i>Calorimetria diferencial de varredura (DSC)</i>	104
5.6.7	<i>Ângulo de contato de água</i>	106
5.6.8	<i>Solubilidade em água</i>	108
5.6.9	<i>Permeabilidade ao vapor de água (PVA)</i>	108
5.6.10	<i>Propriedades mecânicas</i>	109
5.6.10.1	Teste de tração axial.....	109
5.6.10.2	Teste de perfuração	110
5.6.11	<i>Propriedades ópticas</i>	111
5.6.11.1	Parâmetros de cor e opacidade	111

5.6.11.2	Brilho.....	113
5.6.11.3	Propriedades de barreira a luz UV/Visível.....	114
5.6.12	<i>Atividade antioxidante</i>	115
5.6.13	<i>Atividade antimicrobiana</i>	116
5.7	CARACTERIZAÇÃO DOS FILMES À BASE DE ISOLADO PROTEICO DE SOJA	118
5.7.1	<i>Espessura</i>	119
5.7.2	<i>Umidade</i>	120
5.7.3	<i>Microscopia eletrônica de varredura (MEV)</i>	120
5.7.4	<i>Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)</i>	122
5.7.5	<i>Difração de raios X (DRX)</i>	123
5.7.6	<i>Calorimetria diferencial de varredura (DSC)</i>	124
5.7.7	<i>Ângulo de contato de água</i>	126
5.7.8	<i>Solubilidade em água</i>	127
5.7.9	<i>Permeabilidade ao vapor de água (PVA)</i>	128
5.7.10	<i>Propriedades mecânicas</i>	128
5.7.10.1	Teste de tração uniaxial.....	128
5.7.10.2	Testes de perfuração.....	130
5.7.11	<i>Propriedades ópticas</i>	130
5.7.11.1	Parâmetros de cor e opacidade	130
5.7.11.2	Brilho.....	132
5.7.11.3	Propriedades de barreira a luz UV/Visível.....	133
5.7.12	<i>Atividade antioxidante</i>	134
5.7.13	<i>Atividade antimicrobiana</i>	135
6	CONCLUSÕES	137
	Referências	139

1 INTRODUÇÃO

A própolis é produto produzido pelas abelhas a partir de substâncias coletadas de plantas, que é utilizada por elas na construção e reparação de suas colmeias, protegendo-as de fatores externos como vento e chuva e invasores, além de evitar infecções microbianas (Anjum *et al.*, 2019; Burdock, 1998; Wagh, 2013). Na sua forma bruta, a própolis é um composto resinoso, com natureza lipofílica e se apresenta dura e quebradiça (Wagh, 2013). Existem diferentes tipos de própolis, como a verde, a marrom, a vermelha, e a sua variação de cor e composição está relacionada à sua região geográfica de coleta e à sua fonte vegetal (Anjum *et al.*, 2019; Wagh, 2013).

A própolis vermelha é um tipo de própolis descoberta no Estado de Alagoas (Brasil), que apresenta esta coloração devido à sua fonte vegetal, a *Dalbergia ecastophyllum* (L) Taub., planta que produz um exsudato resinoso vermelho (Daugusch *et al.*, 2008). Ela apresenta uma composição bastante complexa, contendo compostos fenólicos, flavonoides, terpenos, entre outros (Rufatto *et al.*, 2017), o que faz com ela apresente várias atividades biológicas, como antioxidante (Chang-Bravo; López-Córdoba; Martino, 2014; Guzmán-Gutiérrez *et al.*, 2018; Oliveira *et al.*, 2020) e antibacteriana (Alencar *et al.*, 2007; Bueno-Silva *et al.*, 2017; Zhang *et al.*, 2022b), entre outras propriedades ativas.

Tais propriedades fazem com que a própolis apresente características desejáveis para atuar como aditivo alimentar natural (Segueni *et al.*, 2023). Além disso, ela se encontra na lista de substâncias geralmente reconhecida como seguras à saúde humana (GRAS) (Burdock, 1998). No entanto, sua aplicação é limitada pelo fato de sua solubilização em solventes orgânicos, como álcool, e seu aroma e sabor acentuados (Nori *et al.*, 2011). Neste sentido, algumas formas de minimizar estes problemas têm sido buscadas como encapsulação em *spray-drying* (Andrade *et al.*, 2018; Jansen-Alves *et al.*, 2019), micropartículas produzidas pelo método de fusão e o método de evaporação do solvente (Elbaz *et al.*, 2016), microencapsulação por coacervação complexa (Nori *et al.*, 2011), microencapsulação em carreadores poliméricos por evaporação de solvente de dupla emulsão (Paulo *et al.*, 2021), e em emulsões O/A (Seibert *et al.*, 2019; Yang *et al.*, 2017).

As emulsões O/A, que são sistemas formados por uma fase oleosa dispersa e uma fase aquosa contínua (McClements, 2004a), têm sido utilizadas como carreadores de compostos ativos lipofílicos em sua fase óleo (Arellano *et al.*, 2021; Aw *et al.*, 2022; Dammak; Sobral, 2018a, 2018b; Hu *et al.*, 2023; Jiang; Charcosset, 2022; Song *et al.*, 2022). Como a própolis,

na sua forma bruta, apresenta característica lipofílica e baixa solubilidade em água (Monteil *et al.*, 2022; Wagh, 2013), ela apresenta potencial para ser carregada na fase óleo de uma emulsão O/A. Alguns estudos têm utilizado emulsões encapsulando extratos etanólicos de diferentes tipos de própolis (El-Guendouz *et al.*, 2018; Gonçalves; Srebernich; Souza, 2011; Ramanauskienė *et al.*, 2009; Seibert *et al.*, 2019; Yang *et al.*, 2017). Entretanto, ainda não foram realizados estudos de desenvolvimento de emulsões encapsulando a própolis vermelha na sua forma bruta.

Uma alternativa de aplicação da própolis em alimentos é seu uso em revestimentos comestíveis (Correa-Pacheco *et al.*, 2019; Cunha *et al.*, 2018; Mariano-Nasser *et al.*, 2020; Martínez-González *et al.*, 2020; Moreno *et al.*, 2020; Omar; Sidique; Ahmad, 2020; Pobiega *et al.*, 2020) ou filmes ativos biopoliméricos (Chang-Bravo; López-Córdoba; Martino, 2014; Correa-Pacheco *et al.*, 2019; Olewnik-Kruszkowska *et al.*, 2022; Reyes; Landgraf; Sobral, 2021).

Os filmes ativos são aqueles nos quais há a incorporação de compostos ativos (Vilela *et al.*, 2018) gerando atividades antioxidante e/ou antimicrobiana (Dammak *et al.*, 2021). Geralmente, as soluções formadoras de filmes biopoliméricas apresentam uma natureza hidrofílica, o que pode dificultar a inserção de compostos ativos lipofílicos (Norcino *et al.*, 2020; Pérez-Córdoba; Sobral, 2017). As emulsões O/A podem atuar como carreadoras de compostos lipofílicos (Aw *et al.*, 2022) e, conseqüentemente, facilitar a dispersão destes compostos em matrizes biopoliméricas (Norcino *et al.*, 2020; Pérez-Córdoba; Sobral, 2017).

Filmes biopoliméricos ativos incorporados de própolis, na forma de extrato etanólico, vêm sendo estudados em diferentes matrizes como quitosana (Correa-Pacheco *et al.*, 2019), poli(ácido láctico) (Olewnik-Kruszkowska *et al.*, 2022), gelatina (Reyes; Landgraf; Sobral, 2021), blendas de carragena e amido de milho (Chang-Bravo; López-Córdoba; Martino, 2014) e amido de mandioca (Costa *et al.*, 2014). No entanto, não foi estudado ainda a incorporação de própolis vermelha bruta em sistemas emulsificados na formação de filmes ativos.

Neste sentido, o uso da própolis vermelha na sua forma bruta é uma forma de driblar o uso de solventes orgânicos e facilitar seu uso em produtos alimentícios. Além disso, utilizá-la na forma de emulsão pode proteger seus compostos ativos e facilitar a sua inserção em uma matriz biopolimérica e formar um filme ativo, com propriedades antioxidantes e antimicrobianas, capaz de retardar a deterioração de alimentos.

Quando incorporadas em um filme, as características das emulsões influenciam nas propriedades da matriz biopolimérica, como o tipo de emulsão, o tamanho de gota e o tipo de

emulsificante (Reis; Gomes; Sobral, 2023). Alguns estudos têm abordado a influência do tipo de emulsificante nas propriedades de filmes biopoliméricos (Dammak; Sobral, 2019; Xu *et al.*, 2021; Zhao *et al.*, 2023). Logo, o tipo de emulsificante utilizado para produzir uma emulsão carregada de própolis vermelha bruta pode influenciar nas propriedades de um filme biopolimérico ativo.

2 OBJETIVOS E HIPÓTESE

2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo geral desta tese é o desenvolvimento de filmes ativos a base de gelatina ou isolado proteico de soja incorporados de própolis vermelha bruta encapsulada em emulsões óleo em água (O/A) empregando diferentes emulsificantes.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Os objetivos específicos desta tese são:

- Obter as melhores condições de produção de emulsões O/A encapsulando própolis vermelha bruta, empregando diferentes emulsificantes;
- Estudar as principais características das melhores emulsões O/A encapsulando própolis vermelha bruta produzidas com diferentes emulsificantes;
- Estudar a influência da incorporação de emulsões O/A encapsulando própolis vermelha bruta nas propriedades físicas e funcionais de filmes à base de gelatina e à base de isolado proteico de soja.
- Estudar a influência dos diferentes emulsificantes nas propriedades dos filmes à base de gelatina e de isolado proteico de soja.

2.3 HIPÓTESE

A hipótese elaborada nesta tese é que a própolis vermelha pode ser aplicada na produção de filmes ativos na sua forma bruta encapsulada em emulsões óleo em água (O/A), isto é, sem que seja necessária a produção de extratos utilizando solventes para incorporação nos filmes, aumentando assim, seu potencial bioativo.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 PRÓPOLIS

Segundo a legislação brasileira, a própolis é um produto oriundo de substâncias resinosas, gomas e balsâmicas, obtidas por abelhas a partir de flores, brotos e exsudatos de plantas, acrescidos de suas salivas, pólen e cera para obtenção do produto final (Brasil, 2001).

As abelhas (*Apis mellifera* L.) coletam secreções de plantas, como gomas e resinas, de diferentes espécies de plantas como pinheiros, palmeiras, choupo, coníferas, sendo posteriormente misturado com as secreções salivares e enzimáticas (Anjum *et al.*, 2019). As abelhas utilizam a própolis na construção e para reparação de suas colmeias, vedando rachaduras e promovendo um alisamento nas paredes internas, além de ter o papel protetor contra o vento e a chuva ou contra invasores como lagartos e cobras (Burdock, 1998; Wagh, 2013) e também protege a colmeia contra infecções microbianas (Anjum *et al.*, 2019).

Na sua forma bruta apresenta uma natureza lipofílica, sendo dura e quebradiça e, com o aumento da temperatura, entre 25 e 45°C vai se tornando flexível e pegajosa (Figura 1) (Wagh, 2013). Sua temperatura de fusão varia entre 60 e 70°C, podendo chegar até a 100°C em alguns tipos de própolis (Martinotti; Ranzato, 2015; Wagh, 2013). Ela apresenta um odor aromático característico e sua coloração varia de amarelo e verde até o vermelho ou marrom escuro, a depender da região geográfica e fonte vegetal (Anjum *et al.*, 2019; Wagh, 2013).

Figura 1 – Própolis vermelha na sua forma bruta.



Fonte: Própria autoria.

A composição da própolis é bastante complexa e depende de sua origem geográfica e botânica, no entanto, dentre seus principais constituintes estão cerca de 45 a 55% de resinas e bálsamos, de 3 a 35% de ceras, de 5 a 10% de óleos essenciais e aromáticos, 5% de ácidos graxos, 5% de pólen e 5% de substâncias minerais (Anjum *et al.*, 2019). A origem geográfica e a época de obtenção interferem na composição e, conseqüentemente, na atividade biológica da própolis, devido às alterações climáticas. Alguns constituintes estão presentes em amostras de locais diferentes e alguns são característicos de locais específicos, devido a flora da região (Wagh, 2013).

Pelo menos 500 compostos já foram identificados na própolis (Franchin *et al.*, 2024). Alguns dos principais grupos químicos encontrados na própolis incluem polifenóis, ácidos benzoicos e seus derivados, ácido cinâmico e seus derivados, hidrocarbonetos como sesquiterpenos e triterpenos, benzaldeídos, cetonas, compostos heteroaromáticos, álcoois terpenos e sesquiterpenos e seus derivados, hidrocarbonetos alifáticos, minerais, esteróis e esteroides, açúcares e aminoácidos, além de pouca quantidade de compostos voláteis (Anjum *et al.*, 2019; Franchin *et al.*, 2024; Wagh, 2013).

Devido à presença de compostos ativos, a própolis pode apresentar várias atividades biológicas como antimicrobiana (Pobiega *et al.*, 2019; Pujirahayu *et al.*, 2015; Rufatto *et al.*, 2018; Zhang *et al.*, 2022b), antioxidante (Cabral *et al.*, 2009; Calegari *et al.*, 2017; Ozdal *et al.*, 2019), anti-biofilme (Bueno-Silva *et al.*, 2013), anti-inflamatória (Cavendish *et al.*, 2015; Ezzat *et al.*, 2019; Ferreira *et al.*, 2021), antitumoral (Carvalho *et al.*, 2011; Oliveira *et al.*, 2014) e citotóxica (Carvalho *et al.*, 2011; Ezzat *et al.*, 2019; Shehata *et al.*, 2020).

A própolis apresenta baixa solubilidade em água (Monteil *et al.*, 2022) e, normalmente, suas aplicações são realizadas na forma de extrato etanólico, porém outros solventes também vêm sendo estudados, como metanol, clorofórmio, diclorometano, éter e acetona, entretanto não são de uso alimentício (Martinotti; Ranzato, 2015; Wagh, 2013). Os extratos etanólicos de própolis têm sido amplamente estudados na área médica, veterinária, farmacêutica e de cosméticos (Anjum *et al.*, 2019; Irigoiti *et al.*, 2021; Wagh, 2013).

3.1.1 *Própolis vermelha*

A própolis vermelha foi descoberta no nordeste brasileiro, no estado de Alagoas, sendo a principal origem botânica a *Dalbergia ecastophyllum* (L) Taub., a qual produz um exsudato resinoso vermelho (Daugusch *et al.*, 2008). Além de ser encontrada no Brasil, a própolis

vermelha também pode ser encontrada em países como México, Cuba, China e Nigéria (Rufatto *et al.*, 2017).

Alencar *et al.* (2007) identificaram novos compostos, como isoflavonas, na própolis vermelha originária do nordeste brasileiro, as quais nunca haviam sido relatados em própolis. Assim, a própolis vermelha foi considerada um novo tipo de própolis brasileira, com compostos marcadores específicos (Cabral *et al.*, 2009; Dausch *et al.*, 2008).

A própolis vermelha apresenta uma composição complexa, sendo relatados mais de 300 compostos diferentes, sendo os mais frequentes compostos fenólicos, flavonoides, terpenos, ácidos aromáticos e ácidos graxos, além de elementos inorgânicos como cobre, manganês, alumínio, cálcio, ferro, vanádio e silício (Rufatto *et al.*, 2017). Alterações na composição da própolis vermelha têm sido relatadas de acordo com época do ano, com aumento de concentração de alguns compostos fenólicos durante épocas mais chuvosas e diminuição em épocas mais secas (Aldana-Mejía *et al.*, 2021; Bueno-Silva *et al.*, 2017; Nascimento *et al.*, 2019; Regueira Neto *et al.*, 2017). De acordo com a região de coleta da planta, sua composição também é alterada, sendo encontrada diferenças entre estados brasileiros, e presença de componentes de outras plantas resinosas diferentes da *D. ecastophyllum*, em própolis vermelhas obtidas em Cuba (López *et al.*, 2014).

Muitas pesquisas têm identificado uma grande variedade de flavonoides, isoflavonoides, terpenos, pterocarpanas, gutiferonas nas própolis vermelhas, e várias destas substâncias não estão disponíveis comercialmente, como a retusapurpurina A e B, vestitol, neovestiol, xantochimol e chalconas (Nascimento *et al.*, 2019). Os flavonoides de variadas classes são o principal grupo presente na própolis vermelha, chegando a representar mais de 60% de seus compostos ativos (Regueira Neto *et al.*, 2017). A sua coloração vermelha se deve à presença da retusapurpurina A e B (Piccinelli *et al.*, 2011; Rufatto *et al.*, 2018). Os principais componentes identificados e isolados da própolis vermelha são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 – Principais componentes encontrados na própolis vermelha.

Origem	Principais componentes	Referência
Alagoas – Brasil	Metil o-orselinato, metil abietato, 2,4,6-trimetilfenol, homopterocarpina, medicarpina, 4',7-dimetoxi-2'-isoflavonol e 7,4'- dihidroxi-isoflavona, metileugenol, ácido benzóico	Alencar <i>et al.</i> (2007)
Alagoas – Brasil	Biochanina A, pinocembrina, isoliquiritigenina, luteolina, quercetina, rutina	Daugusch <i>et al.</i> (2008)
Alagoas - Brasil	vestitol, neovestitol, isoliquiritigenina	Oldoni <i>et al.</i> (2011)
Alagoas - Brasil	Narigenin-8-C-hexosídeo, 3,4,2',3'-tetrahidroxichalcona, isoliquiritigenina, (3S)-vestitol, (3S)-7-O-methylvestitol, medicarpina, trans-anetol, methyl eugenol, elimicina, metoxieugenol, cis-asarone, lupeol, α - e β - amirinas	Righi <i>et al.</i> (2011)
China	Apigenina, benzil cafeato, ácido caféico, crisina, ácido cinâmico, ácido ferúlico, galangina, pinobanksina, pinocembrina, pinostrobina, tectocrisina	Hatano <i>et al.</i> (2012)
Sergipe – Brasil	Liquiritigenina, formononetina, medicarpina, biochanina A, retusapurpurina B, hesperetina 7-rhamnoglucosídeo	Frezza <i>et al.</i> (2013)
Nigéria	Calicosina, liquiritigenina, pinocembrina, vestitol, medicarpina, 8-prenilnaringenina, 6-prenilnaringenina, propolina D, macarangina	Omar <i>et al.</i> (2016)
México	Pinostrobina, pinocembrina, izalpinina, kaemferol, ramnetina, chalcona epoxipinocembrina, dimetilalil cafeato, isopent-3-enil cafeato, ácido cinâmico, ácido 3,4-dimetoxiciâmico, ácido caféico,	Guzmán-Gutiérrez <i>et al.</i> (2018)

Continua...

Conclusão.

Tabela 1 – Principais componentes encontrados na própolis vermelha.

Origem	Principais componentes	Referência
Alagoas - Brasil	Vestitol, medicarpina, elemicina, guaiacol, liquiritigenina, formononetina, biochanina A	Rufatto <i>et al.</i> (2018)
Nordeste - Brasil	Propolonas, propolononas, propolol	Banzato <i>et al.</i> (2020)
Bahia - Brasil	Liquiritigenina,, alicosina, isoliquiritigenina, formononetina, vestitol, neovestitol, medicarpina, biochanina A, 7-O-methylvestitol.	Aldana-Mejía <i>et al.</i> (2021)

Fonte: Própria autoria.

Devido a sua rica composição, a própolis vermelha também apresenta várias atividades biológicas (Tabela 2), incluindo antioxidante (Chang-Bravo; López-Córdoba; Martino, 2014; Guzmán-Gutiérrez *et al.*, 2018; Oliveira *et al.*, 2020), antibacteriana (Alencar *et al.*, 2007; Bueno-Silva *et al.*, 2017; Zhang *et al.*, 2022b), anti-inflamatória (Cavendish *et al.*, 2015), citotóxica (Frezza *et al.*, 2013).

Tabela 2 – Propriedades ativas da própolis vermelha.

Propriedade ativa	Região geográfica	Referência	
Antibacteriana	Alagoas – Brasil	Alencar <i>et al.</i> (2007)	
		Cabral <i>et al.</i> (2009)	
		Oldoni <i>et al.</i> (2011)	
		Bispo Júnior <i>et al.</i> (2012)	
		Bueno-Silva <i>et al.</i> (2017)	
		Rufatto <i>et al.</i> (2018)	
		Oliveira <i>et al.</i> (2020)	
		Cuba	Lopez <i>et al.</i> (2015)
		Sergipe e Paraíba – Brasil	Lopez <i>et al.</i> (2015)
Antifúngica	China	Zhang <i>et al.</i> (2022b)	
	Pernambuco - Brasil	Regueira Neto <i>et al.</i> (2017)	
	Alagoas – Brasil	Bispo Júnior <i>et al.</i> (2012)	
	Alagoas - Brasil	Alencar <i>et al.</i> (2007)	

Continua...

Conclusão.

Tabela 2 – Propriedades ativas da própolis vermelha.

Propriedade ativa	Região geográfica	Referência
Antioxidante	Alagoas - Brasil	Cabral <i>et al.</i> (2009) Oldoni <i>et al.</i> (2011) Oliveira <i>et al.</i> (2020)
	Chiapas e Yucatán – México	Guzmán-Gutiérrez <i>et al.</i> (2018)
	Cuba	Chang-Bravo, López-Córdoba e Martino (2014)
	China	Hatano <i>et al.</i> (2012)
	Sergipe – Brasil	Frozza <i>et al.</i> (2013)
Anti-inflamatória	Alagoas – Brasil	Cavendish <i>et al.</i> (2015) Bueno-Silva <i>et al.</i> (2016) Franchin <i>et al.</i> (2016)
	Chiapas e Yucatán – México	Guzmán-Gutiérrez <i>et al.</i> (2018)
Citotoxicidade	Alagoas – Brasil	Alencar <i>et al.</i> (2007)
	Sergipe - Brasil	Frozza <i>et al.</i> (2013)
Anti-biofilme	Alagoas - Brasil	Bueno-Silva <i>et al.</i> (2013)
Anti-parasitária	Rivers State – Nigéria	Omar <i>et al.</i> (2016)

Fonte: Própria autoria.

O extrato de própolis vermelha se mostrou efetivo em testes *in vitro* contra a bactéria *Staphylococcus aureus* (Zhang *et al.*, 2022b), com uma concentração inibitória mínima (CIM) de 128 µg/mL para bactéria *Escherichia coli*, 512 µg/mL para *Pseudomonas aeruginosa* e 64 µg/mL para *S. aureus* (Regueira Neto *et al.*, 2017). A CIM de extrato de própolis vermelha foi menor para bactérias Gram-negativas do que para bactérias Gram-positivas, porém houve uma variação de acordo com a origem da própolis e da bactéria (Lopez *et al.*, 2015). Em teste de difusão, o extrato etanólico de própolis vermelha apresentou halo de inibição contra *S. aureus* (Oliveira *et al.*, 2020). Outros estudos também têm relatado efeitos contra a bactéria Gram-positiva *S. aureus* (Bispo Júnior *et al.*, 2012; Cabral *et al.*, 2009; Oldoni *et al.*, 2011; Rufatto *et al.*, 2018).

A atividade antioxidante do extrato de própolis vermelha tem sido evidenciada em estudos demonstrando um alto potencial de atividade sequestradora do radical livre DPPH (Alencar *et al.*, 2007; Cabral *et al.*, 2009; Frozza *et al.*, 2013; Hatano *et al.*, 2012; Oliveira *et*

al., 2020; Reyes; Landgraf; Sobral, 2021), do radical livre ABTS⁺ (Hatano *et al.*, 2012; Reyes; Landgraf; Sobral, 2021), pelo método FRAP e ORAC (Hatano *et al.*, 2012) e capacidade de oxidação do ácido linoleico (Cabral *et al.*, 2009; Oldoni *et al.*, 2011; Righi *et al.*, 2011). A atividade antioxidante da própolis vermelha está relacionada a sua alta concentração de flavonoides, isoflavonoides e chalconas (Righi *et al.*, 2011; Rufatto *et al.*, 2017).

3.2 EMULSÕES

Emulsões são sistemas coloidais que consistem em duas ou mais fases que são parcialmente ou completamente imiscíveis, sendo composta por um líquido disperso na forma de gotículas (fase dispersa) em outro líquido (fase contínua) (McClements, 2004a). O sistema formado pode ser uma emulsão na forma óleo em água (O/A), quando a fase dispersa é o óleo e a fase contínua é a água, ou na forma água em óleo (A/O), quando a fase dispersa é a água e a contínua é o óleo (McClements, 2004a). Sistemas mais complexos podem ser formados a partir das emulsões simples, como as emulsões duplas água-em-óleo-em-água, produzidas a partir de dispersão de uma emulsão A/O (Chevalier; Gomes; Cunha, 2021; Tessaro; Martelli-Tosi; Sobral, 2022) em uma fase água externa (Tessaro *et al.*, 2022).

As emulsões são sistemas termodinamicamente instáveis e apresentam tendência a separação de fases, já que a energia livre do sistema das fases separadas é menor do que do sistema emulsificado (McClements, 2021). No entanto, uma estabilidade física pode ser atingida pela adição de estabilizantes, como emulsificantes (surfactantes, proteínas ou carboidratos) ou partículas sólidas (Dammak *et al.*, 2020; Dammak; Sobral, 2021). Tais componentes melhoram a estabilidade dos sistemas retardando ou prevenindo mecanismos de desestabilização como sedimentação, cremação, floculação, coalescência e envelhecimento de Ostwald (McClements; Decker; Weiss, 2007).

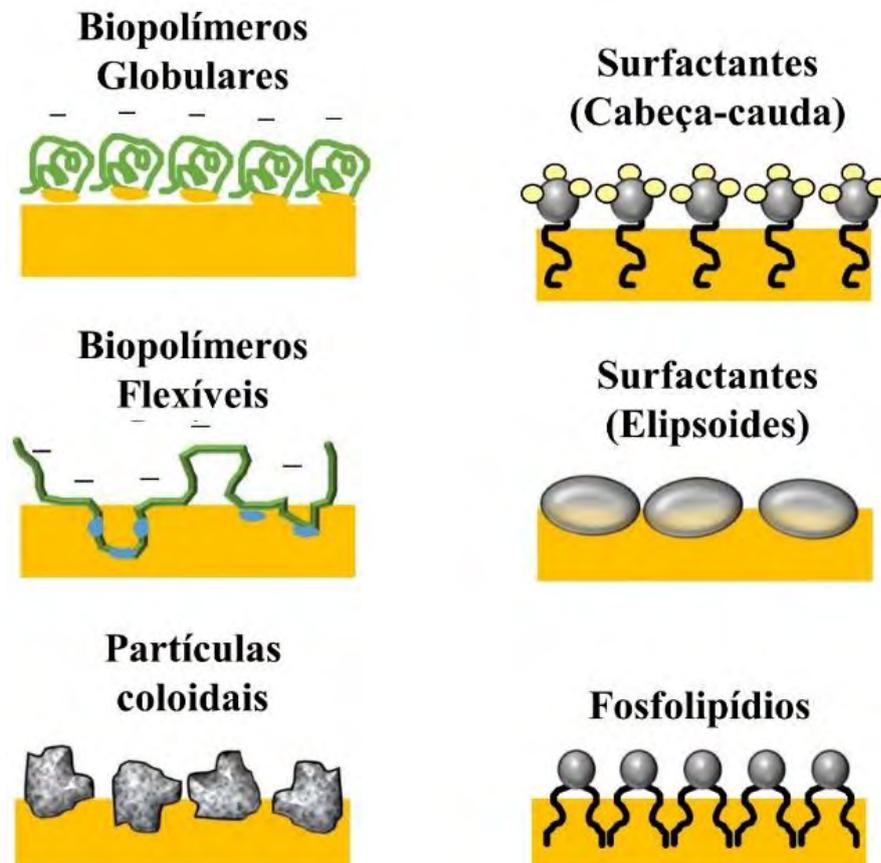
As emulsões podem ainda ser classificadas de acordo com o tamanho de gota, sendo consideradas nanoemulsões aquelas com tamanho de gota menor que 200 nm (Artiga-Artigas *et al.*, 2018; McClements; Rao, 2011; Otoni *et al.*, 2016). As dispersões com tamanho de gota maiores que 200 nm são chamadas simplesmente de emulsões (McClements, 2021; McClements; Decker; Weiss, 2007). As emulsões Pickering são aquelas estabilizadas por partículas sólidas e apresentam maior estabilidade quando comparadas com as emulsões tradicionais (Zhai *et al.*, 2018).

As emulsões podem ser aplicadas em produtos alimentícios, farmacêuticos, suplementos, cosméticos e agroquímicos (McClements; Bai; Chung, 2017; McClements; Jafari, 2018).

3.2.1 Emulsificantes

Emulsificantes são moléculas anfífilas, ou seja, que apresentam grupos hidrofílicos e hidrofóbicos na mesma molécula (McClements; Jafari, 2018). Os emulsificantes desempenham papel importante tanto na formação quanto na estabilidade da emulsão (McClements; Bai; Chung, 2017). Das principais características de um emulsificante pode-se destacar a habilidade de adsorção à superfície das gotas da fase dispersa durante a homogeneização, redução da tensão interfacial e formação de uma camada protetora ao redor das gotas gerando forças repulsivas, como repulsões eletrostáticas e estéricas, prevenindo a agregação (McClements, 2004a). Um esquema de como agem os diferentes tipos de emulsificantes na interface óleo-água é apresentado na Figura 2.

Figura 2 – Exemplos de ação de emulsificantes utilizados na produção de emulsões.



Fonte: Adaptado de McClements e Jafari (2018).

Na indústria alimentícia, os emulsificantes mais utilizados são os de origem sintética, como os ésteres de sorbitano, etoxilados de ácido graxo e ésteres de sacarose (Kralova; Sjöblom, 2009). No entanto, com a crescente preocupação com uma alimentação saudável e sustentabilidade ambiental, tem aumentado a demanda pelo uso de ingredientes naturais (Dammak *et al.*, 2020; McClements; Bai; Chung, 2017). Assim, há uma busca por pela substituição completa ou parcial por emulsificantes naturais, que são aqueles de origem biológica e de fontes renováveis (Dammak *et al.*, 2020; McClements; Bai; Chung, 2017). Dentre os emulsificantes naturais, pode-se destacar os fosfolipídios, moléculas surfactantes pequenas, polissacarídeos, proteínas e outros polímeros com atividade interfacial (Kralova; Sjöblom, 2009; McClements; Jafari, 2018).

As moléculas surfactantes pequenas incluem as sintéticas, como os Tweens e naturais, como as saponinas e a lecitina (Kralova; Sjöblom, 2009; McClements; Jafari, 2018). As proteínas apresentam grupos funcionais polares e apolares nos resíduos de seus aminoácidos, podendo assim, atuar como tensoativos. Destacam-se as proteínas do soro de leite, caseínas, de soja, de ovo, gelatina, dentre outras (Lam; Nickerson, 2013). Alguns polissacarídeos, naturais ou modificados, apresentam grupos hidrofóbicos ligados às suas cadeias hidrofílicas, fazendo destes uma molécula anfifílica, como a goma arábica, celulose modificada, amido modificado, dentre outros (Dickinson, 2003; McClements; Bai; Chung, 2017).

3.2.2 *Emulsões O/A como carreadoras de compostos ativos*

Os sistemas emulsionados podem ser utilizados para encapsular compostos ativos como forma de prevenir a sua degradação, preservar a propriedade ativa e melhorar a performance destes compostos protegendo-os contra ação de moléculas pró-oxidantes e condições ambientais (Aw *et al.*, 2022; Gomes *et al.*, 2021a). Além disso, estes sistemas podem facilitar a incorporação de compostos ativos em produtos alimentícios mascarando odores e sabores indesejados (Cerqueira *et al.*, 2013; Garti; McClements, 2012) e promovendo uma liberação controlada dos compostos ativos (Jiménez-Saelices *et al.*, 2020; Tonyali *et al.*, 2020).

As emulsões do tipo O/A podem ser utilizadas para encapsular vários compostos ativos hidrofóbicos como hesperidina (Dammak; Sobral, 2018a, 2018b), curcumina (Aw *et al.*, 2022; Jiang; Charcosset, 2022), resveratrol (Ren *et al.*, 2023), β -caroteno (Mozafarpour; Koocheki, 2023), óleo de pimenta (Galvão; Vicente; Sobral, 2018) e vários óleos essenciais como de orégano, de canela, de capim-limão, de cravo (Arellano *et al.*, 2021; Hu *et al.*, 2023; Song *et*

al., 2022), entre outros. A encapsulação de compostos ativos hidrofóbicos em emulsões do tipo O/A pode auxiliar na incorporação destes compostos em matrizes hidrofílicas, como soluções formadoras de filmes biopoliméricas (Norcino *et al.*, 2020; Pérez-Córdoba; Sobral, 2017).

Entre os compostos ativos que podem ser encapsulados em emulsões O/A podem-se citar a própolis, que é conhecida por apresentar uma baixa solubilidade em água (Monteil *et al.*, 2022). Emulsões têm sido utilizadas para encapsular extratos etanólicos de própolis de diferentes tipos (El-Guendouz *et al.*, 2018; Gonçalves; Srebernich; Souza, 2011; Ramanauskiene *et al.*, 2009; Seibert *et al.*, 2019; Yang *et al.*, 2017).

Ramanauskiene *et al.* (2009) produziram um sistema de emulsão semissólida (O/A) carreadora de própolis na forma de óleo, de extrato semissólido e extrato etanólico, para emprego como hidratante de pele com propriedades antimicrobianas. Gonçalves, Srebernich e Souza (2011) avaliaram a produção de emulsões O/A contendo extrato etanólico de própolis verde com o objetivo de produzir produtos para cuidados com a pele. Yang *et al.* (2017) promoveram a extração da própolis com etanol e, posteriormente, realizaram a remoção do etanol para aplicar a própolis em emulsão para preservação da qualidade de suco de laranja. Esses autores concluíram que a própolis apresenta grande potencial para uso como aditivo em sucos como alternativa a aditivos sintéticos.

El-Guendouz *et al.* (2018) estudaram o efeito da adição de extrato etanólico de própolis, originária do Marrocos, em emulsões O/A como forma de prevenir a peroxidação lipídica do óleo de germe de trigo e de amêndoas empregados como forma fase lipídica da emulsão. Seibert *et al.* (2019) produziram uma nanoemulsão carreadora de extrato de própolis para aplicação como aditivo alimentar. Santos *et al.* (2020) produziram uma emulsão semissólida como sistema de liberação para extrato de própolis e extrato de subprodutos da própolis verde.

3.3 FILMES BIOPOLIMÉRICOS ATIVOS

Embalagens ativas são sistemas que apresentam componentes incorporados que podem ser liberados ou absorver substâncias internamente ou externamente a embalagem, melhorando a vida útil do alimento (Dainelli *et al.*, 2008). Como exemplos têm-se absorção de dióxido de carbono, oxigênio, etileno e umidade, liberação controlada de agentes antioxidantes e antimicrobianos, entre outros (Vilela *et al.*, 2018).

Embalagens ativas flexíveis podem ser produzidas com filmes ativos, os quais são baseados na incorporação de agentes ativos na matriz filmogênica (Vilela *et al.*, 2018). Filmes

ativos produzidos a partir de biopolímeros apresentam, além das propriedades funcionais, uma alternativa para o uso materiais sintéticos derivados de fontes não renováveis, sendo biodegradáveis e obtidos de fontes renováveis (Hassan *et al.*, 2018; Mohamed; El-Sakhawy; El-Sakhawy, 2020). Os biopolímeros mais comuns utilizados para produzir filmes ativos são as proteínas, como gelatina, proteína da soja, zeína, e os polissacarídeos, como amido, quitosana, pectina, entre outros (Dammak *et al.*, 2021).

Vários tipos de compostos ativos vêm sendo empregados na produção de filmes ativos (Ganiari; Choulitoudi; Oreopoulou, 2017), como exemplos temos óleos essenciais (Talebi *et al.*, 2018; Wang *et al.*, 2020), extratos de plantas (Bigi *et al.*, 2021; Liu *et al.*, 2021b) ou de subprodutos agroindustriais (Ribeiro *et al.*, 2021; Vidal *et al.*, 2022), entre outros.

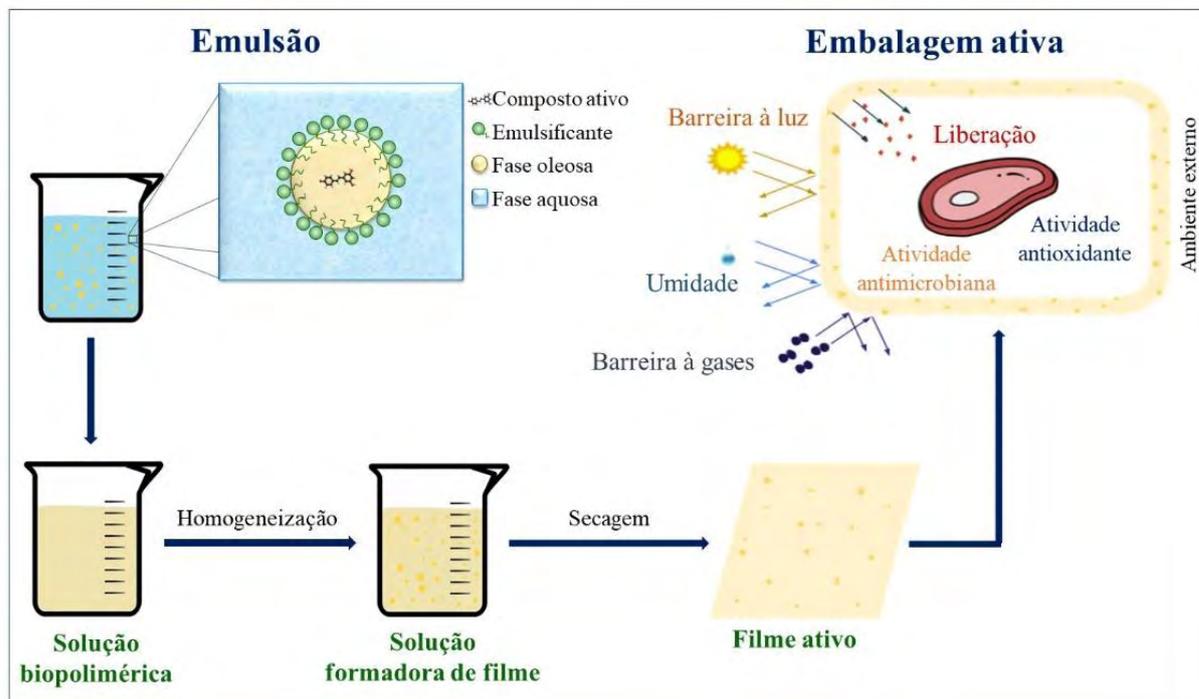
3.3.1 Filmes ativos incorporados com emulsões

As emulsões podem atuar como carreadoras de compostos ativos (Aw *et al.*, 2022) e, conseqüentemente, pode facilitar a incorporação de compostos lipofílicos, encapsulados na fase óleo de emulsões O/A, por exemplo, em matrizes biopoliméricas hidrofílicas, que é o caso da maioria dos filmes ativos (Norcino *et al.*, 2020; Pérez-Córdoba; Sobral, 2017).

Para a produção da solução formadora de filme, inicialmente, produz-se a emulsão com o composto ativo adicionado na fase óleo. Posteriormente, a emulsão é adicionada na solução formadora de filme e homogeneizada cuidadosamente (Figura 3) (Reis; Gomes; Sobral, 2023). Em escala laboratorial, os filmes ativos são comumente produzidos pelo método *casting*, o qual consiste em adicionar a solução formadora de filme em um suporte que é submetido à secagem (Debeaufort; Quezada-Gallo; Voilley, 1998).

Os principais estudos sobre filmes ativos carregados de emulsões estão descritos na Tabela 3.

Figura 3 – Esquema de produção e aplicação de filmes ativos biopoliméricos incorporados de emulsões encapsulando compostos ativos.



Fonte: Adaptada de Reis, Gomes e Sobral (2023).

Tabela 3 – Estudos sobre filmes ativos à base de biopolímeros incorporados de sistemas emulsificados encapsulando compostos ativos.

Biopolímeros	Tipo de emulsão	Composto ativo	Referência
Quitosana	Pickering	Óleo essencial (OE) de canela	Liu <i>et al.</i> (2022)
	Emulsão dupla	Nisina	Yuan <i>et al.</i> (2022)
	Pickering	OE de canela e perilla	Zhao <i>et al.</i> (2022)
	Emulsão dupla	Extrato de folha de pitangueira	Tessaro <i>et al.</i> (2021)
	Pickering	OE de cravo	Hua <i>et al.</i> (2021)
	Nanoemulsão	OE de canela	Xu <i>et al.</i> (2021)
	Nanoemulsão	OE cominho	Dini <i>et al.</i> (2020)
	Pickering	OE de cravo	Xu <i>et al.</i> (2020b)
	Emulsão	OE de canela	Xu <i>et al.</i> (2020a)
Microemulsão	Óleo de casca de canela	Ma <i>et al.</i> (2016)	

Continua...

Continuação...

Tabela 3 – Estudos sobre filmes ativos à base de biopolímeros incorporados de sistemas emulsificados encapsulando compostos ativos.

Biopolímeros	Tipo de emulsão	Composto ativo	Referência
Gelatina	Nanoemulsão	OE de lavanda	Sun <i>et al.</i> (2021)
	Emulsão dupla	Extrato de folha de pitangueira	Tessaro <i>et al.</i> (2021)
	Nanoemulsão	Cinamaldeído	Ji <i>et al.</i> (2021)
	Pickering	Hesperidina	Dammak, Lourenço e Sobral (2019)
	Nanoemulsão	Eugenol	Dammak e Sobral (2019)
	Nanoemulsão	α -tocoferol, OE de alho e cinamaldeído	Pérez-Córdoba e Sobral (2017)
	Nanoemulsão	Rutina	Dammak <i>et al.</i> (2017a)
	Nanoemulsão	OE de gengibre	Alexandre <i>et al.</i> (2016)
Amido	Nanoemulsão	Curcumina	Sanchez, Pinzon e Villa (2022)
	Pickering	Ho wood, cardamomo e OE de canela	Souza <i>et al.</i> (2021)
	Emulsão	OE de capim-limão	Mendes <i>et al.</i> (2020)
	Micro e nanoemulsão	Cera de carnaúba	Oliveira Filho <i>et al.</i> (2020)
Proteína de soro de leite	Pickering	Cinnamon EO	Sun <i>et al.</i> (2020)
	Nanoemulsão	Óleo de bergamota	Sogut (2020)
	Nanoemulsão	α -tocoferol	Agudelo-Cuartas <i>et al.</i> (2020)
	Nanoemulsão	OE de <i>Grammosciadium pirocarpum</i> Bioss.	Ghadetaj, Almasi e Mehryar (2018)

Continua...

Conclusão.

Tabela 3 – Estudos sobre filmes ativos à base de biopolímeros incorporados de sistemas emulsificados encapsulando compostos ativos.

Biopolímeros	Tipo de emulsão	Composto ativo	Referência
Pectina	Emulsão	OE de cravo	Jahromi, Niakousari e Golmakani (2022)
	Nanoemulsão e Pickering	OE de manjerona	Almasi, Azizi e Amjadi (2020)
	Nanoemulão	Óleo de copaíba	Norcino <i>et al.</i> (2020)
	Pickering	Cinamaldeído	Zhang <i>et al.</i> (2022a)
Caseinato de sódio	Nanoemulsão	OE de canela	Ranjbaryan, Pourfathi e Almasi (2019)
Alginato de sódio	Emulsão	OE de canela	Chen <i>et al.</i> (2017)
Isolado proteico de soja	Micro e nanoemulsão	Carvacrol e cinamaldeído	Otoni <i>et al.</i> (2016)
Carboximetilcelulose (CMC)	Emulsão	OE de alcaçuz	Fattahi e Seyedain-Ardabili (2021)
Metilcelulose (MC)	Nanoemulsão	OE de cravo e orégano	Otoni <i>et al.</i> (2014)
Nanofibrilas de celulose	Pickering	OE de orégano	Wu <i>et al.</i> (2021)
Pululana	Nanoemulsão	OE de canela	Feng <i>et al.</i> (2020)
	Emulsão	Cinamaldeído timol e eugenol	Tonyali <i>et al.</i> (2020)
Goma de semente de manjericão	Nanoemulsão	OE de <i>Zataria multiflora</i>	Gahruie <i>et al.</i> (2017)

Fonte: Adaptada de Reis, Gomes e Sobral (2023).

Além de proteger os compostos encapsulados, as emulsões podem promover uma liberação controlada desse componente (Kaci *et al.*, 2018; Mehmood *et al.*, 2019; Shah; Xu; Mráz, 2021; Shi *et al.*, 2022). Barreiros *et al.* (2022) prepararam formulações formadoras de filme (FFF) à base de goma xantana incorporadas com óleos essenciais de cravo, canela e orégano emulsionados ou não, e observaram que a atividade antimicrobiana da FFF contendo os compostos ativos na forma livre apresentaram maior atividade antimicrobiana *in vitro* do

que aquela contendo nanoemulsão. Tal fato pode ser explicado devido a ação protetora do crodamol e do surfactante que atuaram como barreira para os óleos essenciais, promovendo uma liberação controlada (Barreiros *et al.*, 2022).

Filmes à base de isolado proteico de soro de leite contendo óleo de bergamota encapsulados em nanoemulsões apresentaram melhores propriedades mecânicas, menor permeabilidade ao vapor de água, maior barreira à luz UV-Vis e maior opacidade do que filmes contendo o óleo na sua forma livre. Além disso, a presença da nanoemulsão retardou a liberação do composto ativo em fluido simulante de alimento (Sogut, 2020). A adição de solução de curcumina livre produziram filmes de blenda de amido de milho e poli(vinil álcool) com uma menor atividade antioxidante e antimicrobiana do que os filmes adicionados de curcumina carregadas em solução Pickering. A curcumina livre pode ter passado por uma maior degradação e oxidação durante o processo de produção da FFF, enquanto que a emulsão Pickering atuou protegendo o composto ativo. Além, disso, a emulsão evitou a perda da atividade antioxidante do filme ao longo do tempo (Liu *et al.*, 2021a).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAL

A própolis vermelha bruta foi cedida pela empresa Essenciale (Lagoa Santa, MG, Brasil). O óleo de soja foi comprado da empresa Cargill (Paraná, Brasil). O caseinato de sódio foi cedido pela empresa Alibra (Campinas, Brasil), a gelatina bovina tipo B foi doada pela empresa Gelco (São Paulo, Brasil) e o isolado proteico de soja (>90%) foi comprado da empresa Bremil (Rio Grande do Sul, Brasil).

O emulsificante Grindsted® PGPR (poliricinoleato de poliglicerol) foi doado pela DuPont (SP, Brasil). O Tween 80 (monooleato de polioxietileno sorbitano 80) e a saponina de Quillaja, bem como os reagentes ácido gálico, Trolox (ácido 6-hidróxi-2,5,7,8-tetrametilcromo-2-carboxílico), ABTS⁺⁺ (2,2'-azino-bis(3-etilbenzoatiazolin)-6-ácido sulfônico), TPTZ (2,4,6-Tri-(2-piridil)-1,3,5-Triazina), catequina, quercetina e o reagente Folin-Ciocalteu foram adquiridos da empresa Sigma Aldrich (Saint Louis, MO, EUA).

Os reagentes carbonato de sódio e persulfato de potássio foram comprados da Merck (São Paulo, Brasil). O álcool etílico, o hidróxido de sódio e o glicerol foram comprados da empresa Synth (São Paulo, Brasil). O cloreto de alumínio da marca Dinâmica e o nitrito de sódio da marca Êxodo Científica. O caldo *Brain Heart Infusion* (BHI) foi comprado da empresa Acumedia® (São Paulo, Brasil) e o ágar *Mueller Hinton* comprado da empresa Difco™ (São Paulo, Brasil).

4.2 CARACTERIZAÇÃO DA PRÓPOLIS VERMELHA BRUTA

Inicialmente, a própolis vermelha bruta foi triturada em um liquidificador industrial (LS-04MB-N, Skysmen, Brusque, Brasil), obtendo-se assim, um produto em pó (Figura 4), que foi armazenado em sacos plásticos cobertos por papel alumínio, mantidos congelados (-22°C) na ausência de luz.

Figura 4 – Própolis vermelha bruta em corte transversal (a) e após trituração (b).



Fonte: Própria autoria.

4.2.1 Parâmetros de cor

A cor da própolis vermelha bruta (PVB) e triturada (PVBT) foi medida segundo a escala CIELab com um colorímetro (MiniScan MSEZ 1049, HunterLab, Reston-VA, EUA), empregando o iluminante D₆₅ e um ângulo de observação de 10°. No caso do produto triturado, um porta amostras de quartzo foi utilizado. O equipamento forneceu os valores de L* [Luminosidade, 0 a 100], a* [verde (-) ao vermelho (+)] e b* [azul (-) ao amarelo (+)] que foram utilizados para o cálculo do ângulo Hue [H*, tonalidade que varia de vermelho (0°), amarelo (90°), verde (180°) a azul (270°)] e do Cromo [C*, saturação, mais saturada (+) e menos saturada (-)], empregando-se as equações 1 e 2 (Pateiro *et al.*, 2014).

$$H^* = \arctan\left(\frac{b^*}{a^*}\right) \quad (1)$$

$$C^* = \sqrt{(a^*)^2 + (b^*)^2} \quad (2)$$

4.2.2 Calorimetria diferencial de varredura (DSC)

A própolis bruta triturada (PVBT) foi submetida a análise térmica usando-se um calorímetro diferencial de varredura (DSC TA 2010, TA Instruments, New Castle-DE, EUA) controlado por um sistema TA5000 (TA Instrument, New Castle-DE, EUA) e equipado com acessório de resfriamento de têmpera criogênica. A varredura foi realizada em duas corridas de -50°C a 100°C a uma taxa de 5°C/min. A temperatura de fusão foi calculada como a temperatura do pico da endoterma e o entalpia de fusão foi calculada conhecendo-se a área daquele pico.

4.2.3 Difração de raios X (DRX)

A análise de DRX foi realizada em um difratômetro de raios-X (AXS Analytical X-Ray D 5005, Siemens, Munique, Alemanha) utilizando o cobre como fonte. As medidas foram realizadas a uma voltagem de 40 kV e corrente de 15 mA, sendo uma varredura de 1° a 50° a uma taxa de 1°/min. Foram realizadas análises da PVBT *in natura* e da PVBT após ser fundida a 60°C por 5 min e resfriada a temperatura ambiente, a fim de se observar se houve alteração e/ou formação de polimorfos.

4.3 PRODUÇÃO DE EMULSÕES

Testes preliminares foram realizados para que se chegasse a um método de produção adequado para emulsão. A partir dos dados obtidos na análise de DSC da PVBT, mostrando uma temperatura de fusão de, aproximadamente, 60°C, fixou-se a temperatura de produção da emulsão. O tempo e agitação da fase óleo também foram obtidos por testes prévios (dados não apresentados).

Para fixar a concentração de PVBT na emulsão, visando o máximo de concentração possível de composto ativo, uma emulsão primária foi produzida de acordo com a metodologia descrita a seguir. Foi fixado uma proporção de 10:90 de fases óleo: água. A fase óleo, composta pela própolis vermelha bruta e óleo de soja, foi aquecida até atingir 60°C, sendo mantida sob agitação magnética leve por 5 min. A fase água, composta por Tween 80 (1% m/m da emulsão) em água, foi aquecida (60°C) separadamente. A fase água foi adicionada a fase óleo e mantidas por 1 min sob agitação magnética. A mistura foi homogeneizada em homogeneizador rotor-estator (Ultraturrax® IKA T25, Labotechnik, Staufen, Alemanha), com uma velocidade de 15000 rpm por 5 min. As concentrações de própolis vermelha bruta testadas foram 1, 2 e 3% m/m da emulsão.

As emulsões primárias foram analisadas para conhecimento da estabilidade conforme metodologia descrita em 4.5.1.

Durante a produção da emulsão, foi possível observar a sedimentação de partículas provenientes da própolis vermelha bruta. Tais partículas foram observadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV), de acordo com metodologia descrita na seção 4.3.1. Foram realizadas várias tentativas para a eliminação de tais partículas, como filtração, peneiramento e decantação. A filtração e peneiramento, chegaram a provocar uma maior desestabilização das

emulsões. Assim, optou-se também pelo emprego do PGPR como emulsificante para gerar uma maior homogeneidade na fase óleo e pelo processo de decantação para eliminação de tais partículas.

Finalmente, as emulsões foram preparadas da seguinte maneira: a fase óleo (10%), composta por PVBT (3% m/m da emulsão), emulsificante PGPR (concentração de acordo com planejamento experimental) e óleo de soja, foi aquecida a 60°C e mantida sob agitação magnética por 5 minutos. A fase água (90%) contendo emulsificante (Tween 80, saponina ou caseinato de sódio) com concentração variável de acordo com o planejamento experimental, também foi previamente aquecida à 60°C e adicionada à fase óleo, mantendo sob agitação magnética por 1 min. A emulsão primária foi formada após homogeneização em homogeneizador rotor-estator (Ultraturrax® IKA T25, Labotechnik, Staufen, Alemanha) à 15000 rpm por 2 min. Posteriormente, a emulsão foi mantida em repouso até atingir a temperatura de 30°C ± 1°C. Foram retiradas alíquotas de 30 g da emulsão após a decantação das partículas. A emulsão foi levada ao ultrassom de ponteira (Sonifier® SFX550, Branson Ultrasonics, EUA) operando a 20 kV, com amplitude de 20%, massa de emulsão de 30 g, altura de contato da ponta com a emulsão de 1 cm, em ciclos de 30 s (30 s on/30 s off), sendo o número de ciclos variável de acordo com planejamento experimental.

4.3.1 *Microscopia eletrônica de varredura (MEV)*

A fim de se observar as partículas formadas durante a produção das emulsões, as partículas sedimentadas foram separadas por filtração da emulsão e caracterizada por MEV. Para isso foi utilizado um microscópio eletrônico de varredura (TM3000, Hitachi Ltd, Tóquio, Japão) operando a 15 kV.

4.4 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL PARA OBTENÇÃO DAS MELHORES CONDIÇÕES DE PRODUÇÃO DA EMULSÃO ENCAPSULANDO A PRÓPOLIS VERMELHA BRUTA

O planejamento experimental aplicado foi o Box-Behnken, contendo 17 ensaios, sendo 5 deles as repetições do ponto central, com três fatores em três níveis. As variáveis independentes avaliadas foram: a concentração de emulsificante na fase aquosa (X_1), a concentração de PGPR na fase óleo (X_2) e número de ciclos (X_3) (Tabela 4).

Tabela 4 – Variáveis independentes codificadas e reais do delineamento experimental.

Fatores	Codificação		
	-1	0	1
X ₁ – Concentração de emulsificante (% m/m da emulsão)	0,3	1,0	1,7
X ₂ - Concentração de PGPR (% m/m da emulsão)	0	0,2	0,4
X ₃ - Número de ciclos	2	6	10

Fonte: Própria autoria.

A matriz do delineamento experimental com as variáveis codificadas e reais está apresentada na Tabela 5. As variáveis dependentes foram o índice de estabilidade, o diâmetro médio de gota e o índice *span*. Esse mesmo planejamento foi aplicado para dois emulsificantes: o Tween 80 e a saponina.

Tabela 5 – Matriz do delineamento experimental Box-Behnken em variáveis codificadas e reais.

Ensaio	Codificadas			Reais		
	X ₁	X ₂	X ₃	X ₁	X ₂	X ₃
1	-1	-1	0	0,3	0,0	6
2	1	-1	0	1,7	0,0	6
3	-1	1	0	0,3	0,4	6
4	1	1	0	1,7	0,4	6
5	-1	0	-1	0,3	0,2	2
6	1	0	-1	1,7	0,2	2
7	-1	0	1	0,3	0,2	10
8	1	0	1	1,7	0,2	10
9	0	-1	-1	1,0	0,0	2
10	0	1	-1	1,0	0,4	2
11	0	-1	1	1,0	0,0	10
12	0	1	1	1,0	0,4	10
13	0	0	0	1,0	0,2	6
14	0	0	0	1,0	0,2	6
15	0	0	0	1,0	0,2	6
16	0	0	0	1,0	0,2	6
17	0	0	0	1,0	0,2	6

*X₁ = concentração de emulsificante (% m/m da emulsão); X₂ = concentração de PGPR (% m/m da emulsão); X₃ = Número de ciclos. Fonte: Própria autoria.

4.4.1 Análise de regressão

O *software* Statistica® 13.5 foi utilizado nas análises de regressão múltipla para verificar a significância em função dos efeitos principais, quadráticos e interação entre os fatores e para ajusta dos modelos de regressão (Equação 3).

$$Y = \beta_0 + \sum \beta_i X_i + \sum \beta_{ii} X_i^2 + \sum \beta_{ij} X_i X_j + e \quad (3)$$

onde, Y é a variável dependente, β_0 é uma constante, β_i , β_{ii} e β_{ij} são os coeficientes linear, quadrático e de interação, respectivamente, X_i e X_j são as variáveis independentes codificadas e e é o erro.

4.5 CARACTERIZAÇÃO DAS EMULSÕES

4.5.1 Índice de estabilidade

A estabilidade física das emulsões foi estudada com uma fotocentrífuga analítica multiamostra (LUMiSizer®, L.U.M GmbH, Berlim, Alemanha), a 2325 x g, à temperatura de 25°C por 3600 s em intervalos de 10 s. Estes parâmetros correspondem a uma estabilidade de 3 meses na gravidade terrestre. O volume de amostra testado foi de 1,8 ml.

Os valores de índice de instabilidade foram obtidos diretamente do *software* do equipamento *SepView v. 4.1* (L.U.M, Berlim, Alemanha), sendo convertidos para índice de estabilidade, variando entre 0 (instável) e 1 (mais estável).

4.5.2 Diâmetro médio de gota e span

O tamanho de gota foi avaliado em um analisador de tamanho de partícula por difração a laser (SALD-201V, Shimadzu, Japão). O diâmetro médio de gota (D_m) em porcentagem por volume (% volume) foi obtido diretamente do *software* do equipamento. O valor de *span* foi calculado usando-se a equação 4.

$$Span = \frac{d_{v,90} - d_{v,10}}{d_{v,50}} \quad (4)$$

onde $d_{v,90}$, $d_{v,10}$ e $d_{v,50}$ são os diâmetros em volume correspondente a 10, 50 e 90% de volume cumulativo (Dammak; Sobral, 2018a).

4.6 PRODUÇÃO DAS EMULSÕES COM EMULSIFICANTE CASEINATO DE SÓDIO

Para a produção das emulsões utilizando o emulsificante caseinato de sódio, foram levados em consideração os resultados obtidos no planejamento experimental para os outros emulsificantes. Assim, fixou-se alguns parâmetros para a produção com o emulsificante caseinato de sódio.

A metodologia de produção da emulsão foi a mesma descrita na seção 4.3. Os valores fixados de concentração de PGPR na fase óleo foi de 0,2% m/m da emulsão e número de ciclos no ultrassom de ponta foi de 6 ciclos (30 s *on*/30 s *off*). A concentração do emulsificante caseinato de sódio foi avaliada, sendo as concentrações testadas 0,2, 0,6, 1,0 e 1,4% m/m da emulsão.

O índice de estabilidade, o diâmetro médio de gota e o *span* foram obtidos de acordo com as metodologias descritas nas seções 4.5.1 e 4.5.2, respectivamente.

4.7 CARACTERIZAÇÃO DAS MELHORES EMULSÕES

A partir dos resultados de produção das emulsões obtidas nos planejamentos experimentais para os emulsificantes Tween 80 e saponina e a melhor concentração de caseinato de sódio, escolheu-se as melhores emulsões, as quais obtiveram o maior índice de estabilidade, menor D_m e menor valor de *span*.

As melhores emulsões, obtidas nos planejamentos experimentais, foram caracterizadas, em triplicata, segundo seu índice de estabilidade, D_m e *span* de acordo com a metodologia descrita nas seções 4.5.1 e 4.5.2, respectivamente. Além disso, as melhores emulsões produzidas com Tween 80 (T), saponina (S) e caseinato de sódio (C) foram caracterizadas para conhecimento das propriedades descritas a seguir.

4.7.1 Microscopia óptica

As emulsões foram analisadas por microscopia óptica em um microscópio de luz (Leica ICC50-W, Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Alemanha). Uma pequena gota de emulsão foi

adicionada à lâmina de vidro e coberta por lamínula, sendo observada na lente objetiva de 100X em imersão de óleo.

4.7.2 *Parâmetros de cor*

A cor das emulsões foi medida segundo metodologia descrita na seção 4.2.1. Neste caso as emulsões foram adicionadas em porta amostra de quartzo.

4.7.3 *pH*

O pH das emulsões foi avaliado, em triplicata, a partir da leitura direta em pHmetro portátil (PG1400, Gehaka, São Paulo-SP, Brasil).

4.7.4 *Reologia*

O comportamento reológico das emulsões foi analisado com um reômetro MCR92 (MCR92, Anton Paar GmH Graz, Áustria), com a geometria cilindros concêntricos (diâmetro do copo = 39,5 mm; diâmetro do cilindro = 42 mm). As medidas de fluxo estacionário foram analisadas com taxas de cisalhamento variando de 0 a 100 s⁻¹, sendo realizadas uma subida e uma descida. O comportamento reológico e a viscosidade foram avaliados a partir das curvas de tensão *versus* taxa de deformação da descida.

4.7.5 *Atividade antioxidante*

Para as análises de atividade antioxidante foi realizada uma prévia extração líquido-líquido dos compostos ativos da emulsão segundo metodologia adaptada de Gomes *et al.* (2021b). Em tubos de ensaio, foram adicionados à emulsão 3 mL de etanol absoluto e 2 mL de hexano, sendo este sistema agitado a cada 10 min, em um período de 20 min. Após este período, a fração etanol, mais densa, foi coletada e armazenada. Esta extração foi repetida três vezes. As frações contendo etanol foram combinadas em balões volumétricos e diluídas em etanol absoluto.

4.7.5.1 Compostos fenólicos totais

O teor de compostos fenólicos totais foi determinado pelo método de Folin-Ciocalteu, de acordo com metodologia descrita por Singleton e Rossi (1965). Uma alíquota de 0,5 mL do extrato da amostra foi adicionada a 2,5 mL de reagente Folin-Ciocalteu (10% v/v). Após 5 min, 2 mL de solução de carbonato de sódio (7,5% m/v) foi adicionado a mistura, a qual foi agitada em vórtex e mantida por 2h à temperatura ambiente na ausência de luz. Após este período, foi realizada a leitura da absorbância em espectrofotômetro UV/vis (Lambda 35, Perkin Elmer, Waltham-MA, EUA) em um comprimento de onda de 760 nm. A curva padrão foi determinada com ácido gálico e os resultados expressos em mg de ácido gálico equivalente (AGE)/g de emulsão.

4.7.5.2 Método de redução do íon férrico (FRAP)

A atividade antioxidante foi determinada pelo método de redução do ferro (FRAP), de acordo com a metodologia descrita por Benzie e Strain (1996) com modificações de Pulido, Bravo e Saura-Calixto (2000). Uma alíquota de 90 µL de extrato da amostra foi misturado a 270 µL de água destilada e 2,7 mL da solução de FRAP. A mistura foi agitada e levada em banho maria à 37 °C por 30 min. Posteriormente, a leitura da absorbância foi realizada em 595 nm em espectrofotômetro UV/vis (Lambda 35, Perkin Elmer, Waltham-MA, EUA). A curva padrão foi determinada com Trolox e os resultados foram expressos em mg de Trolox equivalente (TE)/g de emulsão.

4.7.5.3 Método ABTS^{•+}

O método de sequestro do radical livre ABTS^{•+} foi realizado de acordo com o descrito por Re *et al.* (1999). Inicialmente, a solução de ABTS (solução ABTS 7 mM e solução de persulfato de potássio 2,45 mM) foi preparada e mantida por 16 horas para reação em ausência de luz. Esta solução foi então diluída em etanol (100 vezes) e sua absorbância foi corrigida para $0,650 \pm 0,005$ em 734 nm. Um volume de 30 µL de extrato da amostra foi adicionado a 3 mL da solução de ABTS e a mistura resultante foi homogeneizada em vórtex e deixadas reagindo por 6 min. Após este período, foi realizada leitura da absorbância em 764 nm em espectrofotômetro UV/vis (Lambda 35, Perkin Elmer, Waltham-MA, EUA). A curva padrão

foi determinada com Trolox e os resultados foram expressos em mg de Trolox equivalente (TE)/g de emulsão.

4.7.6 Atividade antimicrobiana

A atividade antimicrobiana das emulsões carregadas de PV foi avaliada por testes de difusão em disco conforme o *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (NCCLS, 2000). Foram testados dois microrganismos Gram-negativos, *Escherichia coli* (ATCC 25922) e *Salmonella enterica* (ATCC 14028), e dois Gram-positivos *Staphylococcus aureus* (INCQS 500102) e *Listeria monocytogenes* (CCT 7476).

As culturas desses microrganismos foram regeneradas em caldo BHI (*Brain heart infusion*) e incubadas à 37°C por 24 horas. Fez-se então a padronização das cepas em 0,5 na escala MacFarland em espectrofotômetro em 625 nm. As suspensões de bactérias foram espalhadas na superfície de placas contendo ágar Mueller Hinton. Em discos de papel de 6 mm de diâmetro, foram adicionados 15 µL de emulsão e de água deionizada como controle negativo, e colocados na superfície da placa. Como controle positivo foram utilizados discos de cloranfenicol (2,5 mg/mL) de mesmo diâmetro. As placas foram incubadas por 24 horas à 37°C. Após este período, os halos de inibição foram medidos (cm) e comparados com o halo de inibição do controle positivo.

4.8 PRODUÇÃO DOS FILMES ATIVOS

Os filmes tanto à base de gelatina quanto à base de isolado proteico de soja (IPS) foram produzidos pelo método *casting*. Em ambos os casos, a formulação formadora de filme (FFF) sem emulsão foi produzida como controle.

4.8.1 Preparo da formulação formadora de filme à base de gelatina

Inicialmente, a gelatina (4 g/100 g de FFF) foi hidratada em água destilada por 30 min à temperatura ambiente. Em seguida, ela foi solubilizada em banho termostático (MA-184/20, Marconi, Piracicaba-SP, Brasil) à 55°C por 10 min. Após este período, a dispersão de gelatina foi mantida sob agitação magnética leve (AA-2050, Gehaka, São Paulo-SP, Brasil) por 5 min, quando então, o glicerol (30 g/100 g de biopolímero) foi adicionado, sendo mantida a agitação

leve por mais 10 min (Tessaro *et al.*, 2021). Finalmente, a emulsão (10 g fase óleo/100 g de biopolímero) foi adicionada. A FFF foi então, tratada com um homogeneizador rotor-estator (Ultraturrax® IKA T25, Labotechnik, Staufen, Alemanha) à 10000 rpm por 3 min.

4.8.2 *Preparo da solução formadora de filme à base de isolado proteico de soja*

O IPS (4 g/100 g de FFF) foi adicionado em água destilada e mantido sob agitação magnética (AA-2050, Gehaka, São Paulo-SP, Brasil) por 10 min à temperatura ambiente. O pH da solução foi, então, ajustado para $10,0 \pm 0,1$ com solução de NaOH (1 M). Em seguida, a FFF foi aquecida à 70°C, sempre sob agitação magnética, em banho maria e mantida por 20 min. Após este período, o glicerol (30 g/100 g de biopolímero) foi adicionado e a FFF mantida sob agitação por mais 20 min (Paglione *et al.*, 2019). Após atingir a temperatura ambiente, a emulsão (10 g fase óleo/ 100 g de biopolímero) foi adicionada e a FFF foi tratada com um homogeneizador rotor-estator (Ultraturrax® IKA T25, Labotechnik, Staufen, Alemanha) à 10000 rpm por 3 min.

4.8.3 *Produção dos filmes ativos*

As FFFs foram adicionadas em placas acrílicas com 145 mm de diâmetro. Para se obter espessuras similares, foram adicionados 1,7 g de massa seca de FFF/placa. As placas foram levadas para secagem em estufa de ar forçado (MA035, Marconi, Piracicaba-SP, Brasil) à 30°C por 24 horas.

Os tratamentos foram identificados como G, GT, GS e GC e S, ST, SS e SC, onde G e S correspondem aos filmes à base de gelatina ou IPS controle, e a segunda letra T, S e C correspondem aos filmes ativos incorporados com emulsões emulsificadas com Tween 80, saponina ou caseinato de sódio, respectivamente.

Previamente às caracterizações, os filmes foram acondicionados em NaBr (UR = 58%) por 7 dias. Para análise de MEV e os filmes foram mantidos em dessecador contendo sílica-gel por 10 dias.

4.9 CARACTERIZAÇÃO DOS FILMES

4.9.1 *Espessura*

A espessura dos filmes foi calculada como a média de 10 medidas em pontos aleatórios da amostra, empregando-se um micrômetro digital (± 0.001 mm; Mitutoyo, Tóquio, Japão) (Sobral, 2000).

4.9.2 Umidade

A umidade dos filmes foi determinada por secagem em estufa à 105°C durante 24 horas (Gontard; Guilbert; Cuq, 1992). Os valores de umidade foram calculados com a equação 5.

$$U = \left(\frac{m_i - m_f}{m_i} \right) \times 100 \quad (5)$$

Onde U é a umidade (g de água/100 g de amostra úmida), m_i a massa inicial da amostra úmida (g) e m_f a massa final da amostra seca (g).

4.9.3 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A morfologia da superfície dos filmes e da seção transversal foram analisadas com ajuda de um microscópio eletrônico de varredura (TM3000, Hitachi Ltd, Tóquio, Japão) operando a 15 kV. Para análise da seção transversal, a amostra do filme foi fraturada após congelamento em nitrogênio líquido. As amostras foram fixadas sobre fita de carbono e analisadas sem preparo prévio.

4.9.4 Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)

A análise de espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) foi realizada em espectrofotômetro (Spectrum One, Perkin Elmer, Waltham-MA, EUA) equipado com acessório UATR (“*Universal Attenuator Total Reflectance*”). O espectro foi obtido na faixa espectral de 650 a 4000 cm^{-1} com resolução de 4 cm^{-1} , sendo realizadas 20 varreduras.

4.9.5 Difração de raios X (DRX)

A análise de DRX foi realizada em um difratômetro de raios-X (AXS Analytical X-Ray D 5005, Siemens, Munique, Alemanha) utilizando o cobre como fonte (radiação $\text{CuK}\beta$, $\lambda =$

0,15405 nm). As medidas foram realizadas a uma voltagem de 40 kV e corrente de 15 mA. Foram realizadas varreduras de 2° a 70° a uma taxa de 2°/min.

4.9.6 Calorimetria diferencial de varredura (DSC)

As propriedades térmicas dos filmes foram estudadas por calorimetria diferencial de varredura (DSC) com o mesmo calorímetro descrito em 4.2.2. As amostras foram aquecidas de -150 a 150 °C, com uma taxa de aquecimento de 5 °C/min, com corrida dupla após resfriamento com nitrogênio líquido, e com atmosfera inerte (45 mL/min de N₂) (Gontard; Ring, 1996; Sobral; Habitante, 2001). Foram determinadas a temperatura de transição vítrea (T_g), temperatura de fusão (T_m) e entalpia de fusão (ΔH) a partir das curvas térmicas utilizando-se o programa *Universal Analysis V1.7F* (TA Instruments, New Castle-DE, EUA).

4.9.7 Ângulo de contato de água

O ângulo de contato de água da superfície de secagem, ou seja, da superfície do filme que ficou em contato com o ar durante a secagem, foi determinado com um tensiômetro óptico (Attension Theta lite, KSV Instruments, Helsinki, Finlândia) equipado com software analisador de imagens One Attension. Amostras dos filmes foram fixados no suporte do equipamento e uma gota de água Mili-Q (5 µL) foi adicionada sobre a amostra com auxílio de uma seringa de precisão. As imagens foram obtidas a cada segundo. O tempo para observação do ângulo de contato foi fixado em 15 segundos (Tessaro *et al.*, 2021).

4.9.8 Solubilidade em água

Amostras de 2 cm de diâmetro foram adicionadas em 50 mL de água destilada e mantidas sob agitação de 25 rpm em mesa agitadora orbital (MA141, Marconi, Piracicaba-SP, Brasil) por 24 horas (Gontard; Guilbert; Cuq, 1992). Após este período, a porção não solubilizada das amostras foi levada à secagem em estufa à 105 °C por 24 horas. A solubilidade em água (S, em g de filme solubilizado/100 g de amostra úmida) dos filmes foi calculada com a equação (6).

$$S = \left(\frac{m_{si} - m_{sf}}{m_{si}} \right) \times 100 \quad (6)$$

Onde S é a solubilidade, m_{si} é a massa seca inicial e m_{sf} a massa seca final das amostras.

4.9.9 Permeabilidade ao vapor de água (PVA)

A permeabilidade ao vapor de água dos filmes foi determinada de acordo com norma ASTM-E96 (ASTM, 1996) com modificações (Gontard; Guilbert; Cuq, 1992). Amostras dos filmes (diâmetro 40 mm) foram adicionadas em células de permeação de alumínio contendo sílica gel em seu interior (UR = 0% e pressão vapor de 0 kPa). Estas células foram armazenadas em dessecadores contendo água destilada (UR = 100% e pressão de vapor de 3,1691 kPa) à 25°C. O ganho da massa das células de permeação foi avaliado a cada 24 horas durante 7 dias. A PVA dos filmes foi calculada com a equação 7.

$$PVA = \frac{\Delta G}{\Delta t} \left(\frac{x}{A \Delta P} \right) \quad (7)$$

Onde $\Delta G/\Delta t$ é a taxa de ganho de massa da célula de permeação no tempo (g/h), A é a área de permeação (32,17 cm²), x é a espessura do filme (mm) e ΔP é a diferença de pressão entre as superfícies do filme (3,1691 kPa).

4.9.10 Propriedades mecânicas

Ambos os testes foram realizados à temperatura ambiente (22-25 °C) e em triplicata, no mínimo.

4.9.10.1 Teste de tração uniaxial

O teste de tração uniaxial foi realizado segundo ASTM D882-02 (ASTM, 2002) em um texturômetro (TA.XT2i, Stable Micro Systems, Surrey, Reino Unido). Amostras com comprimento útil de 5 cm e largura de 1,5 cm foram fixadas nas garras do equipamento e separadas a uma velocidade de 1,0 mm/s até a ruptura. A tensão na ruptura (TR em MPa) e a alongação na ruptura (ER em %) foram obtidos a partir das curvas tensão *versus* deformação. O módulo elástico (ME em MPa) foi calculado pela inclinação da porção linear da curva tensão *versus* deformação. Os cálculos e valores foram obtidos com o software do equipamento (Exponent Lite Express, v 4.0.13.0).

4.9.10.2 Teste de perfuração

O teste de perfuração foi realizado em texturômetro (TA.XT2i, Stable Micro Systems, Surrey, Reino Unido) de acordo com a norma ASTM F1306 (ASTM, 2008). Amostras circulares dos filmes foram fixadas em célula com 15 mm de raio e perfuradas com sonda de 3 mm de diâmetro deslocando-se a 1 mm/s. A força máxima na perfuração (FP, N) foi obtida pelo ponto máximo da curva força \times deslocamento da probe com o emprego do software do equipamento (Exponent Lite Express, v 4.0.13.0). A deformação na perfuração (DP, %) foi calculada de acordo com a equação 8 (Sobral *et al.*, 2001).

$$DP = \frac{\sqrt{(D^2 + l_0^2)} - l_0}{l_0} \times 100 \quad (8)$$

Onde D é o deslocamento da probe na perfuração (mm) e l_0 é o comprimento inicial do filme (raio da célula de 15 mm).

4.9.11 Propriedades ópticas

4.9.11.1 Parâmetros de cor

Os parâmetros de cor dos filmes foram determinados com o equipamento descrito em 4.2.1. Neste caso, os filmes foram aplicados sobre um padrão branco e a leitura era efetuada, obtendo-se os padrões L^* , a^* e b^* , segundo ASTM D2244-16 (ASTM, 2016). A diferença total de cor (ΔE^*) foi então calculada utilizando-se a equação 9.

$$\Delta E^* = \sqrt{\Delta L^{*2} + \Delta a^{*2} + \Delta b^{*2}} \quad (9)$$

Onde, $\Delta L^* = L^*$ da amostra - L^* do padrão (94,03); $\Delta a^* = a^*$ da amostra - a^* do padrão (-0,81) e $\Delta b^* = b^*$ da amostra - b^* do padrão (1,76).

4.9.11.2 Opacidade

A opacidade (Y) foi determinada no mesmo equipamento descrito em 4.2.1, e calculada pela relação $Y = \frac{Y_p}{Y_b}$, onde Y_p é a opacidade da amostra sobre a placa padrão preta e Y_b sobre placa padrão branca (Sobral, 2000).

4.9.11.3 Brilho

O brilho dos filmes foi determinado com um glossímetro (NGL 20/60, Rhopoint, Bexhill on Sea-East Sussex, Reino Unido). Foram realizadas 10 medidas aleatórias na superfície de secagem dos filmes nos ângulos de 20° e 60° e os resultados foram expressos em unidade de brilho GU (ASTM, 2003).

4.9.11.4 Propriedades de barreira a luz UV/Visível

As propriedades de barreira à luz UV/visível dos filmes foi realizada em espectrofotômetro UV/vis (Lambda 35, Perkin Elmer, Waltham-MA, EUA). Amostras dos filmes (4 cm x 1,5 cm) foram adicionados no lugar da cubeta de modo que o feixe de luz atravessasse o filme (Fang *et al.*, 2002). Como branco foi adotado o suporte da cubeta vazio. Foram realizadas varreduras de 200 nm a 800 nm e os resultados foram avaliados qualitativamente pelo espectro de transmitância dos filmes.

4.9.12 Atividade antioxidante

Para a extração dos compostos ativos dos filmes ativos, 0,1 g de filme cortados em pequenos pedaços foi adicionado à 10 mL de solução hidroetanólica (1:1) e levados à agitação de 50 rpm por 24 horas, na ausência de luz. A alíquota necessária para realizar as análises foi retirada do sobrenadante (Pérez-Córdoba *et al.*, 2018).

A atividade antioxidante dos filmes ativos foi determinada como compostos fenólicos totais (mg de AGE/g de filme); método de redução do íon férrico (FRAP, mg de TE/g de filme); e método ABTS⁺ (mg de TE/g de filme), segundo metodologias descritas nas seções 4.7.5.2, 4.7.5.3 e 4.7.5.4, respectivamente.

4.9.13 Atividade antimicrobiana

A atividade antimicrobiana dos filmes ativos foi mensurada pelo teste de difusão em disco, segundo metodologia descrita na seção 4.7.5. Porém, os discos com 6 mm de diâmetro foram retirados dos filmes ativos.

4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados experimentais foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e a diferença entre as médias realizadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância no software *Statistica*® 13.5.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CARACTERIZAÇÃO DA PRÓPOLIS VERMELHA BRUTA

5.1.1 Parâmetros de cor

Os valores relativamente elevados de a^* e b^* e baixo de L^* indicaram que a PVB apresentou uma coloração tendendo para o vermelho escuro (Tabela 6), estando de acordo com o aspecto visual (Figura 4). A própolis nativa é avermelhada, mas após a moagem, sua aparência é de vermelho-alaranjado, o que pode ser observado pelo aumento dos parâmetros a^* e b^* (Tabela 6). A diferença dos parâmetros de cor entre as amostras do mesmo produto é devido à diferença na superfície específica das amostras, muito maior no produto triturado, que promove maior dispersão da luz (Li et al., 2020).

Tabela 6 – Parâmetros de cor (L^* , a^* , b^*), croma (C^*) e ângulo Hue (H^*) da própolis vermelha bruta (PVB) e triturada (PVBT).

Parâmetro	PVB	PVBT
L^*	$27,2 \pm 2,3$	$50,7 \pm 0,3$
a^*	$8,7 \pm 1,2$	$20,2 \pm 0,2$
b^*	$6,0 \pm 1,5$	$38,8 \pm 0,3$
C^*	$10,6 \pm 1,8$	$43,7 \pm 0,3$
H^* ($^\circ$)	$34,1 \pm 4,1$	$62,5 \pm 0,1$

Fonte: Própria autoria.

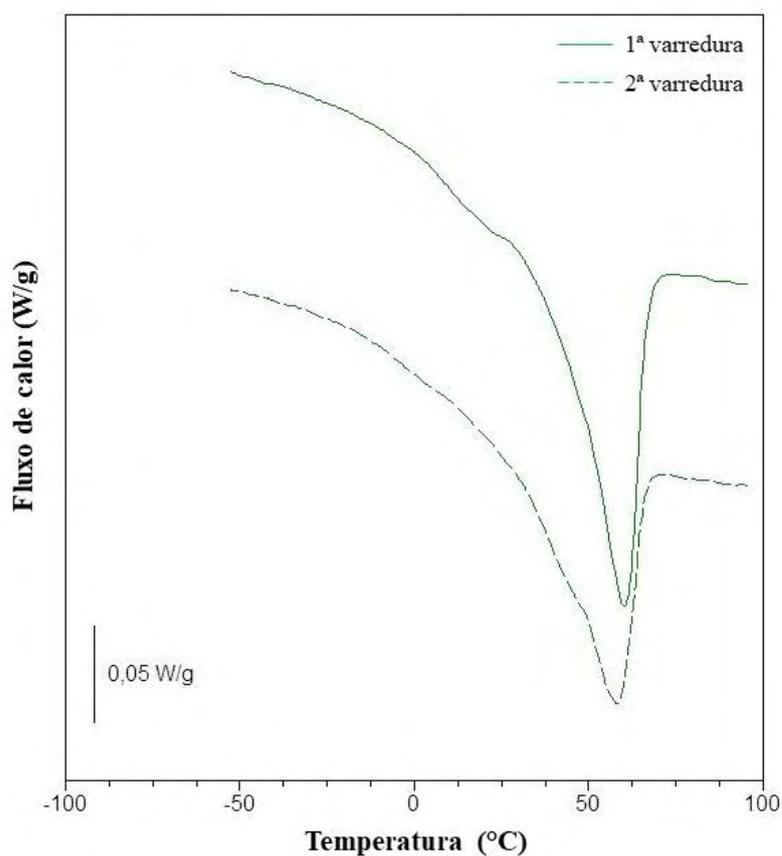
O valor do ângulo Hue (H^*), confirma a coloração tendendo para o vermelho para a PVB e para o amarelo para a PVBT. O croma (C^*), que está relacionado à saturação da cor, sugere que a PVB e a PVBT apresentaram uma coloração vívida.

5.1.2 Calorimetria diferencial de varredura (DSC)

Pode-se observar nos termogramas das amostras de PVB a ocorrência de um pico endotérmico, muito possivelmente devido à fusão dos lipídeos presentes na própolis (Figura 5). Nessa corrida, temperatura de fusão foi $60,0 \pm 0,2$ °C e a entalpia de fusão foi $35,6 \pm 1,5$ J/g. O mesmo fenômeno foi observado no termograma obtido na segunda corrida após resfriamento

com nitrogênio líquido (Figura 5), o que é comum para fenômenos de fusão (Sobral; Habitante, 2001), mas os valores calculados para a temperatura e entalpia de fusão foram ligeiramente inferiores ($57,5 \pm 0,6$ °C e $33,8 \pm 1,5$ J/g, respectivamente). Essa diferença pode ser explicada devido a algum polimorfismo presente no material, já que este apresenta em sua composição ceras e materiais gordurosos que apresentam esta característica. O polimorfo mais estável fundiu na primeira corrida a uma temperatura de, aproximadamente, 60°C. Com o resfriamento, formou-se um polimorfo menos estável, o qual fundiu a uma temperatura menor na segunda corrida ($57,5 \pm 0,6$ °C). A fim de se confirmar a formação de polimorfos na própolis vermelha bruta, foi realizada uma análise de DRX (item 5.1.3).

Figura 5 – Termograma obtido por calorimetria diferencial de varredura da própolis vermelha bruta na 1ª e 2ª varreduras.



Fonte: Própria autoria.

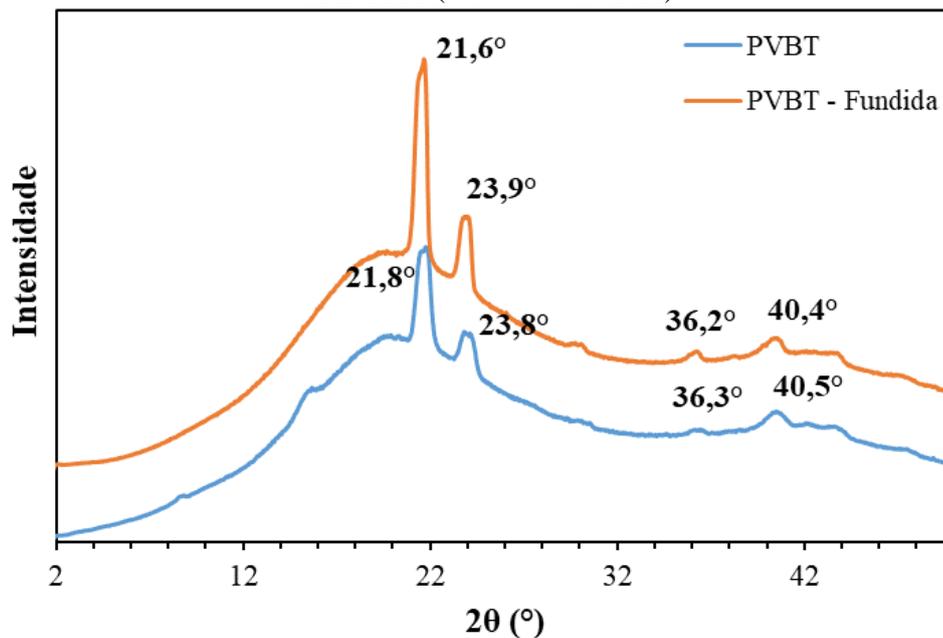
De toda forma, foi possível fixar a temperatura de preparo da emulsão em 60°C, com posterior resfriamento e manutenção a temperatura ambiente, não podendo haver uma nova alteração da temperatura para não ocorrer a formação de morfos indesejados. A temperatura de

fusão da própolis bruta tem sido reportada em torno de 60 e 70°C (Martinotti; Ranzato, 2015; Wagh, 2013).

5.1.3 Difração de raios X (DRX)

Analisando-se os difratogramas da própolis vermelha bruta triturada, a temperatura ambiente, foram observados os picos principais em 21,8° e 23,8°, e, após sua fusão à 60°C e posterior resfriamento, foram observados picos em 21,6° e 23,9° (Figura 6). Assim, não houve um deslocamento desses picos quanto ao ângulo, entretanto, houve uma aumento na intensidade dos mesmos, sendo que o índice de cristalinidade aumentou de 5,2% para 6,3% após a fusão, corroborando com a ocorrência de polimorfismo.

Figura 6 – Difratograma de raios X da própolis vermelha bruta triturada antes (PVBT) e após sua fusão (PVBT – Fundida).



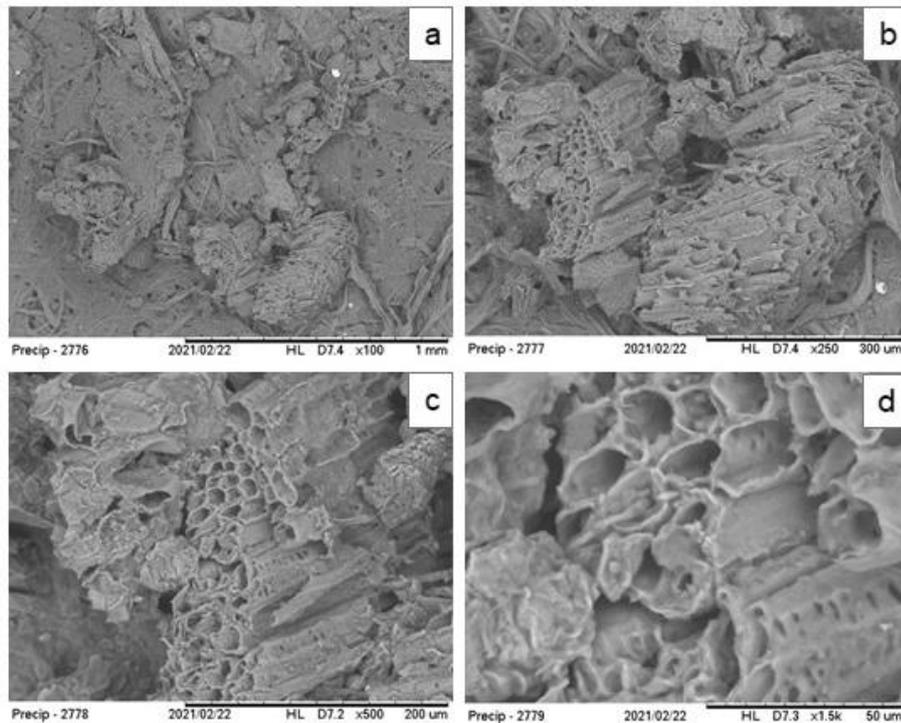
Fonte: Própria autoria.

Jansen-Alves *et al.* (2019) realizaram análises de DRX de extrato liofilizado de própolis e observam picos estreitos e pontudos em 21 e 23°. Yang *et al.* (2014) observaram picos em 21,5 e 23,5° em extrato etanólico (80%) de própolis, enquanto Sharifi, Goli e Fayaz (2019) observaram picos em 21,2 e 23,3° analisando a cera de própolis. Esses valores foram similares aos calculados dos primeiros picos observados na Figura 6.

5.2 CARACTERIZAÇÃO DA EMULSÃO PRODUZIDA NOS TESTES PRELIMINARES

Durante os testes preliminares para a produção das emulsões, observou-se a formação de partículas provenientes da PVBT e, para observar de que eram compostas tais partículas, foi realizada uma microscopia eletrônica de varredura deste resíduo (Figura 7). Possivelmente, tais partículas são aquelas que não se solubilizaram na fase óleo durante a produção das emulsões, podendo ser constituídas de partes celulósicas provenientes da fonte vegetal. Aparentam também ser parte do material de parede das colmeias, com sua estrutura porosa característica (Figura 7c e 7d). Características semelhantes foram observadas por Machado *et al.* (2016) e Tylkowski *et al.* (2010) em micrografias de MEV de diferentes tipos de própolis brutas trituradas.

Figura 7 – Micrografias do sedimentado obtido na produção das emulsões após filtração em papel filtro em aumento de (a) 100 X, (b) 250 X, (c) 500 X e (d) 1500 X.

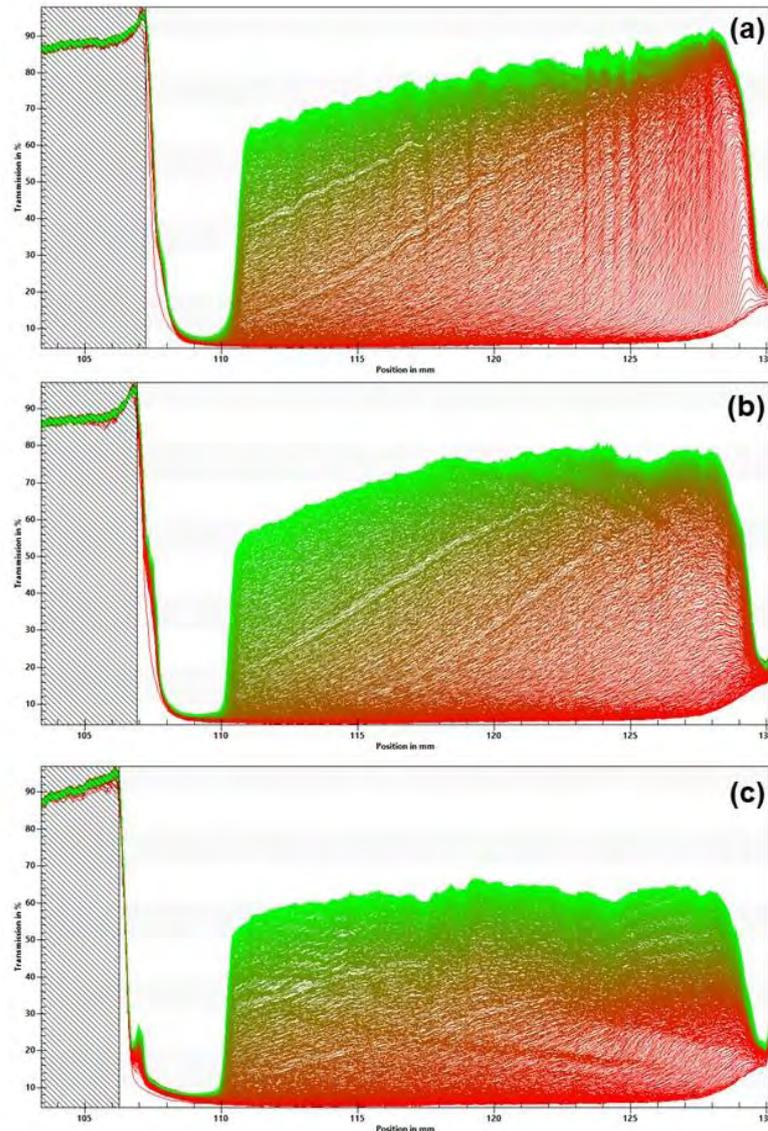


Fonte: Própria autoria.

Para a fixação da concentração de própolis vermelha bruta triturada (PVBT) a ser utilizada, foram produzidas três emulsões com as concentrações de PVBT de 1, 2 e 3% m/m da emulsão. Os perfis de transmissão destas emulsões (Figura 8) mostram que a emulsão com perfil mais baixo e com maior regularidade é a amostra produzida com uma concentração de

3% m/m de PVBT (Figura 8c) e a de perfil mais irregular e com alta transmissão a de 1% m/m (Figura 8a).

Figura 8 – Perfis de transmissão das emulsões encapsulando própolis vermelha bruta em diferentes concentrações: 1% m/m (a), 2% m/m (b) e 3% m/m (c).



Fonte: Própria autoria.

Observou-se o aumento do índice de estabilidade com o aumento da concentração de PVBT na emulsão, muito possivelmente devido à presença de algum composto com atividade surfactante na própolis (Tabela 7). Em função desses resultados, a concentração de PVBT foi fixada em 3% m/m da emulsão para a realização do planejamento.

Tabela 7 – Índice de estabilidade das emulsões com diferentes concentrações de própolis vermelha bruta triturada (PVBT).

Concentração de PVBT (% m/m da emulsão)	Índice de estabilidade
1	$0,270 \pm 0,005^c$
2	$0,329 \pm 0,007^b$
3	$0,451 \pm 0,010^a$

Fonte: Própria autoria.

5.3 PRODUÇÃO DE EMULSÕES E PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL

Foram produzidas 12 diferentes emulsões mais 5 repetições do ponto central, utilizando-se o Tween 80 ou a saponina como emulsificantes. No primeiro caso, foi possível observar diferenças visuais em função do tratamento, de amostras mais escuras (1, 3 e 5) para amostras mais claras (8, 10 e 12) (Figura 9). Além disso, pode-se observar que houve certa separação de fases visível nos ensaios 3, 5 e 7 (Figura 9). Os demais ensaios não aparentam separação de fases visual, aparentando serem homogêneas e com coloração característica da própolis vermelha.

Figura 9 – Emulsões produzidas pelo planejamento experimental com o emulsificante Tween 80 nos ensaios de 1 a 12 e do ponto central (PC).



Fonte: Própria autoria.

Por outro lado, não foi possível se observar separação de fases nas emulsões com saponina, logo após a sua produção (Figura 10). Essas se apresentam homogênea e com colorações variadas entre os ensaios, mas característica da própolis vermelha.

Figura 10 – Emulsões produzidas pelo planejamento experimental com o emulsificante saponina nos ensaios de 1 a 12 e do ponto central (PC).



Fonte: Própria autoria.

A matriz do delineamento e os resultados obtidos para as variáveis resposta para obtenção das melhores condições de produção das emulsões carregadas de PVBT produzidas com Tween 80 estão apresentadas na Tabela 8 e para o emulsificante saponina, na Tabela 9.

Tabela 8 – Matriz do delineamento experimental e resultados previstos e experimentais das variáveis resposta índice de estabilidade, diâmetro médio de gota (D_m) e *span* para as emulsões produzidas com Tween 80 encapsulando própolis vermelha bruta triturada (PVBT).

Ensaio	X ₁ (%o/m/m)	X ₂ (%o/m/m)	X ₃	Índice de estabilidade		D _m (μm)		Span	
				Exp.	Prev.	Exp.	Prev.	Exp.	Prev.
1	0,3	0,0	6	0,575	0,460	4,82	4,59	5,79	4,31
2	1,7	0,0	6	0,827	0,840	1,14	0,63	0,72	-0,07
3	0,3	0,4	6	0,247	0,460	2,02	2,87	1,30	1,39
4	1,7	0,4	6	0,805	0,840	1,77	2,35	2,08	2,85
5	0,3	0,2	2	0,500	0,460	5,94	5,37	2,35	2,85
6	1,7	0,2	2	0,763	0,840	1,28	0,97	1,21	1,39
7	0,3	0,2	10	0,361	0,460	2,12	2,09	1,98	2,85
8	1,7	0,2	10	0,871	0,840	1,79	2,01	1,58	1,39
9	1,0	0,0	2	0,760	0,890	1,73	1,83	1,45	1,12
10	1,0	0,4	2	0,771	0,890	1,84	1,83	1,18	1,12
11	1,0	0,0	10	0,836	0,890	1,37	0,71	1,22	1,12
12	1,0	0,4	10	0,926	0,890	1,07	0,71	1,28	1,12
13	1,0	0,2	6	0,898	0,890	1,10	1,27	1,05	1,12
14	1,0	0,2	6	0,887	0,890	1,10	1,27	1,03	1,12
15	1,0	0,2	6	0,887	0,890	1,09	1,27	1,03	1,12
16	1,0	0,2	6	0,893	0,890	1,09	1,27	1,05	1,12
17	1,0	0,2	6	0,889	0,890	1,06	1,27	0,83	1,12

*X₁ = concentração de Tween 80; X₂ = concentração de PGPR; X₃ = número de ciclos; Exp. = experimental; Prev. = previsto. Fonte: Própria autoria.

Tabela 9 – Matriz do delineamento experimental e resultados previstos e experimentais das variáveis resposta índice de estabilidade, diâmetro médio de gota (D_m) e *span* para as emulsões produzidas com saponina encapsulando própolis vermelha bruta triturada (PVBT).

Ensaio	X_1 (%m/m)	X_2 (%m/m)	X_3	Índice de estabilidade		D_m (μm)		<i>Span</i>	
				Exp.	Prev.	Exp.	Prev.	Exp.	Prev.
1	0,3	0,0	6	0,251	0,260	2,02	2,04	1,28	1,25
2	1,7	0,0	6	0,251	0,260	1,94	1,90	1,31	1,25
3	0,3	0,4	6	0,305	0,260	2,16	2,04	1,39	1,25
4	1,7	0,4	6	0,236	0,260	1,92	1,90	1,28	1,25
5	0,3	0,2	2	0,211	0,210	2,00	2,04	1,21	1,25
6	1,7	0,2	2	0,205	0,210	1,91	1,90	1,28	1,25
7	0,3	0,2	10	0,245	0,310	2,03	2,04	1,29	1,25
8	1,7	0,2	10	0,361	0,310	1,85	1,90	1,28	1,25
9	1,0	0,0	2	0,199	0,210	1,88	1,86	1,27	1,25
10	1,0	0,4	2	0,212	0,210	1,82	1,86	1,21	1,25
11	1,0	0,0	10	0,328	0,310	1,99	1,86	1,34	1,25
12	1,0	0,4	10	0,280	0,310	1,82	1,86	1,22	1,25
13	1,0	0,2	6	0,296	0,260	1,88	1,86	1,27	1,25
14	1,0	0,2	6	0,257	0,260	1,87	1,86	1,24	1,25
15	1,0	0,2	6	0,244	0,260	1,84	1,86	1,27	1,25
16	1,0	0,2	6	0,239	0,260	1,86	1,86	1,23	1,25
17	1,0	0,2	6	0,289	0,260	1,84	1,86	1,26	1,25

* X_1 = concentração de Tween 80; X_2 = concentração de PGPR; X_3 = número de ciclos; Exp. = experimental; Prev. = previsto. Fonte: Própria autoria.

Os resultados experimentais do índice de estabilidade, diâmetro médio e valores de *span* serão discutidos nas seções 5.3.1, 5.3.2 e 5.3.3, respectivamente.

5.3.1 Índice de estabilidade

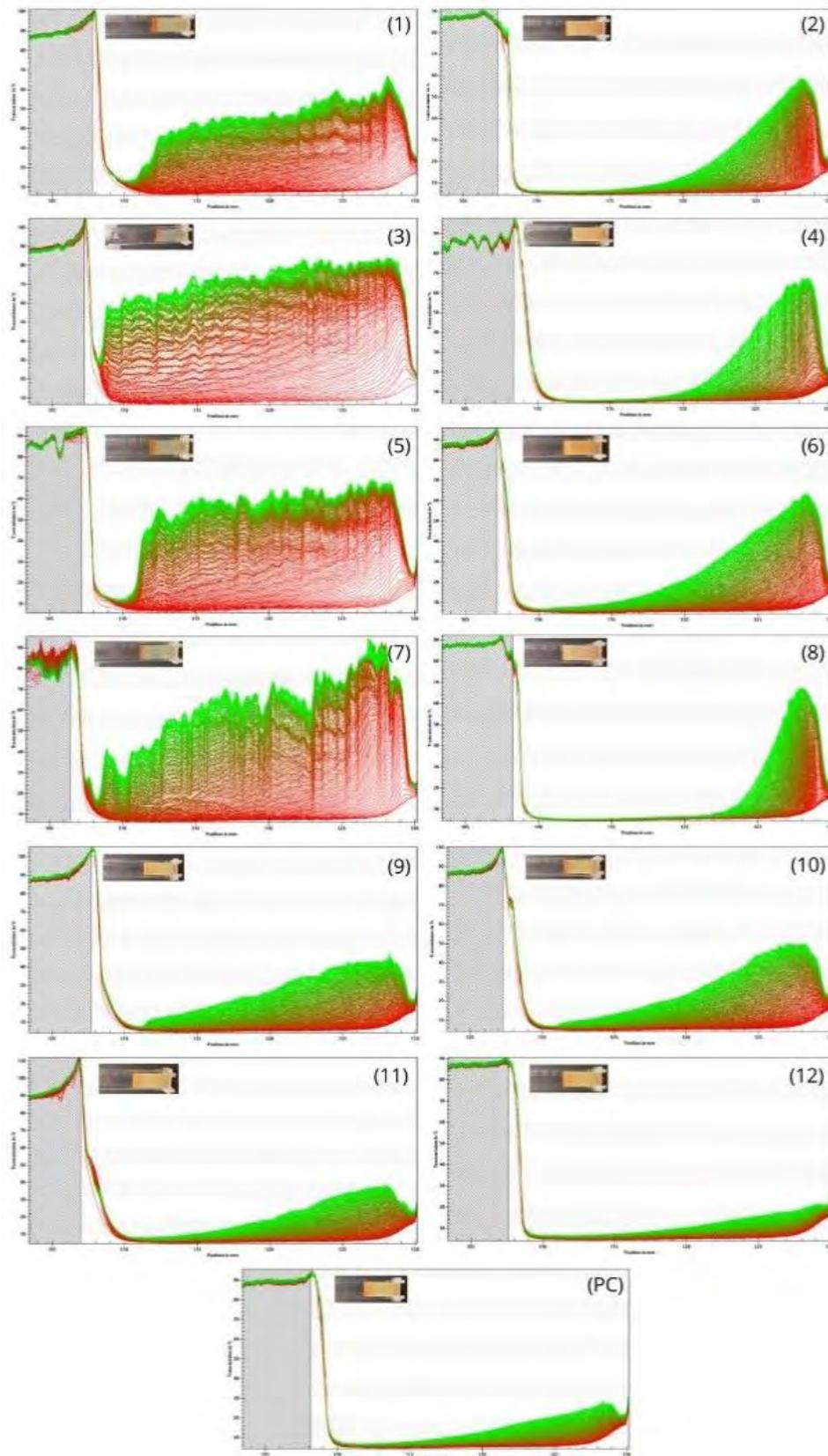
O estudo da estabilidade das emulsões é importante não apenas para o conhecimento da sua “*shelf life*”, mesmo porque deverão ser usadas imediatamente após a sua produção, mas sobretudo porque elas serão submetidas a estresses físicos no processamento dos filmes como agitação mecânica, tratamento térmico e secagem. A produção de uma emulsão estável implica na manutenção das suas propriedades no filme final.

Nas Figuras 11 e 12 estão apresentados os perfis de transmissão de luz dos ensaios do planejamento experimental para os emulsificantes Tween 80 e saponina, respectivamente. Para o Tween 80, os resultados apresentaram uma tendência geral de apresentar uma transmissão mais alta na parte inferior da cubeta (130 mm) e mais baixa no topo (108 mm) (Figura 11). Entretanto, analisando-se qualitativamente, observou-se que algumas amostras (1, 3, 5 e 7) apresentaram forte tendência a cremação em todo o tempo de análise, enquanto duas amostras (12 e PC) se apresentaram muito estáveis, mantendo o perfil muito próximo ao inicial. As amostras 2, 4, 6, 8, 9 e 10 também apresentaram um perfil mais baixo, mas até o meio da cubeta sugerindo uma maior estabilidade para tempos curtos. Esses perfis foram consequência da migração da fase oleosa, mais opaca, para o topo da célula (à esquerda dos espectros, Figura 11) e da fase água, mais transparente, para a base da cubeta (à direita dos espectros, Figura 11), podendo ser relacionado ao processo de separação de fases por cremação (Dammak; Sobral, 2017, 2018b). As amostras restantes apresentaram perfis irregulares, o que pode ser indicativo de processos de agregação das gotas de óleo, o que resulta em aglomerados que podem afetar a transmissão o longo do tempo, causando flutuações (Dammak; Sobral, 2021)

Quantitativamente, pode-se considerar que emulsões tendo índice de estabilidade superior a 0,5 são estáveis. Assim, observou-se que os ensaios 3, 5 e 7 se apresentaram instáveis (Tabela 8), corroborando o fato de se ter observado visualmente separação de fases nos ensaios 3, 5 e 7 (Figura 9). E, de modo geral, todas as outras amostras podem ser consideradas como estáveis, ou mesmo, muito estáveis, com índice de estabilidade maior que 0,8 (Tabela 8).

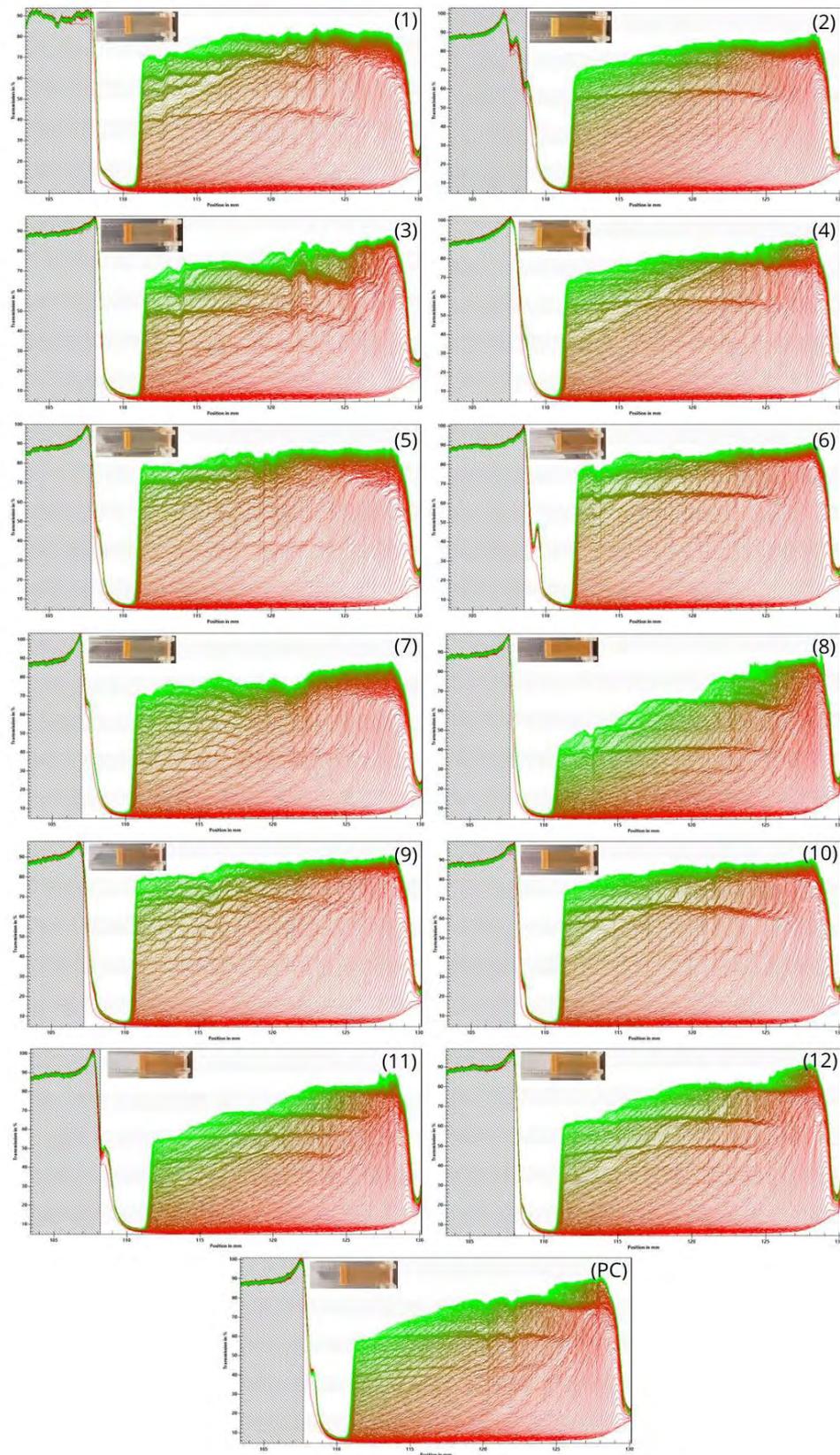
Para as emulsões produzidas com saponina foram observados perfis de transmissão bastante irregulares e com flutuações, já com tendência mais horizontal nos últimos perfis, com alta transmissão e com a fase oleosa menos espessa, na parte superior da cubeta (Figura 12). Esses tipos de perfis demonstram baixa estabilidade das emulsões (Dammak; Sobral, 2021; Tessaro *et al.*, 2022) e podem ser observados nos baixos valores obtidos de índice de estabilidade, menores do que 0,5 (Tabela 9). Esses resultados indicam que a saponina, apesar de ser um bom emulsificante para produção de emulsões (Figura 10), ela não é necessariamente estabilizante (Tabela 9).

Figura 11 – Perfis de transmissão das emulsões produzidas pelo planejamento experimental com emulsificante Tween 80 dos ensaios de 1 a 12 e do ponto central (PC). Fotografias das respectivas emulsões dentro das cubetas estão em encarte em cada figura.



Fonte: Própria autoria.

Figura 12 – Perfis de transmissão das emulsões produzidas pelo planejamento experimental com emulsificante saponina dos ensaios de 1 a 12 e do ponto central (PC). Fotografias das respectivas emulsões dentro das cubetas estão em encarte em cada figura.



Fonte: Própria autoria.

A tabela dos coeficientes de regressão e os resultados da análise estatística (ANOVA) para a variável resposta índice de estabilidade para os emulsificantes utilizados são apresentadas na Tabela 10 e Tabela 11, respectivamente.

Tabela 10 – Tabela dos coeficientes de regressão para a variável resposta índice de estabilidade para o planejamento experimental com emulsificante Tween 80 e saponina.

Fator	Tween 80		Saponina	
	Coefficientes de regressão	p-valor	Coefficientes de regressão	p-valor
Média	0,89	0,0000	0,26	0,00000
X ₁	0,20	0,0001	0,01	0,66402
X ₁ ²	-0,24	0,0002	-0,00	0,92230
X ₂	-0,03	0,2486	0,00	0,96997
X ₂ ²	-0,04	0,2914	-0,00	0,87477
X ₃	0,03	0,3458	0,05	0,00410
X ₃ ²	-0,03	0,4285	-0,01	0,63841
X ₁ * X ₂	0,08	0,0650	-0,02	0,32153
X ₁ * X ₃	0,06	0,1209	0,03	0,10537
X ₂ * X ₃	0,02	0,5900	-0,01	0,38493

Fonte: Própria autoria.

Tabela 11 – Análise de variância da regressão para a variável resposta índice de estabilidade para o planejamento experimental com emulsificantes Tween 80 e saponina.

Emulsificante	Fator	SQ	g.l.	QM	F	p
Tween 80	Regressão	0,5616	2	0,2808	40,28	0,0000
	Resíduo	0,0976	14	0,0070		
	Total	0,6592	16			
	R ²			0,85		
Saponina	Regressão	0,0186	1	0,0186	20,29	0,0004
	Resíduo	0,0138	15	0,0009		
	Total	0,0324	16			
	R ²			0,57		

SQ = Soma de quadrados; g.l. = graus de liberdade; QM= quadrado médio; F = F calculado; p = p-valor; R² = coeficiente de determinação. Fonte: Própria autoria.

Analisando-se os coeficientes de regressão para os resultados da emulsão com o Tween 80 (Tabela 10), pode-se observar que os fatores significativos ($p < 0,05$) foram apenas

concentração de emulsificante linear (X_1) e quadrática (X_1^2). A concentração do PGPR e o número de ciclos não influenciaram na estabilidade das emulsões O/A encapsulando PVBT. Já para os resultados de emulsões produzidas usando-se o emulsificante saponina, o único fator significativo foi o número de ciclos linear (X_3), não se observando efeito da concentração do emulsificante e do PGPR (Tabela 10). Assim, as equações em termos codificados para ambos emulsificantes, utilizando-se somente os termos significativos para o índice de estabilidade (E), foram as seguintes:

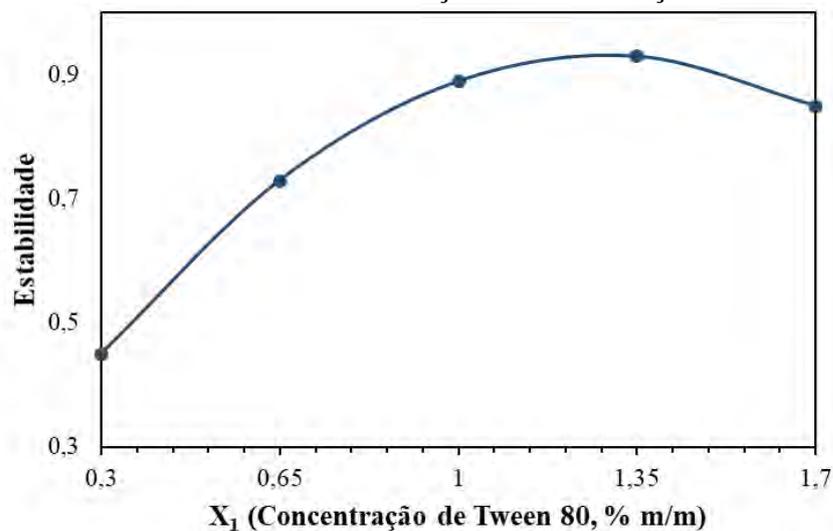
$$E_{Tween80} = 0,89 + 0,20X_1 - 0,24X_1^2 \quad (10)$$

$$E_{saponina} = 0,26 + 0,05X_3 \quad (11)$$

Os resultados da ANOVA para a regressão (Tabela 11) mostraram que a regressão apresentada acima foi significativa ($p < 0,05$). Apesar da regressão ter sido significativa, os valores do coeficiente de determinação (R^2), foram considerados baixos, sendo de 0,85 para o Tween 80 e ainda mais baixo para a saponina (0,57).

O gráfico construído com a equação 10 foi apresentado para ilustrar o efeito das variáveis independentes sobre o índice de estabilidade das emulsões produzidas com Tween 80 (Figura 13). Nesse caso, foi possível observar que a estabilidade apresentou um máximo em torno de uma concentração de Tween 80 de 1,35% m/m da emulsão (Figura 13).

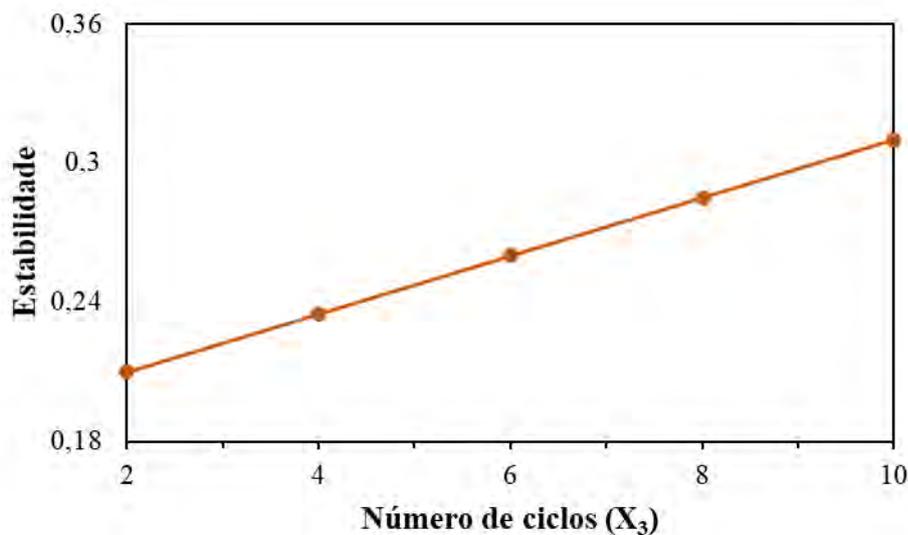
Figura 13 – Índice de estabilidade em função da concentração de Tween 80 (X_1).



Fonte: Própria autoria.

Para o emulsificante saponina, a Equação 11 permitiu a construção de um gráfico do índice de estabilidade em função do número de ciclos (Figura 14). Evidentemente, pode-se observar que o índice de estabilidade aumenta linearmente com o aumento do número de ciclos (Figura 14), não sendo, portanto, possível, a obtenção de um ótimo.

Figura 14 – Índice de estabilidade em função do número de ciclos (X_3) para as emulsões produzidas com saponina.



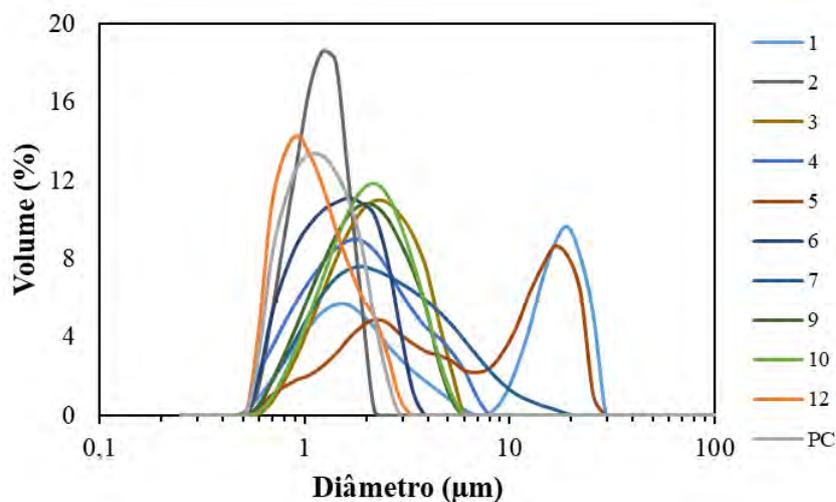
Fonte: Própria autoria.

5.3.2 Diâmetro médio de gota

De modo geral, espera-se produzir emulsões com tamanho de gotas menores possíveis uma vez que a estabilidade é, de modo geral, inversamente proporcional a esse parâmetro (McClements, 2004a). As emulsões produzidas com Tween 80 apresentaram distribuição de tamanho entre 0,5 e 10 μm , com exceção das amostras 1 e 5, que apresentaram uma distribuição bimodal e apresentaram distribuição de tamanho entre 0,5 e 30 μm (Figura 15). Dessa forma, essas duas emulsões apresentaram os maiores diâmetros médios de gota, 4,82 e 5,94 μm , respectivamente, ficando o restante entre 1 e 2 μm (Tabela 8).

Os menores valores de diâmetros médio de gota foram encontrados para os ensaios 12 e os ensaios do ponto central, próximos a 1,10 μm , os quais apresentaram uma distribuição monomodal e deslocada para valores mais baixos de diâmetro médio (Figura 15). O ensaio 12 foi o que apresentou o maior índice de estabilidade, 0,926, seguidos do ponto central com, aproximadamente, 0,890 (Tabela 8).

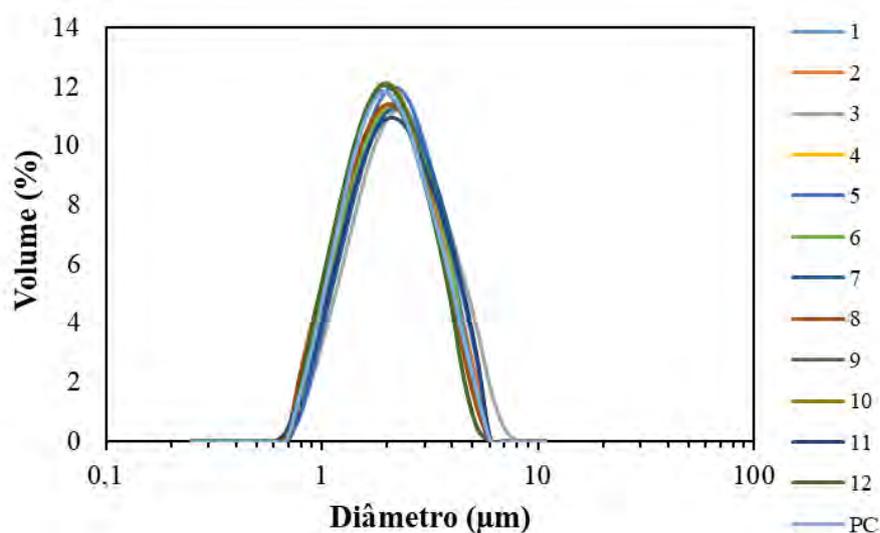
Figura 15 – Distribuição de tamanho de gota das emulsões produzidas com Tween 80 encapsulando própolis vermelha bruta triturada nos ensaios de 1 a 12 e do ponto central (PC) do planejamento experimental.



Fonte: Própria autoria.

As distribuições de tamanho de gota para o planejamento experimental utilizando o emulsificante saponina foram monomodais variando, de modo geral, entre 0,6 e 6 µm (Figura 16). Os diâmetros médios de gota apresentaram pouca variação em função dos tratamentos, permanecendo entre 1,82 (ensaios 10 e 12) e 2,16 µm (ensaio 3) (Tabela 9), ou seja, uma diferença de apenas 0,34 µm.

Figura 16 – Distribuição de tamanho de gota das emulsões produzidas com saponina encapsulando própolis vermelha bruta triturada nos ensaios de 1 a 12 e do ponto central (PC) do planejamento experimental.



Fonte: Própria autoria.

As diferenças observadas nas distribuições de tamanho de gota podem ser comprovadas pela análise estatística da tabela de coeficientes de regressão (Tabela 12) e com a análise de variância (Tabela 13).

Tabela 12 – Tabela dos coeficientes de regressão para a variável resposta diâmetro médio de gota para o planejamento experimental com emulsificante Tween 80 e saponina.

Fator	Tween 80		Saponina	
	Coefficientes de regressão	p-valor	Coefficientes de regressão	p-valor
Média	1,27	0,0007	1,86	0,0000
X ₁	-1,12	0,0001	-0,07	0,0059
X ₁ ²	1,34	0,0004	0,11	0,0036
X ₂	-0,30	0,0864	-0,02	0,4361
X ₂ ²	0,03	0,8695	0,04	0,1594
X ₃	-0,56	0,0072	0,01	0,7310
X ₃ ²	0,38	0,1049	-0,02	0,4438
X ₁ * X ₂	0,86	0,0046	-0,04	0,1937
X ₁ * X ₃	1,08	0,0013	-0,02	0,4200
X ₂ * X ₃	-0,10	0,6392	-0,03	0,2887

Fonte: Própria autoria.

Tabela 13 – Análise de variância da regressão para a variável resposta diâmetro médio de gota para o planejamento experimental com emulsificantes Tween 80 e saponina.

Emulsificante	Fator	SQ	g.l.	QM	F	p
Tween 80	Regressão	27,6181	5	5,5236	23,52	0,0000
	Resíduo	2,5837	11	0,2349		
	Total	30,2018	16			
	R ²	0,91				
Saponina	Regressão	0,0977	2	0,0488	15,98	0,0002
	Resíduo	0,0428	14	0,0031		
	Total	0,1404	16			
	R ²	0,69				

SQ = Soma de quadrados; g.l. = graus de liberdade; QM= quadrado médio; F = F calculado; p = p-valor; R² = coeficiente de determinação. Fonte: Própria autoria.

Para o emulsificante Tween 80, os fatores que foram significativos ($p < 0,05$) e apresentaram influência no diâmetro médio de gota das emulsões foram a concentração do emulsificante, tanto o efeito linear (X_1) quanto o quadrático (X_1^2), o número de ciclos linear (X_3) e as interações entre a concentração de emulsificante e a de PGPR (X_1X_2) e entre a concentração do Tween 80 e o número de ciclos (X_1X_3) (Tabela 12). Para a saponina, os efeitos foram a concentração da saponina, tanto linear (X_1) quanto quadrática (X_1^2) ($p < 0,05$) (Tabela 12). Assim, as equações reduzidas, em termos codificados, que descreve o diâmetro médio estão apresentadas a seguir (Equação 12 e 13).

$$D_{m_{\text{Tween}80}} = 1,27 - 1,12X_1 + 1,34X_1^2 - 0,56X_3 + 0,86X_1X_2 + 1,08X_1X_3 \quad (12)$$

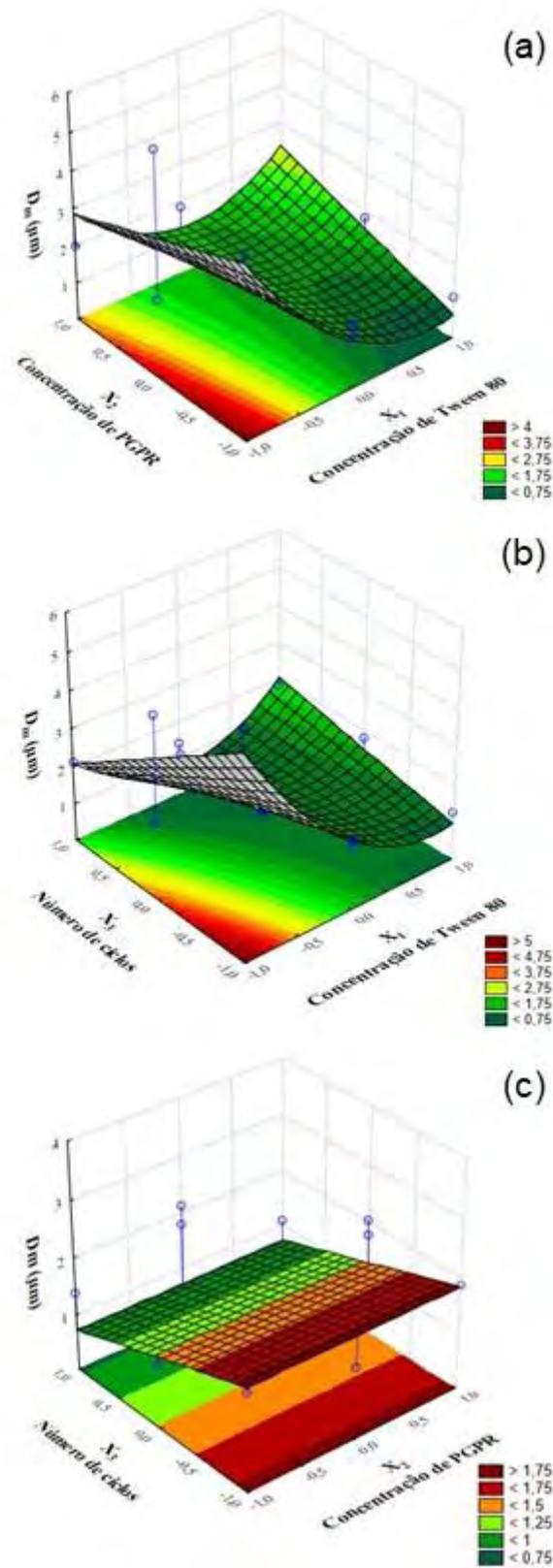
$$D_{m_{\text{saponina}}} = 1,86 - 0,07X_1 + 0,11X_1^2 \quad (13)$$

A ANOVA mostrou que a regressão foi significativa tanto para o Tween 80 quanto para saponina (Tabela 13). O coeficiente de determinação para o Tween 80 foi de 0,91, mostrando uma boa adequação do modelo. Entretanto, para a saponina, o valor de R^2 foi de 0,69, valor considerado baixo, embora significativo.

Com os parâmetros significativos, pode-se elaborar as superfícies de resposta que ilustram o efeito das variáveis independentes sobre o diâmetro médio de gota (Figura 17 e 18). As superfícies para o Tween 80 demonstraram os efeitos da concentração de Tween 80 (X_1), do número de ciclos (X_3) e das interações (X_1X_2 e X_1X_3) (Figura 17).

Para a saponina, observou-se o efeito da concentração deste emulsificante, com uma tendência a diminuir o diâmetro médio com o aumento da concentração até um ponto ótimo, seguido de novo aumento, independentemente do número de ciclos e da concentração de PGPR (Figura 18), fatores não significativos (Tabela 12). Tanto para o Tween 80 (Figura 17a) quanto para a saponina (Figura 18) foi possível observar que há uma diminuição no diâmetro médio de gota até um valor mínimo com o aumento da concentração do emulsificante até uma concentração limite, passando a aumentar após esta. Em baixas concentrações, não há emulsificantes suficiente para cobrir a superfície das gotas de óleo durante a homogeneização, fazendo com que possa haver a colisão e, conseqüentemente, a formação de gotas maiores (Jafari *et al.*, 2008; Yang *et al.*, 2013).

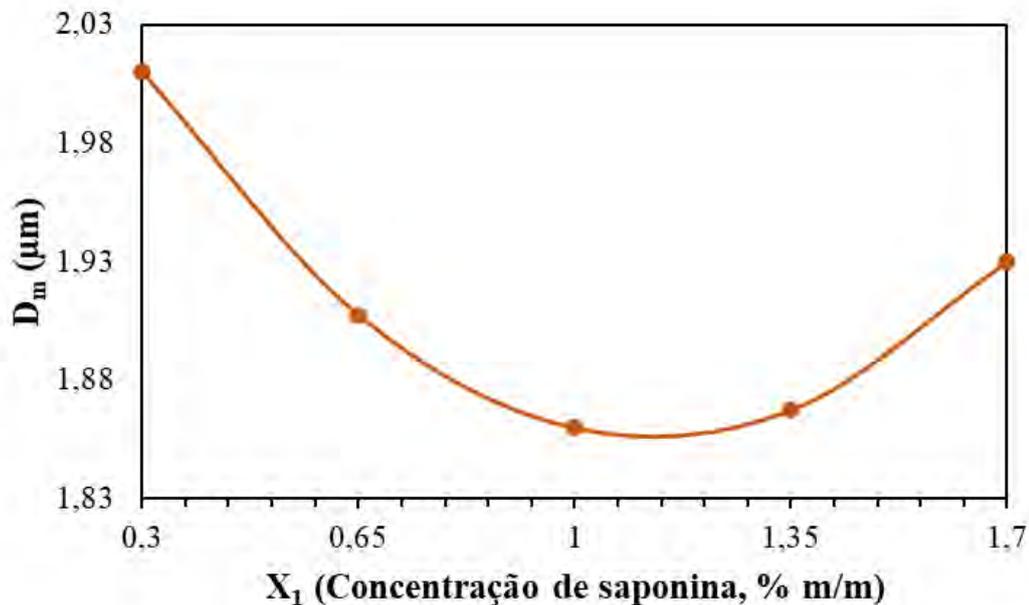
Figura 17 – Superfícies de resposta para o diâmetro médio de gota (D_m) em função da concentração de Tween 80 (X_1) e de PGPR (X_2) (a), da concentração de Tween 80 (X_1) e do número de ciclos (X_3) (b) e do número de ciclos (X_3) e da concentração de PGPR (X_2) (c).



Fonte: Própria autoria.

Com o aumento da concentração do emulsificante há uma quantidade suficiente de moléculas emulsificantes para proteger as gotas de óleo, gerando forças repulsivas entre estas (Jafari *et al.*, 2008; Yang *et al.*, 2013). No entanto, quando a concentração excede este limite, começa a haver um excesso de moléculas emulsificantes na fase contínua, sem estarem presentes na interface óleo-água, o que faz com que haja um aumento da força atrativa entre as gotas de óleo até que supere as forças repulsivas e, conseqüentemente, ocorra a floculação das gotas de óleo (McClements, 2004a).

Figura 18 – Diâmetro médio de gota (D_m) em função da concentração de saponina (X_1).



Fonte: Própria autoria.

5.3.3 Índice *span*

A dispersão do tamanho das partículas em sistemas dispersos está associada à qualidade da mesma. Em princípio, sistemas com ampla dispersão deverá ter menos estabilidade. De modo geral, os valores de *span* das emulsões com Tween 80 e com saponina permaneceram próximos da unidade, com exceção dos ensaios 1, 4 e 5 (5,79, 2,08 e 2,35, respectivamente) das emulsões com Tween80 (Tabela 8). A distribuição bimodal, observada nas emulsões com Tween 80 (ensaios 1 e 5), pode ocorrer quando não há emulsificante suficiente para estabilizar todas as gotas de óleo formadas na emulsão (McClements, 2004a).

A análise estatística dos resultados de *span* (Tabela 14 e 15) mostrou que os fatores que apresentaram efeito nesta variável resposta para o Tween 80 foi a concentração do

emulsificante, efeito linear (X_1) e quadrático (X_1^2), e a interação entre a concentração do emulsificante e a concentração de PGPR (X_1X_2) (Tabela 14).

Tabela 14 – Tabela dos coeficientes de regressão para a variável resposta *span* para o planejamento experimental com emulsificante Tween 80 e saponina.

Fator	Tween 80		Saponina	
	Coefficientes de regressão	p-valor	Coefficientes de regressão	p-valor
Média	1,12	0,0044	1,25	0,0000
X_1	-0,73	0,0066	0,00	0,7903
X_1^2	0,99	0,0073	0,03	0,1605
X_2	-0,42	0,0654	-0,01	0,4322
X_2^2	0,49	0,1063	0,03	0,2173
X_3	-0,02	0,9347	0,02	0,2223
X_3^2	-0,20	0,4644	-0,02	0,3742
$X_1 * X_2$	1,46	0,0010	-0,03	0,1632
$X_1 * X_3$	0,19	0,5160	-0,02	0,3634
$X_2 * X_3$	0,08	0,7692	-0,02	0,4956

Fonte: Própria autoria.

Tabela 15 – Análise de variância da regressão para a variável resposta *span* para o planejamento experimental com emulsificantes Tween 80 e saponina.

Emulsificante	Fator	SQ	g.l.	QM	F	p
Tween 80	Regressão	17,055	3	5,685	15,56	0,0001
	Resíduo	4,749	13	0,365		
	Total	21,803	16			
	R^2				0,78	
Saponina	Regressão	0,0214	9	0,0024	1,290	0,3766
	Resíduo	0,012874	7	0,001839		
	Total	0,034234	16			
	R^2				0,69	

SQ = Soma de quadrados; g.l. = graus de liberdade; QM= quadrado médio; F = F calculado; p = p-valor; R^2 = coeficiente de determinação. Fonte: Própria autoria.

Para o emulsificante saponina, não houve efeito significativo em nenhum dos parâmetros avaliados (Tabela 14), o qual se manteve praticamente constante (*span* médio = $1,27 \pm 0,05 \mu\text{m}$) em todos os ensaios (Figura 16 e Tabela 9).

Para os resultados das emulsões com Tween 80, a equação 14 pode ser obtida em termos codificados.

$$PDI_{\text{Tween}80} = 1,12 - 0,73X_1 + 1,00X_1^2 + 1,46X_1X_2 \quad (14)$$

A regressão para o emulsificante Tween 80 foi significativa ($p < 0,05$) de acordo com a ANOVA (Tabela 15), porém, com um baixo coeficiente de determinação ($R^2 = 0,78$). Para a saponina a regressão não foi significativa ($p > 0,05$), já que o *span* foi constante independente dos fatores analisados. As superfícies de resposta para a variável resposta *span*, apenas para o planejamento com Tween 80, está apresentada na Figura 19.

5.3.4 Parâmetros de produção das melhores emulsões

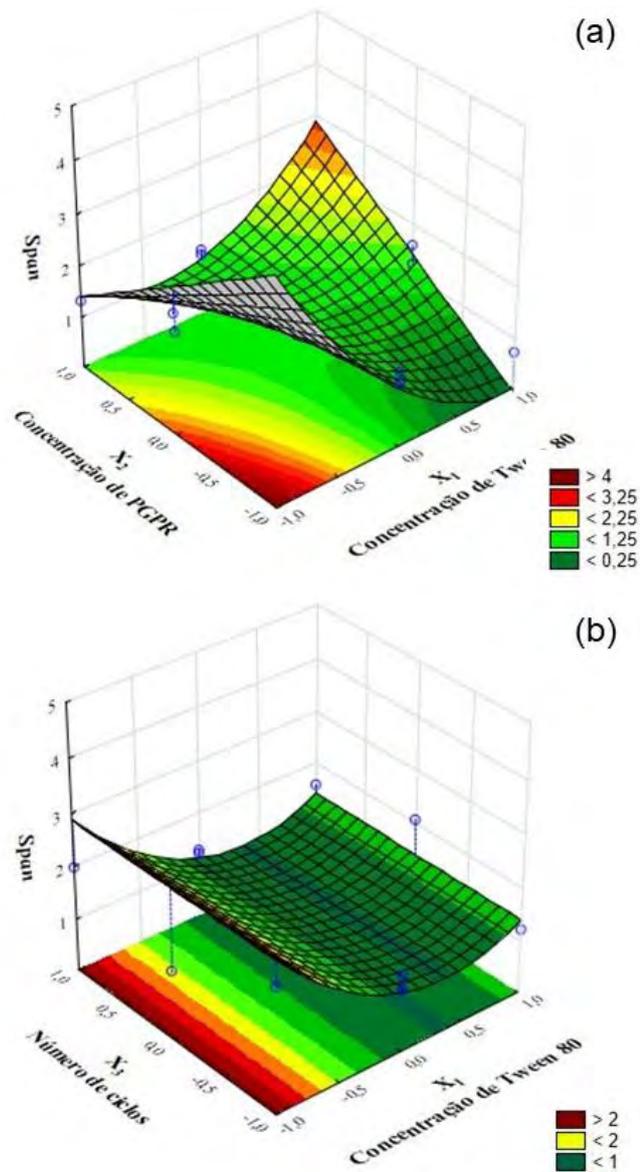
Em função dos resultados discutidos acima, escolheu-se como melhores parâmetros aqueles que podem proporcionar a produção de emulsões com o maior índice de estabilidade, o menor diâmetro médio de gota e o menor valor de *span*. Assim, as melhores condições selecionadas dos parâmetros de produção das emulsões estão apresentadas na Tabela 16.

Tabela 16 – Melhores condições para produção de emulsões encapsulando própolis vermelha bruta triturada utilizando os emulsificantes Tween 80 e saponina.

Emulsificante	X ₁		X ₂		X ₃	
	Cod.	Real (% m/m)	Cod.	Real (% m/m)	Cod.	Real
Tween 80	0,5	1,35	0	0,2	0	6
Saponina	0	1	0	0,2	0	6

Cod. = variável codificada; X₁ = concentração de emulsificante; X₂ = concentração de PGPR; X₃ = número de ciclos. Fonte: Própria autoria.

Figura 19 – Superfícies de resposta para o *span* em função da concentração de Tween 80 (X_1) e de PGPR (X_2) (a) e da concentração de Tween 80 (X_1) e do número de ciclos (X_3) (b).



Fonte: Própria autoria.

Para o Tween 80, a concentração de emulsificante foi um fator significativo para as três variáveis resposta, enquanto que o número de ciclos afetou somente o diâmetro médio. Assim, a concentração de Tween 80 que gerou o ponto máximo do gráfico de índice de estabilidade foi para o valor codificado próximo de 0,5 (Figura 13), sendo a concentração que também gerou os pontos mínimos nas curvas de diâmetro médio (Figura 17) e *span* (Figura 19). Como a concentração de PGPR foi não significativa, escolheu-se trabalhar no ponto central e para o número de ciclos, que foi significativa apenas para o diâmetro médio, apresentou pouco impacto

da diminuição do diâmetro médio de gota, optando-se por trabalhar também no ponto central (Tabela 16).

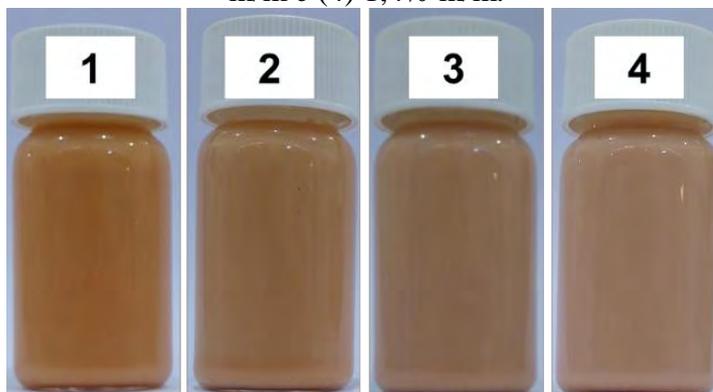
Para a saponina, não foi possível obter um valor máximo na superfície de resposta do índice de estabilidade, sendo o fator significativo apenas o número de ciclos. Porém, o aumento do número de ciclos causou um pequeno incremento na estabilidade. Para o diâmetro médio, a concentração do emulsificante foi significativa, porém, os valores mínimos desta variável resposta estão próximos do ponto central. Para o *span*, nenhuma variável foi significativa e a concentração de PGPR não foi significativa para nenhuma das variáveis resposta. Assim, optou-se pelas condições selecionadas no ponto central do planejamento (Tabela 16).

Após a seleção dos parâmetros de processo, as emulsões foram preparadas nessas condições, em triplicata, e caracterizadas quanto ao índice de estabilidade, diâmetro médio de gota e *span*. Os resultados obtidos experimentalmente para cada resposta serão apresentados na seção 5.5.1 e 5.5.2.

5.4 EMULSÕES PRODUZIDAS COM CASEINATO DE SÓDIO

As emulsões produzidas com caseinato de sódio como emulsificante se apresentaram visualmente homogêneas, com bom aspecto geral (Figura 20), sugerindo que o caseinato de sódio apresentou boa propriedade formadora de emulsão. Além disso, pode-se verificar uma que a coloração das emulsões foi alterada em função do aumento da concentração de caseinato de sódio, tornando-se mais clara.

Figura 20 – Emulsões encapsulando própolis vermelha bruta triturada produzidas com emulsificante caseinato de sódio em concentrações de (1) 0,2% m/m; (2) 0,6% m/m; (3) 1,0% m/m e (4) 1,4% m/m.



Fonte: Própria autoria.

5.4.1 Estabilidade física

O índice de estabilidade da emulsão aumentou ($p < 0,05$) em função da concentração de caseinato de sódio entre 0,2 e 1%, diminuindo em seguida (Tabela 17). O valor máximo atingido foi $0,438 \pm 0,014$ para a concentração de 1,0% m/m. O mesmo comportamento foi observado nas emulsões com Tween 80 (Figura 13), com um aumento no índice de estabilidade com o aumento da concentração até uma determinada concentração de emulsificante, seguido de um decaimento após esta. O excesso de emulsificante não adsorvido na interface óleo-água pode ocasionar um aumento na força atrativa entre as gotas de óleo, superando as repulsivas, podendo desestabilizar a emulsão pela coalescência das gotas de óleo, como explicado anteriormente (McClements, 2004a).

Tabela 17 – Índice de estabilidade das emulsões encapsulando própolis vermelha bruta triturada produzidas com emulsificante caseinato de sódio em diferentes concentrações.

Concentração de caseinato de sódio (%m/m emulsão)	Índice de estabilidade
0,2	$0,256 \pm 0,015^c$
0,6	$0,363 \pm 0,002^b$
1,0	$0,438 \pm 0,014^a$
1,4	$0,383 \pm 0,032^b$

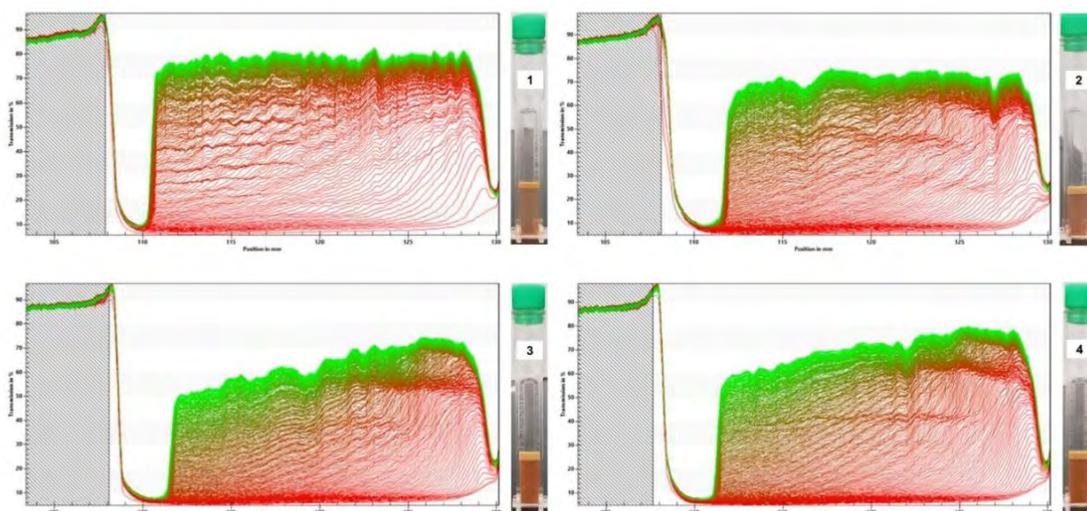
Fonte: Própria autoria.

Os perfis de transmissão de luz através das emulsões se iniciaram próximos do eixo x e foram se distanciando do longo do tempo (Figura 21). Em todas as emulsões, ao final da análise, foi possível observar uma alta transmissão na parte inferior (130 mm) da cubeta e uma baixa transmissão no topo da cubeta (108 mm), o que indica um processo de separação de fases por cremação (*creaming*) (Dammak; Sobral, 2018b, 2021), o que indica que a fase óleo (mais opaca) migrou para o topo e a fase água (mais translúcida), para a base.

O perfil de transmissão da emulsão com 1% m/m de caseinato de sódio se mostrou mais inclinado, no tempo final, além de apresentar valores mais baixos de transmissão que as demais emulsões no perfil final. Por outro lado, as outras emulsões apresentaram perfis mais horizontal ao longo do tempo e maiores valores de transmissão nos tempos finais das análises, comportamento esse mais pronunciado na emulsão com 0,2% de caseinato de sódio. Um perfil mais horizontal e com menor espessura da fase oleosa na parte superior da cubeta indica uma maior separação de fases e uma menor estabilidade (Tessaro *et al.*, 2022). Estes perfis mais

horizontais podem estar relacionados ao processo de cremação de sistema com distribuição de tamanho de gotas com baixa dispersão (Dammak; Sobral, 2021).

Figura 21 – Perfis de transmissão para as emulsões produzidas com caseinato de sódio nas concentrações de (1) 0,2% m/m; (2) 0,6% m/m; (3) 1,0% m/m e (4) 1,4% m/m. Fotografias das respectivas emulsões dentro das cubetas estão em encarte em cada figura.



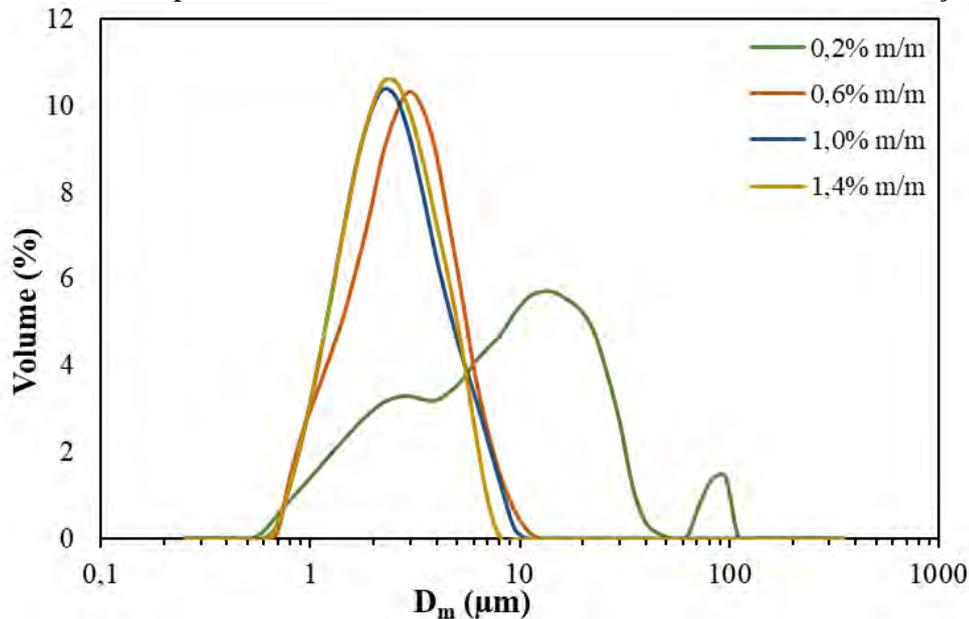
Fonte: Própria autoria.

Apesar da obtenção de uma emulsão com o maior índice de estabilidade (1,0% m/m de caseinato de sódio) seu valor ainda é baixo (0,438), sendo menor do 0,5. Dammak e Sobral (2018b) encontraram a maior taxa de cremação (*creaming*) em emulsões O/A carregadas de hesperidina produzidas com emulsificante caseinato de sódio, quando comparado à outros biopolímeros como emulsificantes. Alizadeh *et al.* (2019) observaram uma menor estabilidade em emulsões produzidas somente com caseinato de sódio quando comparadas com emulsões adicionadas com HPMC ou a mistura dos dois emulsificantes. Este comportamento pode ser atribuído a natureza das proteínas utilizadas como emulsificantes, as quais apresentam a capacidade de adsorver nas interfaces óleo-água e formar uma membrana viscoelástica quando se encontram próximas de seus pontos isoelétricos (pH~4,8). Entretanto, podem não formar emulsões estáveis por causa da repulsão eletrostática entre as gotas de óleo não ser suficiente para evitar a agregação das gotas (McClements, 2004b). Além disso, emulsões estabilizadas por proteínas tendem a serem mais sensíveis à condições como pH, força iônica, temperatura, dentre outras (McClements, 2004b). Outro fator contribuinte para a baixa estabilidade seria o fato de que as proteínas podem se desdobrar durante a homogeneização quando o cisalhamento excede um valor crítico, causando a exposição de grupos apolares e sulfidrilas. Estes grupos podem aumentar a atração entre as gotas, causando agregação destas (McClements, 2004b).

5.4.2 Diâmetro médio de gota, distribuição de tamanho de gota e span

A distribuição do tamanho de gota das emulsões produzidas com caseinato de sódio mostra que, com uma concentração de 0,2% m/m do emulsificante, a distribuição foi multimodal (Figura 22). Distribuições multimodais podem estar relacionadas a uma quantidade não suficiente de emulsificante no meio capaz de estabilizar todas as gotas formadas no processo de formação da emulsão (McClements, 2004a). Esta concentração foi a que gerou a menor estabilidade física entre as emulsões testadas (Tabela 17). As demais emulsões apresentaram distribuição monomodal (Figura 22).

Figura 22 – Distribuição de tamanho de gota das emulsões encapsulando própolis vermelha bruta triturada produzidas com caseinato de sódio em diferentes concentrações.



Fonte: Própria autoria.

Quanto ao diâmetro médio de gota, observou-se que não houve diferença significativa entre as emulsões com concentrações de 0,6, 1,0, e 1,4 % m/m, que permaneceu em torno de 2,3 μm, menor que aquele da emulsão com 0,2% de caseinato de sódio (Tabela 18). Esse mesmo comportamento foi observado para o *span*, cujos valores permaneceram em torno de 1,45, valor abaixo do da emulsão com 0,2% de caseinato de sódio (Tabela 18). Dammak e Sobral (2018b) observaram um diâmetro de médio de gota de 5,2 μm em emulsões O/A carregadas de hesperidina produzidas com caseinato de sódio como emulsificante, além de uma distribuição polidispersa.

Tabela 18 – Diâmetro médio de gota (D_m) e *span* das emulsões encapsulando própolis vermelha bruta triturada produzidas com caseinato de sódio.

Concentração de caseinato de sódio (%m/m emulsão)	D_m (μm)	<i>Span</i>
0,2	$8,50 \pm 1,24^a$	$3,04 \pm 0,17^a$
0,6	$2,51 \pm 0,18^b$	$1,49 \pm 0,34^b$
1,0	$2,23 \pm 0,22^b$	$1,44 \pm 0,34^b$
1,4	$2,17 \pm 0,09^b$	$1,43 \pm 0,01^b$

Fonte: Própria autoria.

5.5 CARACTERIZAÇÃO DAS EMULSÕES SELECIONADAS

Apresentam-se a seguir a discussão de resultados das caracterizações das emulsões produzidas com Tween 80 e saponina selecionadas na seção 5.3, e com caseinato de sódio selecionada na seção 5.4.

5.5.1 Estabilidade física

As emulsões produzidas com Tween 80 (T) e saponina (S) selecionadas pelos planejamentos experimentais foram caracterizadas quanto a seu índice de estabilidade e comparadas com os valores previstos obtidos pelas equações 10, 11, 12, 13 e 14 (Tabela 19). É possível observar que os dados experimentais foram bem próximos daqueles calculados pelos modelos obtidos (Tabela 19).

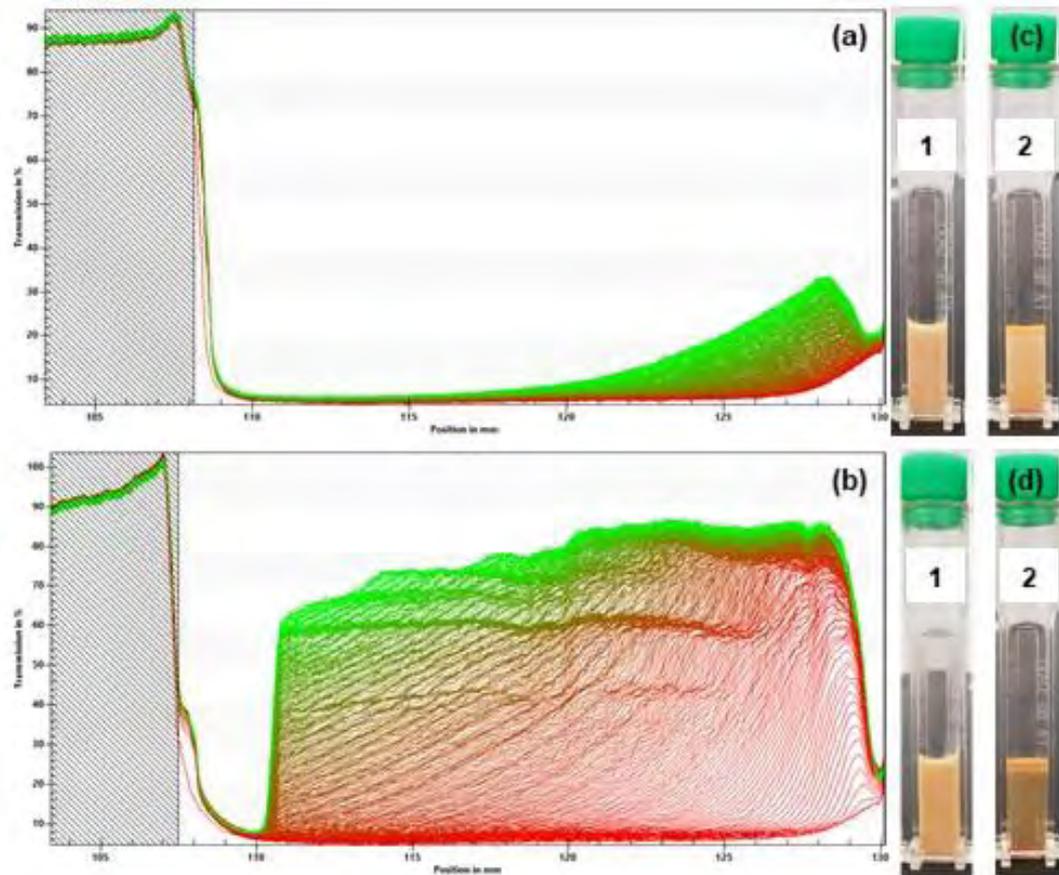
Os perfis de transmissão das emulsões ótimas produzidas com Tween 80 e saponina são apresentados na Figura 23 e para a emulsão produzida com caseinato de sódio (1% m/m) pode ser observado na Figura 21, na seção anterior.

Tabela 19 – Valores previstos pelos modelos e experimentais das variáveis índice de estabilidade, diâmetro médio de gota (D_m) e *span* de emulsões encapsulando própolis vermelha bruta triturada produzidas com Tween 80 e saponina.

Variável resposta	Tween 80			Saponina		
	Previsto	Exp.	Erro (%)	Previsto	Exp.	Erro (%)
Estabilidade	0,93	$0,90 \pm 0,05$	3	0,26	$0,27 \pm 0,01$	4
D_m (μm)	1,05	$1,03 \pm 0,09$	1	1,86	$1,88 \pm 0,01$	-1
<i>Span</i>	1,01	$1,10 \pm 0,10$	-10	1,25	$1,26 \pm 0,03$	-1

Exp. = experimental. Fonte: Própria autoria.

Figura 23 – Perfis de transmissão das emulsões encapsulando própolis vermelha bruta triturada selecionadas produzidas com Tween 80 (a) e saponina (b) e emulsões nas cubetas Tween 80 (c) e saponina (d) antes (1) e após o ensaio (2).



Fonte: Própria autoria.

Sabe-se que as moléculas emulsificantes possuem um papel crítico na estabilidade das gotas de óleo durante a formação de uma emulsão (Dammak; Sobral, 2018b). O perfil de transmissão mais irregular observado e com maior valor de transmitância ao final da análise foi o da emulsão com o emulsificante saponina (Figura 23b), que apresentou o menor índice de estabilidade ($0,27 \pm 0,08$) (Tabela 19). O caseinato de sódio apresentou um perfil de transmissão pouco mais regular (Figura 21), com uma estabilidade intermediária ($0,438 \pm 0,014$) (Tabela 17). A emulsão com Tween 80 apresentou um perfil bastante regular e com baixa transmitância, indicando uma baixa separação de fases e, consequentemente, uma alta estabilidade, comprovada pelo seu alto índice de estabilidade ($0,90 \pm 0,05$) (Tabela 19).

Contrariamente, Weigel *et al.* (2018) observaram uma maior estabilidade física em emulsões O/A carregadas de luteína estabilizadas por saponina do que as estabilizadas por Tween 80 e caseinato de sódio. Os autores atribuíram este comportamento ao fato de uma alta repulsão eletrostática entre as gotas de óleo cobertas pela saponina. Seibert *et al.* (2019)

relataram uma boa estabilidade em nanoemulsões contendo extrato de própolis verde estabilizadas por Tween 80 e Span 80 em estabilidade acelerada.

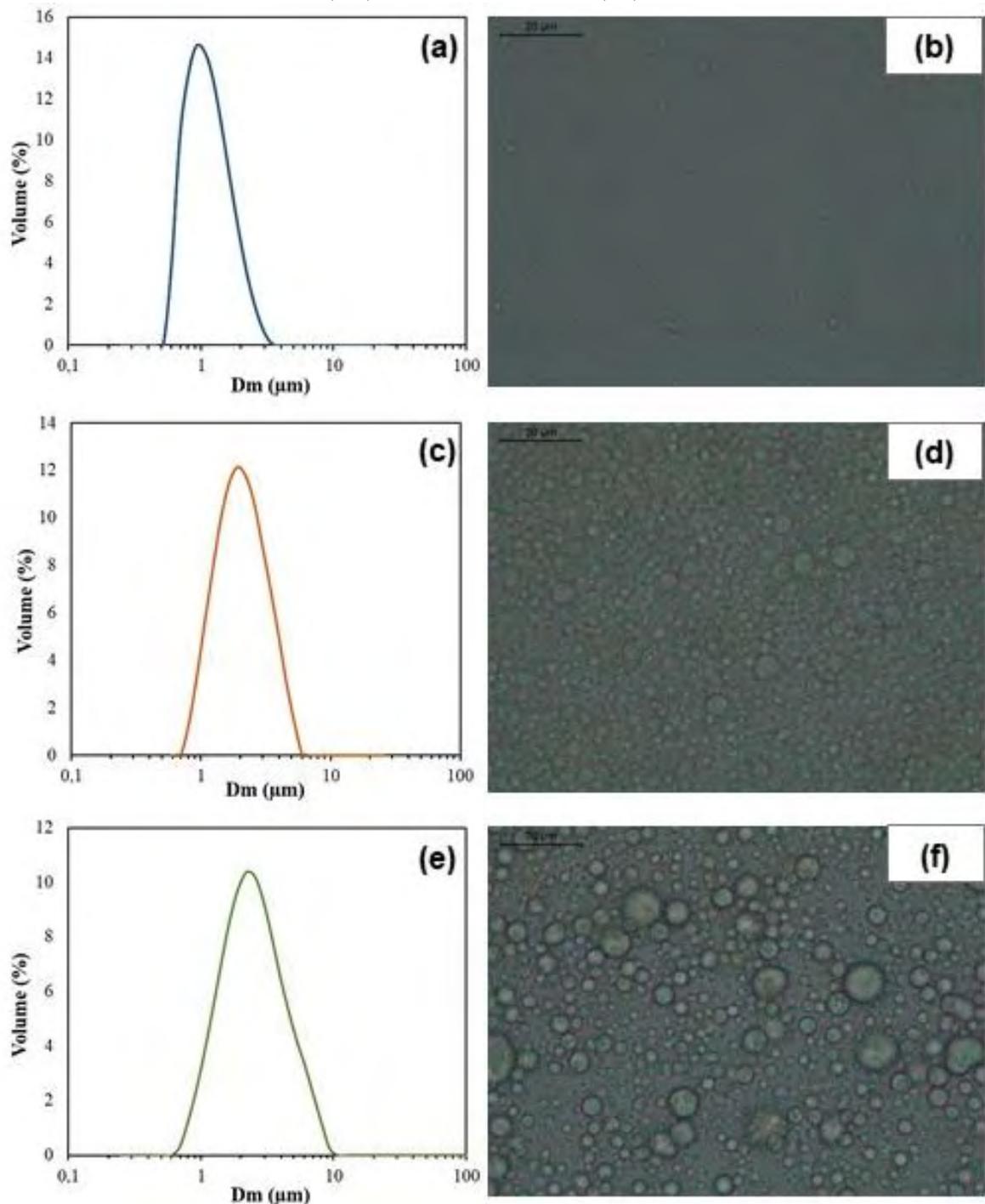
5.5.2 Diâmetro médio de gota

A Figura 24 apresenta as micrografias obtidas por microscopia ótica das emulsões ótimas produzidas com os emulsificantes Tween 80 (T), saponina (S) e caseinato de sódio (C) juntamente com a distribuição do tamanho de gota das emulsões selecionadas. Comparando-se as micrografias observou-se o aumento do tamanho de gota na ordem emulsão T, S e C (Figura 23), o que está de acordo com os valores de diâmetro médio obtidos para as emulsões, sendo de $1,03 \pm 0,09 \mu\text{m}$, $1,88 \pm 0,01 \mu\text{m}$ (Tabela 19) e $2,23 \pm 0,22 \mu\text{m}$ (Tabela 18), respectivamente.

A emulsão T apresentou o menor diâmetro médio de gota e o menor valor de *span*, o que pode ser observado na micrografia (Figura 24a). A emulsão S apresentou um tamanho de gota maior e com maior valor de *span*, observada nos diferentes tamanhos de gota presentes na micrografia (Figura 24b). Já a emulsão C apresentou os maiores tamanhos de gota e maior *span* (Figura 24c). Emulsões com tamanhos de gota menores apresentam uma menor velocidade de separação de fases e, conseqüentemente, maior estabilidade (McClements, 2004a). A emulsão T, com menor tamanho de gota, foi a que apresentou o maior índice de estabilidade (Tabela 19). Entretanto, a emulsão S apresentou menor tamanho de gota do que a C, porém, foi mais instável. Isso mostra que a saponina pode não ter sido capaz de cobrir toda a superfície das gotas de óleo, podendo gerar floculação e, conseqüentemente, desestabilização. Tal fato pode ser observado nos perfis de transmissão da emulsão S (Figura 23).

Weigel *et al.* (2018) comparou emulsões O/A carregadas de luteína estabilizadas por caseinato de sódio, saponina e Tween 80 e observou o maior tamanho de gota para a emulsão produzida com caseinato de sódio ($d_{3,2} = 0,60 \mu\text{m}$), seguido do Tween 80 ($d_{3,2} = 0,25 \mu\text{m}$) e da saponina ($d_{3,2} = 0,22 \mu\text{m}$), sendo atribuído ao fato de que o caseinato de sódio não foi capaz de cobrir toda a superfície das gotas de óleo, causando agregação e floculação e, conseqüentemente, maior diâmetro médio de gota. Zhu *et al.* (2019) observaram valores próximos de diâmetro médio de gota em nanoemulsões estabilizadas por saponina de Quillaja e Tween 80, sendo estes valores 220 nm e 196 nm, respectivamente. Apesar de um maior tamanho de gota, a saponina foi mais eficiente em evitar a agregação das gotas durante 30 dias de armazenamento.

Figura 24 – Distribuição de tamanho de gota e micrografias ópticas das emulsões encapsulando própolis vermelha bruta triturada produzidas com Tween 80 (a,b), saponina (c,d) e caseinato de sódio (e,f).



Fonte: Própria autoria.

Monteil *et al.* (2022) obtiveram emulsões carregadas de extrato de própolis estabilizadas com goma arábica com diâmetros médios entre 0,5 e 2 µm. Seibert *et al.* (2019) produziram nanoemulsões contendo extrato de própolis verde estabilizadas por Tween 80 e Span 80 com diâmetros médio de gota de, aproximadamente, 50 µm e índice de polidispersão de 0,3. Os

valores mais altos de diâmetro de gota encontrados neste estudo podem estar relacionados a presença da própolis vermelha em sua forma bruta, a qual tem em sua composição a presença de resinas e ceras (Anjum *et al.*, 2019), as quais podem contribuir para o maior tamanho de gotas das emulsões. Alizadeh *et al.* (2019) observou um aumento no diâmetro médio de gota de emulsões O/A estabilizadas pela combinação entre caseinato de sódio e hidroxipropilmetilcelulose adicionadas de cera de abelha, porém, a estabilidade das emulsões diminuiu. Tavernier *et al.* (2018) também observaram este mesmo comportamento em emulsões O/A estabilizadas por isolado proteico de soja adicionadas de cera de Candelila.

5.5.3 Parâmetros de cor

Todas as emulsões se apresentaram homogêneas após seu processamento (Figura 25). Pode-se observar que houve uma sutil diferença de coloração entre as emulsões dependendo do emulsificante empregado (Figura 25).

Figura 25 – Emulsões encapsulando própolis vermelha bruta triturada produzidas com os emulsificantes Tween 80 (T), saponina (S) e caseinato de sódio (C).



Fonte: Própria autoria.

A luminosidade (L^*), que varia de preto (0) ao branco (100), apresentou valores variando de cerca de 60 (C) até cerca de 72 (T), indicado que a emulsão T era mais clara, seguida da emulsão S (Tabela 20).

Tabela 20 – Parâmetros de cor (L^* , a^* , b^*), ângulo Hue (H^*) e croma (C^*) das emulsões encapsulando própolis vermelha bruta triturada produzidas com os emulsificantes Tween 80 (T), saponina (S) e caseinato de sódio (C).

Emulsão	L^*	a^*	b^*	H^*	C^*
T	$72,2 \pm 0,7^a$	$13,8 \pm 0,3^c$	$29,3 \pm 0,1^c$	$64,8 \pm 0,4^b$	$32,4 \pm 0,3^c$
S	$69,4 \pm 0,3^b$	$14,5 \pm 0,1^b$	$35,0 \pm 0,2^a$	$67,4 \pm 0,0^a$	$38,0 \pm 0,2^a$
C	$60,4 \pm 0,3^c$	$16,7 \pm 0,2^a$	$31,2 \pm 0,0^b$	$61,9 \pm 0,2^c$	$35,4 \pm 0,1^b$

Fonte: Própria autoria.

Quanto ao parâmetro a^* , o qual varia de verde (-) ao vermelho (+), os valores indicaram que as emulsões apresentaram uma coloração avermelhada (Tabela 20). A tonalidade avermelhada foi mais intensa na emulsão C ($16,7 \pm 0,2$), seguida da S ($14,5 \pm 0,1$) e da T ($13,8 \pm 0,3$). Em relação ao parâmetro b^* , que varia do azul (-) ao amarelo (+), os resultados indicaram uma coloração mais amarelada das emulsões (Tabela 20). O maior parâmetro b^* foi observado para a emulsão S ($34,98 \pm 0,17$) e diminuindo significativamente para as emulsões C ($31,2 \pm 0,0$) e T ($29,3 \pm 0,1$). A coloração vermelho-amarelada das emulsões está relacionada à cor da PVBT (Seção 5.1.1).

O ângulo Hue apresentou valores próximos à coloração mais amarelada, confirmando a coloração das emulsões, sendo o maior ângulo para a emulsão S, diminuindo significativamente para a emulsão T e C (Tabela 20). O croma (C^*) está relacionado à saturação da cor, quanto maior seu valor mais perceptível será ao olho humano. O valor calculado foi de $32,4 \pm 0,3$ para a emulsão T, aumentando significativamente para $35,4 \pm 0,1$ (C) e para $38,0 \pm 0,2$ (S). O uso dos diferentes emulsificantes afetou significativamente nos parâmetros de cor das emulsões carregadas de PVBT.

5.5.4 pH

O pH da emulsão C foi maior (6,0) que os das outras emulsões (4,9), muito provavelmente devido ao efeito tampão das proteínas (Tabela 21). Tessaro (2021) observou um aumento no pH de 5,1 em emulsões A/O para 5,6 para emulsões duplas A/O/A produzidas com a emulsão A/O anterior, e utilizando o caseinato de sódio como emulsificante na emulsão dupla.

Tabela 21 – pH das emulsões encapsulando própolis vermelha bruta triturada produzidas com emulsificantes Tween 80 (T), saponina (S) e caseinato de sódio (C).

Emulsão	pH
T	4,9 ± 0,1 ^b
S	4,8 ± 0,1 ^b
C	6,0 ± 0,2 ^a

Fonte: Própria autoria.

Ebrahimi *et al.* (2013) encontraram um valor de pH variando entre 5,0 e 5,5 em nanoemulsões O/A carregadas com ácido ferúlico produzidas com Tween 80 e lecitina de ovo. Trabalhando com emulsões O/A contendo extrato de própolis, Gonçalves, Srebernich e Souza (2011) observaram um pH de aproximadamente 5,1. Seibert *et al.* (2019) relataram um pH de 5,76 em nanoemulsões de extrato de própolis verde estabilizadas por Tween 80 e Span 80.

5.5.5 Reologia

A emulsão T apresentou um comportamento newtoniano, ou seja, um comportamento linear entre a tensão de cisalhamento e a taxa de cisalhamento, entretanto, as emulsões S e C apresentaram uma tensão limite de escoamento (*yield stress*), que corresponde à tensão inicial necessária para se iniciar o escoamento da emulsão, sendo este comportamento característico de plásticos de Bingham (Figura 26).

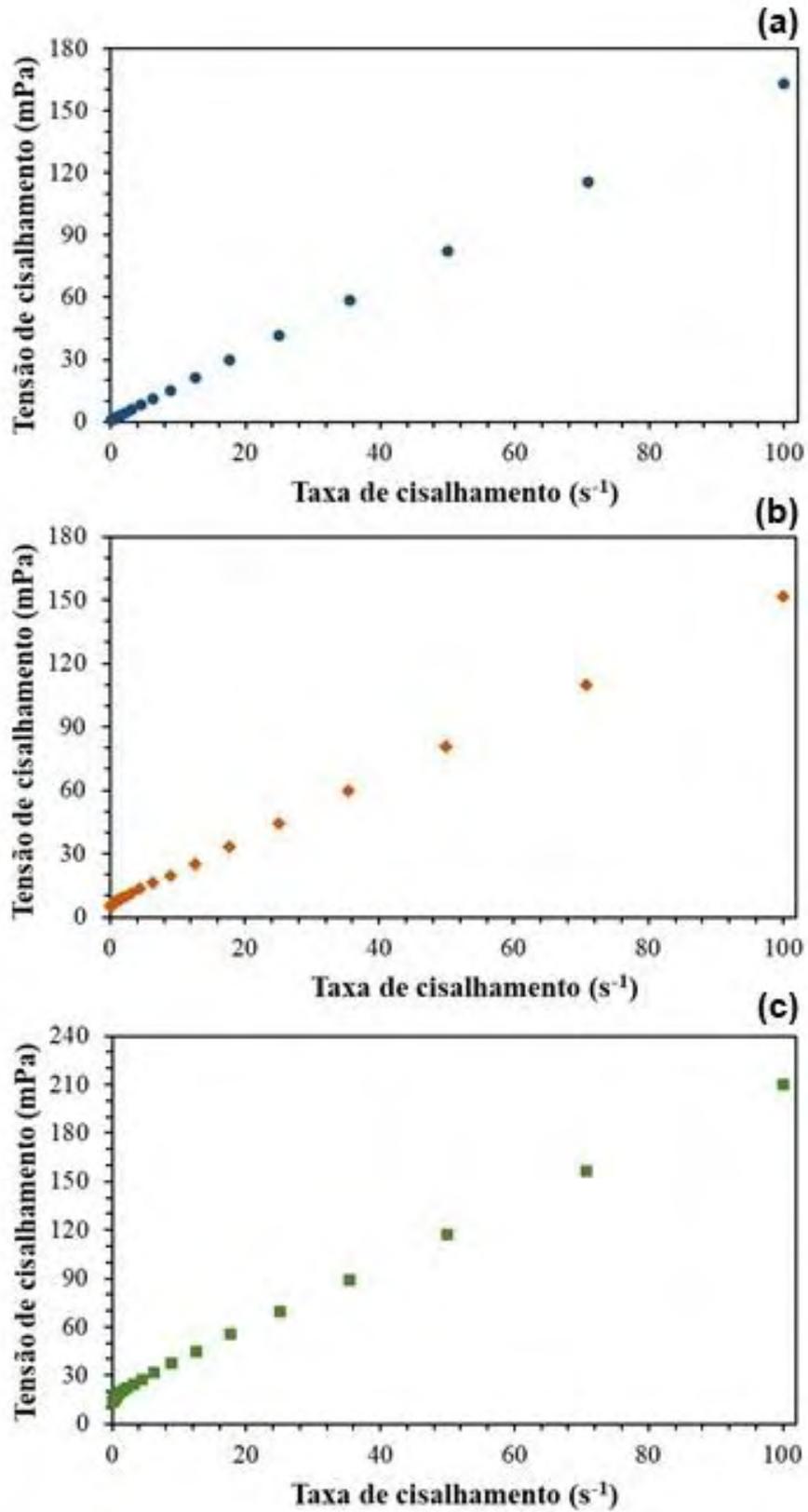
No geral, as emulsões apresentaram um valor baixo de viscosidade, próximos à viscosidade da água (~1 mPa.s à 25°C). A emulsão ligeiramente mais viscosa foi a C, que também apresentou o maior valor de tensão limite de escoamento (Tabela 22).

Tabela 22 – Viscosidade (μ) e tensão limite de escoamento (τ_0) das emulsões encapsulando própolis vermelha bruta triturada produzidas com Tween 80 (T), saponina (S) e caseinato de sódio (C).

Emulsão	μ (mPa.s)	τ_0 (mPa)
T	1,64 ± 0,06 ^b	0 ^c
S	1,47 ± 0,02 ^c	6,26 ± 1,55 ^b
C	1,96 ± 0,02 ^a	17,20 ± 2,73 ^a

Fonte: Própria autoria.

Figura 26 – Curva de fluxo para as emulsões encapsulando própolis vermelha bruta triturada produzidas com Tween 80 (a), saponina (b) e caseinato de sódio (c).



Fonte: Própria autoria.

5.5.6 Atividade antioxidante

A concentração de própolis vermelha, fonte dos componentes ativos responsáveis pela atividade antioxidante das emulsões, foi a mesma em todas as emulsões (3,0 % m/m da emulsão) independente do emulsificante utilizado. Logo, era de se esperar valores próximos de atividade antioxidante entre as emulsões, o que foi observado no geral (Tabela 23).

Tabela 23 – Compostos fenólicos totais e atividade antioxidante pelos métodos de ABTS^{•+} (2,2'-azino-bis(3-etilbenzoatiazolin)-6-ácido sulfônico) e FRAP (método de redução do íon férrico) das emulsões (E) encapsulando própolis vermelha bruta triturada produzidas com Tween 80 (T), saponina (S) e caseinato de sódio (C).

E	Compostos Fenólicos totais (mg AGE/g)	ABTS ^{•+}		FRAP	
		(mg TE/g)	(mg TE/g)	(mg FeSO ₄ /g)	(mg FeSO ₄ /g)
T	16,3 ± 0,4 ^a	39,3 ± 2,8 ^a	22,0 ± 0,4 ^a	47,6 ± 0,9 ^a	47,6 ± 0,9 ^a
S	16,1 ± 1,0 ^a	40,4 ± 1,4 ^a	18,0 ± 1,0 ^b	40,0 ± 2,5 ^b	40,0 ± 2,5 ^b
C	15,0 ± 1,1 ^a	39,2 ± 2,0 ^a	17,7 ± 0,9 ^b	37,0 ± 1,2 ^b	37,0 ± 1,2 ^b

AGE = ácido gálico equivalente; TE = Trolox equivalente. Fonte: Própria autoria.

O teor de compostos fenólicos totais ficou próximo ($p > 0,05$) de 16 mg de AGE/g de emulsão para as três emulsões (Tabela 23). Trabalhando com extrato etanólico de própolis vermelha, Righi *et al.* (2011) determinaram 416,31 mg de ácido p-cumárico/g de extrato e Hatano *et al.* (2012) observaram um valor de 433,8 mg AGE/g de extrato, que, comparando-se à concentração utilizada nas emulsões de 3% de PVBT, correspondem a 12,5 e 13 mg AGE/g de emulsão, respectivamente (Tabela 23).

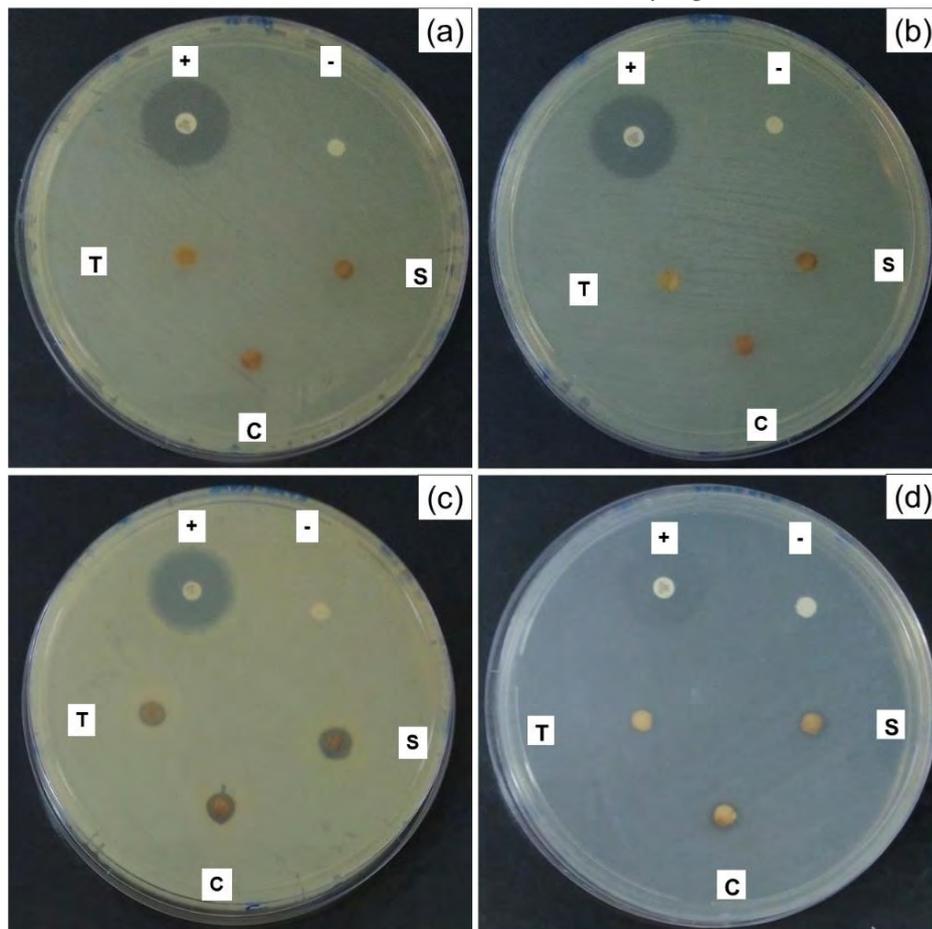
A composição da própolis vermelha, com compostos fenólicos, flavonoides, isoflavonoides e chalconas, é a responsável pela sua atividade antioxidante (Righi *et al.*, 2011; Rufatto *et al.*, 2017). As atividades antioxidantes das emulsões, determinadas com método ABTS, ficaram em ($p > 0,05$) torno de 39,6 mg TE/g de emulsão (Tabela 23), mas variaram ($p < 0,05$) de 17,7 (C) a 22,0 (T) mg de TE/g de emulsão ou de 37,0 (C) a 47,6 (T) mg de FeSO₄/g para o método FRAP (Tabela 23).

Hatano *et al.* (2012) observaram uma porcentagem de 90,9% de capacidade de redução do radical ABTS^{•+} e 89,2 mg/mL de extrato etanólico de própolis vermelha pelo método FRAP. Já Machado *et al.* (2016) observaram uma variação de 82% a 98% de capacidade de redução do radical ABTS^{•+} e Reyes, Landgraf e Sobral (2021) um valor de 50%. Entretanto, não se encontrou dados com emulsões encapsulando extrato de própolis.

5.5.7 Atividade antimicrobiana

Os resultados das análises da atividade antimicrobiana, realizadas por teste de difusão em disco, permitiram observar que houve efeito antimicrobiano contra as bactérias Gram (+), *L. monocytogenes* (Figura 27d) e *S. aureus* (Figura 27c).

Figura 27 – Atividade antimicrobiana por teste de difusão em disco das emulsões encapsulando própolis vermelha triturada produzidas com Tween 80 (T), saponina (S) e caseinato de sódio (C), controle positivo (+) e negativo (-) para as bactérias *E. coli* (a), *Salmonella* (b), *S. aureus* (c) e *L. monocytogenes* (d).



Fonte: Própria autoria.

Esses resultados (Figura 27) estão de acordo com a literatura, pois observa-se que a própolis tem se mostrado mais efetiva contra bactérias Gram-positivas e com efeitos limitados contra bactérias Gram-negativas (Anjum *et al.*, 2019; Seibert *et al.*, 2019). Esse mesmo comportamento foi observado por Reyes, Landgraf e Sobral (2021), que trabalhando com teste de difusão em disco com extrato etanólico de própolis vermelha, observaram halos de inibição para *S. aureus* e *L. monocytogenes*.

Vários estudos têm demonstrado o efeito da própolis vermelha contra a bactéria *S. aureus* (Bispo Júnior *et al.*, 2012; Cabral *et al.*, 2009; Oldoni *et al.*, 2011; Rufatto *et al.*, 2018). Contrariamente a este estudo, alguns autores já relataram a atividade antimicrobiana para as bactérias *E. coli* (Regueira Neto *et al.*, 2017; Righi *et al.*, 2011) e *Salmonella sp.* (Righi *et al.*, 2011). A atividade antimicrobiana da própolis está relacionada a sua composição a qual apresenta uma alta quantidade de compostos fenólicos (Cabral *et al.*, 2009; Regueira Neto *et al.*, 2017). No entanto, sua atividade antimicrobiana pode variar de acordo com a origem da própolis (Lopez *et al.*, 2015).

Analisando-se os resultados das medidas dos halos de inibição, observou-se que não houve diferença significativa entre as emulsões para nenhuma das bactérias Gram-positivas (Tabela 24).

Tabela 24 – Halo de inibição do controle positivo (cloranfenicol) e das emulsões encapsulando própolis vermelha bruta triturada produzidas com Tween 80 (T), saponina (S) e caseinato de sódio (C).

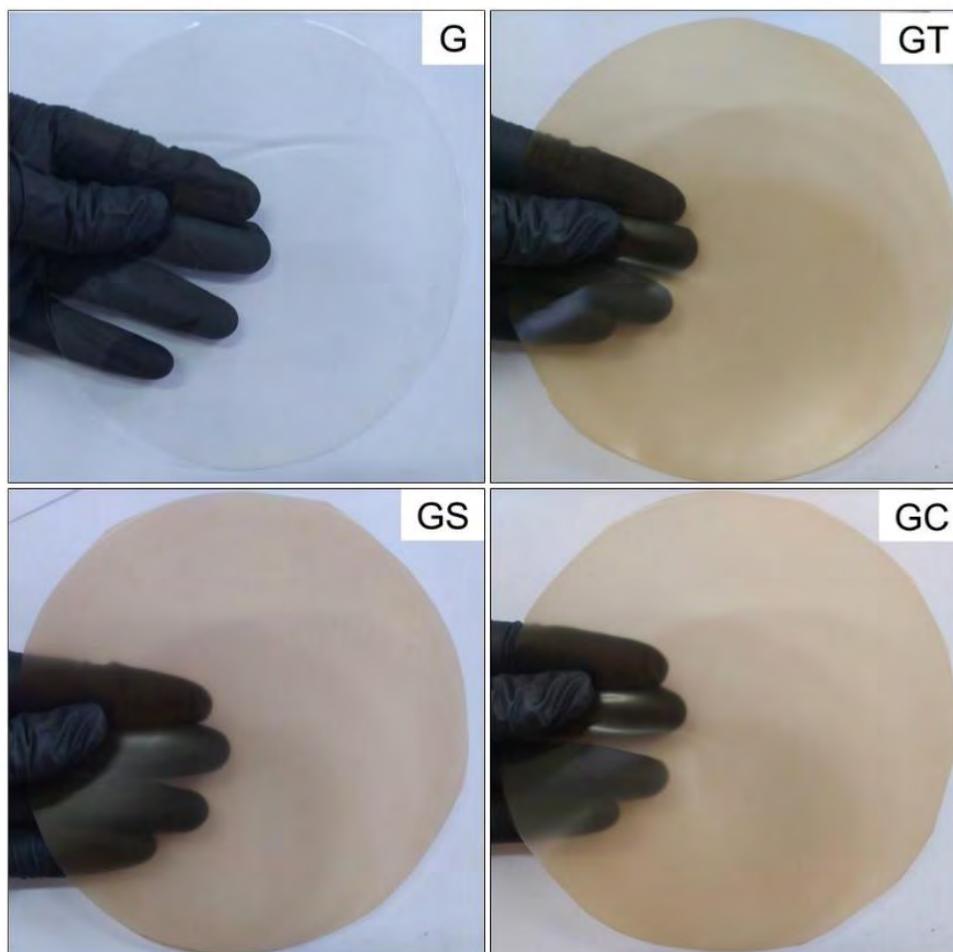
Bactérias	Halo de inibição (cm)			
	Cloranfenicol	T	S	C
<i>E. coli</i> (-)		0	0	0
<i>Sammonella sp.</i> (-)		0	0	0
<i>S. aureus</i> (+)	3,1 ± 0,1 ^a	0,7 ± 0,1 ^b	0,9 ± 0,2 ^b	0,9 ± 0,1 ^b
<i>L. monocytogenes</i> (+)		0,8 ± 0,2 ^b	0,8 ± 0,2 ^b	0,9 ± 0,1 ^b

Fonte: Própria autoria.

5.6 CARACTERIZAÇÃO DOS FILMES ATIVOS À BASE DE GELATINA

Foram caracterizados filmes à base de gelatina incorporados com as emulsões selecionadas encapsulando PVBT produzidas com Tween80 (GT), saponina (GS) e caseinato de sódio (GC) e filmes de gelatina sem emulsão (G), como controle. Visualmente, os filmes à base de gelatina adicionados de emulsões apresentaram-se homogêneos, transparentes e com coloração similar à das respectivas emulsões, diferentemente do filme controle, que foi incolor (Figura 28). Apesar da presença de gotas dispersas na matriz de gelatina, os filmes incorporados com as emulsões apresentaram alta translucidez.

Figura 28 – Filmes ativos à base de gelatina controle (G) e incorporados de emulsão encapsulando própolis vermelha bruta triturada produzida com Tween 80 (GT), saponina (GS) e caseinato de sódio (GC).



Fonte: Própria autoria

5.6.1 Espessura

Não se observou diferença significativa ($p > 0,05$) entre os valores de espessura dos filmes, que permaneceu em torno de 0,092 mm (Tabela 25). Esses resultados demonstram que o controle de massa de FFF no suporte foi efetivo no controle da espessura para todos os filmes ativos. Isso é importante por que a espessura pode influenciar as propriedades físicas do material, mascarando o efeito dos tratamentos estudados (Tessaro *et al.*, 2021).

Tabela 25 – Espessura e umidade de filmes ativos à base de gelatina controle (G) e incorporados de emulsão encapsulando própolis vermelha bruta triturada produzida com Tween 80 (GT), saponina (GS) e caseinato de sódio (GC).

Tratamento	Espessura (mm)	Umidade (%)
G	0,092 ± 0,006 ^a	13,8 ± 0,4 ^b
GT	0,093 ± 0,005 ^a	14,5 ± 0,3 ^{a,b}
GS	0,094 ± 0,002 ^a	14,8 ± 0,5 ^a
GC	0,089 ± 0,003 ^a	12,8 ± 0,1 ^c

Fonte: Própria autoria.

5.6.2 Umidade

A umidade do material pode influenciar algumas propriedades físicas, sobretudo aquelas dependentes da mobilidade molecular do biopolímero (Sobral *et al.*, 2001). Os filmes GT e GS apresentaram os maiores valores de umidade (14,7%), seguidos de perto por G (13,8%) e GC, com valores menores (12,8%) (Tabela 25). Essa variação pode ser considerada como pequena, não sendo suficiente para justificar possíveis diferenças encontradas nas propriedades (Pérez-Córdoba; Sobral, 2017).

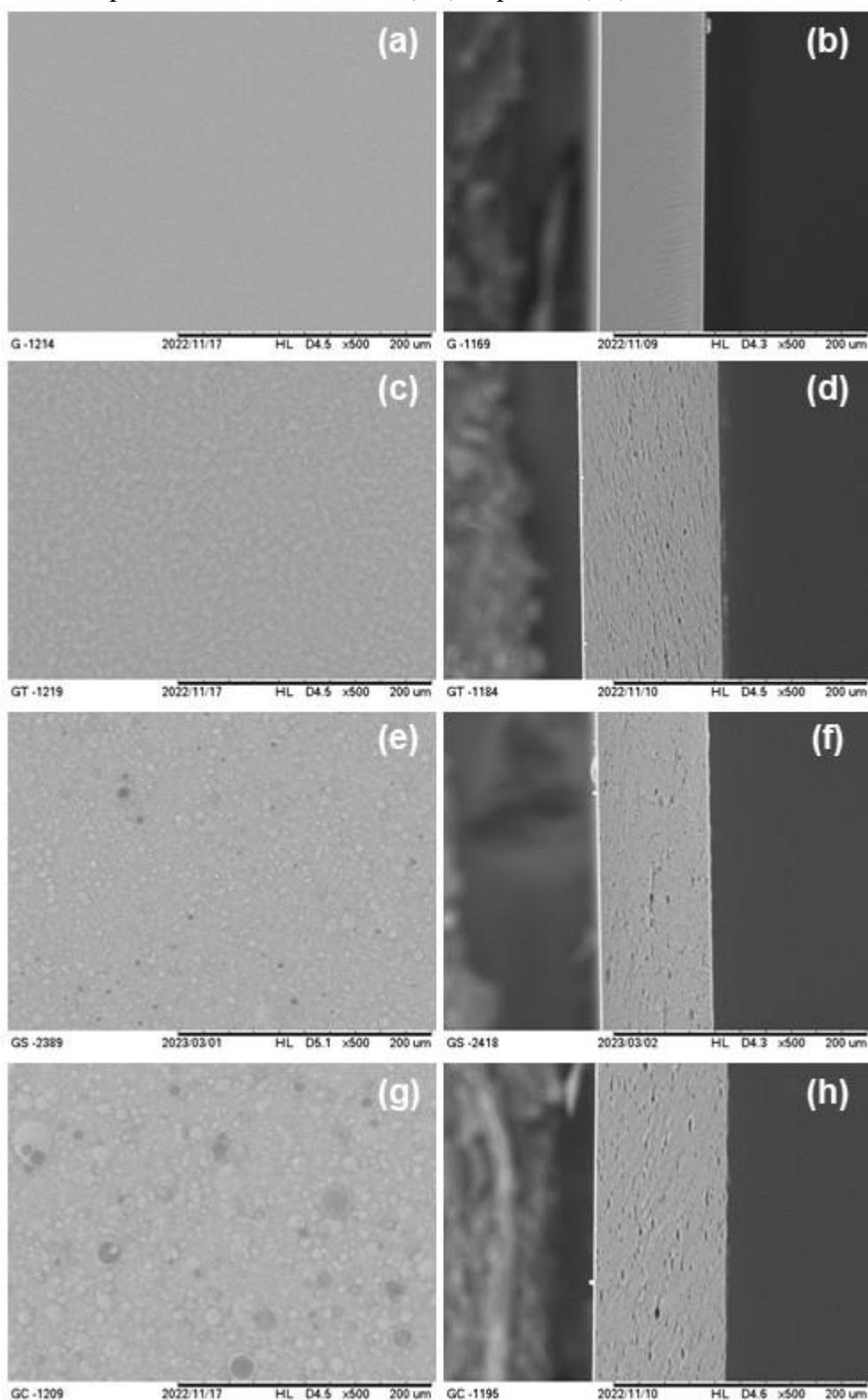
Tessaro *et al.* (2021) não observou efeito da adição de emulsão dupla A/O/A em filmes à base de gelatina. Ji *et al.* (2021) observaram uma queda na umidade dos filmes de gelatina de peixe quando adicionados de nanoemulsões. Já Pérez-Córdoba e Sobral (2017) observaram uma queda na umidade de filmes de gelatina quando adicionado de compostos ativos emulsificados, porém, a diferença não era suficiente para justificar eventuais efeitos nas propriedades dos filmes.

5.6.3 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

O filme controle (G) apresentou uma superfície homogênea e lisa (Figura 29). E, os filmes incorporados de emulsões apresentaram uma superfície mais irregular, muito possivelmente pelo arraste de gotas de óleo pelo vapor de água durante a secagem.

Na superfície dos filmes incorporados de emulsão é possível observar algumas estruturas presentes (Figura 29). Aparentemente, essas estruturas tendem a aumentar de tamanho na ordem GT, GS e GC, corroborando com o tamanho de gotas das emulsões apresentados na seção 5.5.2.

Figura 29 – Micrografias da superfície (a, c, e, g) da seção transversal (b, d, f, h) de filmes à base de gelatina controle (a,b) e incorporados de emulsão encapsulando própolis vermelha bruta triturada produzida com Tween 80 (c,d), saponina (e,f) e caseinato de sódio (g,h).



Fonte: Própria autoria.

Nas micrografias de seção transversal, fica mais clara a presença das emulsões. Enquanto o filme controle apresenta uma estrutura lisa e uniforme, a adição das emulsões, nos três casos, causou uma estrutura porosa na microestrutura interna da matriz de gelatina (Figura 29), independentemente dos tipos de emulsificantes (T, S e C). A formação de poros na matriz biopolimérica pode ser explicada pela presença das gotas de óleo da emulsão adicionada (Bonilla *et al.*, 2018).

De acordo com Atarés e Chiralt (2016), a microestrutura dos filmes com adição de óleos é influenciada pelo arranjo estrutural dos componentes na solução formadora de filme, além do comportamento destes durante o processo de secagem, no qual pode ocorrer processos de desestabilização como floculação e coalescência. Tessaro *et al.* (2021) observaram uma microestrutura interna porosa em filmes à base de gelatina contendo emulsões duplas (A/O/A) e migração de óleo na superfície do filme. Já Sun *et al.* (2021) relataram uma não alteração na morfologia dos filmes de gelatina adicionados de nanoemulsões O/A, porém apresentaram uma estrutura de camadas internas. Ji *et al.* (2021) observaram uma superfície mais irregular de filmes de gelatina adicionados de nanoemulsões e algumas fraturas internas na matriz biopolimérica.

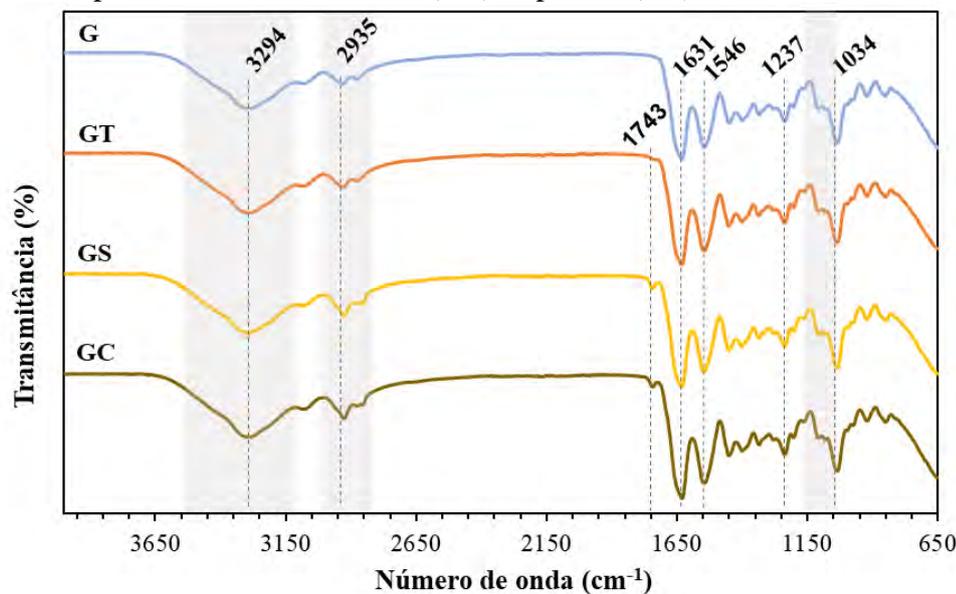
5.6.4 Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)

Os espectros obtidos por espectroscopia por transformada de Fourier para o filme controle e filmes ativos estão apresentados na Figura 30. O filme controle apresentou bandas entre 3500 e 3000 cm^{-1} , que corresponde ao estiramento de ligações amida e hidroxila (-OH), em 2935 cm^{-1} correspondente a ligações C-H, em 1631 cm^{-1} correspondente ao grupo carbonila (C=O), em 1546 cm^{-1} correspondente a amida I (N-H), em 1237 cm^{-1} correspondente a C-N (Bonilla *et al.*, 2018; Ji *et al.*, 2021; Pérez-Córdoba; Sobral, 2017) e a banda em 1034 cm^{-1} é correspondente a interação entre o plastificante glicerol e as moléculas de gelatina por meio de interações de hidrogênio (Bonilla *et al.*, 2018; Ji *et al.*, 2021).

Nos filmes adicionados de emulsão GT, GS e GC houve o aparecimento de uma banda fraca em 1743 cm^{-1} (Figura 30). Esta banda corresponde ao estiramento de grupos carbonila (C=O) de ésteres de ácido graxo, que estão presentes no óleo de soja, e foi observado por outros autores quando emulsões foram incorporadas em filmes biopoliméricos (Pérez-Córdoba; Sobral, 2017; Tessaro *et al.*, 2021; Zhao *et al.*, 2023). Comparando-se entre os emulsificantes, não foi possível observar uma alteração de comportamento nos espectros FTIR com a mudança

dos emulsificantes. Assim, pode-se sugerir que a incorporação das emulsões nos filmes de gelatina não implicou necessariamente em eventuais alterações químicas do biopolímero.

Figura 30 – Espectros FTIR (infravermelho por transformada de Fourier) para os filmes à base de gelatina controle (G) e incorporados de emulsão encapsulando própolis vermelha bruta triturada produzida com Tween 80 (GT), saponina (GS) e caseinato de sódio (GC).



Fonte: Autoria própria.

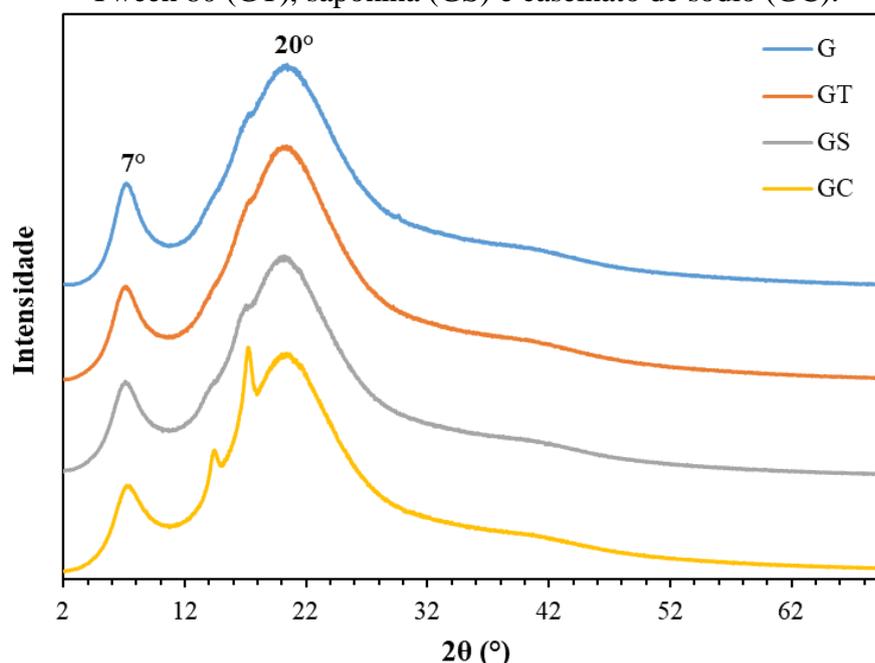
5.6.5 Difração de raios X (DRX)

Os difratogramas de raios X dos filmes ativos e do controle mostraram um padrão característico de materiais parcialmente cristalinos (Figura 31). Dois picos bem definidos e característicos da gelatina, podem ser observados no difratograma, em $2\theta \approx 7^\circ$, o qual corresponde a estrutura cristalina de tripla hélice da gelatina, e em $2\theta \approx 20^\circ$, que está relacionado a fase amorfa (Dammak *et al.*, 2017b; Pereda *et al.*, 2011). Esses picos têm sido observados em filmes à base de gelatina (Alexandre *et al.*, 2016; Dammak; Lourenço; Sobral, 2019; Pérez-Córdoba *et al.*, 2018; Valencia *et al.*, 2016).

No filme GC, foi observada a presença de picos mais discretos em $2\theta \approx 14^\circ$ e $2\theta \approx 17^\circ$, que devem ser devidos a artefatos produzidos durante a análise. Quanto a intensidade dos picos, foi observada uma ligeira diminuição da intensidade com a adição das emulsões, sendo a maior diminuição no filme GC, indicando uma diminuição na cristalinidade dos filmes (Figura 31). Dammak, Lourenço e Sobral (2019) observaram uma diminuição na intensidade dos picos característicos de filmes à base de gelatina adicionados de emulsão Pickering carregadas de hesperidina. Ranjbaryan, Pourfathi e Almasi (2019) relataram uma leve diminuição na

intensidade dos picos em filmes à base de caseinato de sódio adicionados de nanoemulsão contendo óleo essencial de canela. A diminuição na intensidade destes picos pode estar relacionada ao fato de a emulsão adicionada promover algumas interações intermoleculares que são capazes de limitar os movimentos das moléculas de gelatina, o que restringe o processo de recristalização durante a secagem (Dammak; Lourenço; Sobral, 2019).

Figura 31 – Difratoograma de raios X para os filmes à base de gelatina controle (G) e incorporados de emulsão encapsulando própolis vermelha bruta triturada produzida com Tween 80 (GT), saponina (GS) e caseinato de sódio (GC).

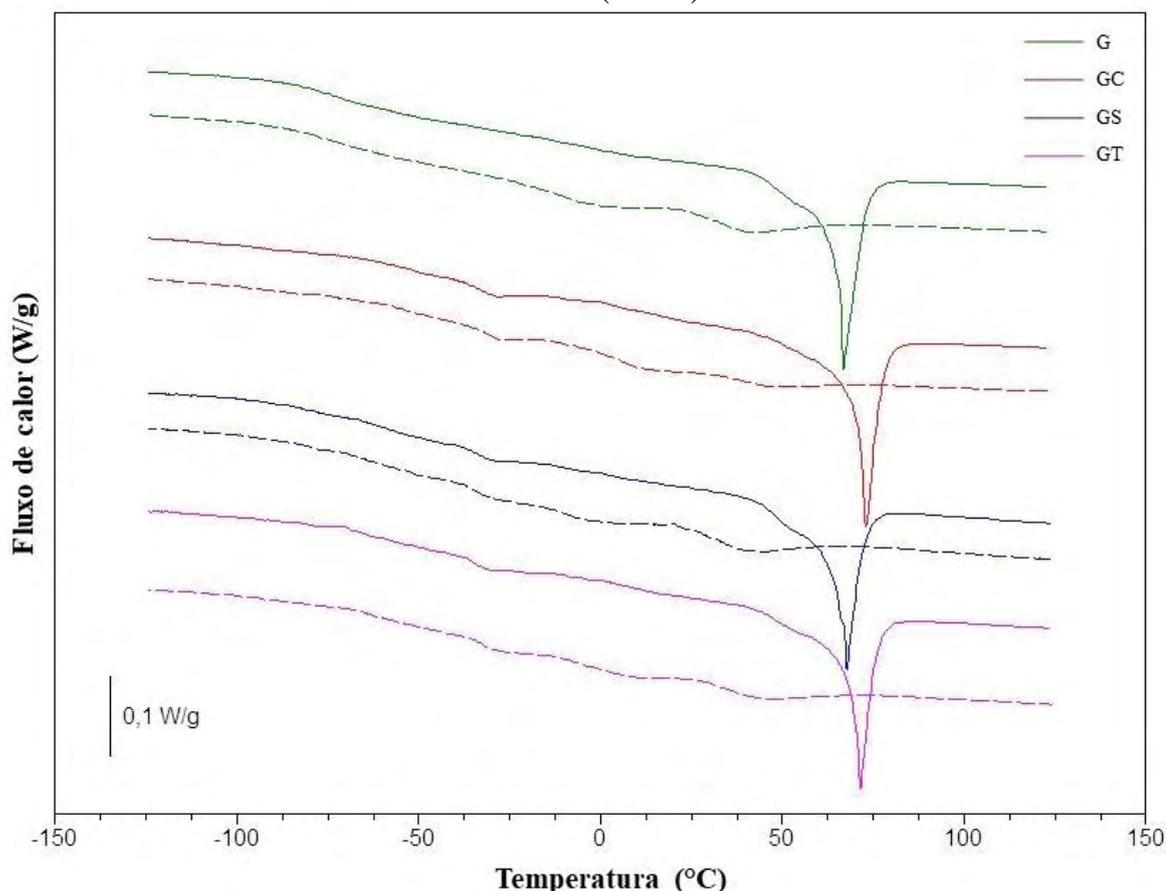


Fonte: Própria autoria.

5.6.6 Calorimetria diferencial de varredura (DSC)

Na análise de DSC foi possível observar na primeira varredura do filme controle uma primeira transição vítrea (-72 °C), correspondente a presença de glicerol e uma segunda transição vítrea (48 °C), relacionada ao biopolímero (Sobral; Habitante, 2001), seguida de uma endoterma (67°C) correspondendo à fusão da porção cristalina da gelatina (Figura 32, Tabela 26). Nos filmes ativos, além de serem observados esses mesmos eventos do filme controle, se observou também uma pequena endoterma (-34°C) em baixa temperatura, muito possivelmente devido à fusão da fração lipídica presente nos filmes devido a incorporação das emulsões (Pérez-Córdoba *et al.*, 2018) (Tabela 26).

Figura 32 – Termogramas das análises térmicas dos filmes à base de gelatina controle (G) e incorporados de emulsão encapsulando própolis vermelha bruta triturada produzida com Tween 80 (GT), saponina (GS) e caseinato de sódio (GC) para a 1ª varredura (—) e 2ª varredura (-----).



Fonte: Própria autoria.

Na segunda varredura, os mesmos eventos foram observados, exceto a endoterma correspondente à fusão da fração cristalina da gelatina, por causa do resfriamento criogênico que não permitiu a formação dos cristais, por ser muito rápida, produzindo assim uma estrutura biopolimérica completamente amorfa (Sobral, Habitante, 2001). Esse mesmo comportamento foi observado em trabalhos sobre filmes de gelatina incorporados de emulsões (Dammak; Sobral, 2019; Pérez-Córdoba *et al.*, 2018; Tessaro *et al.*, 2021).

Na segunda varredura também se observou uma diminuição nas temperaturas de transição vítrea da fração gelatina quando comparadas com a primeira varredura. Esse comportamento pode ser explicado pelo fato de que os microcristais de gelatina provocam redução da mobilidade molecular de forma que após o primeiro aquecimento seguido de resfriamento, a ausência desses cristais facilitava a mobilidade molecular permitindo a transição vítrea em temperaturas menores (Sobral; Habitante, 2001) (Tabela 26).

Tabela 26 – Temperaturas de transição vítrea (T_g), temperatura de fusão (T_m) e entalpia (ΔH) dos filmes à base de gelatina controle (G) e incorporados de emulsão encapsulando própolis vermelha bruta triturada produzida com Tween 80 (GT), saponina (GS) e caseinato de sódio (GC).

1ª varredura					
Filme	T_{g1} (°C)	T_{m1} (°C)	T_{g2} (°C)	T_{m2} (°C)	ΔH (J/g)
G	$-72,0 \pm 0,3^b$	- - -	$48,4 \pm 0,5^a$	$67,3 \pm 0,3^a$	$24,8 \pm 0,9^a$
GT	$-67,8 \pm 1,3^b$	$-34,9 \pm 0,8^b$	$49,3 \pm 1,4^a$	$69,1 \pm 2,6^a$	$22,7 \pm 0,7^b$
GS	$-58,4 \pm 1,2^a$	$-34,1 \pm 1,0^b$	$49,7 \pm 0,4^a$	$68,2 \pm 1,8^a$	$22,9 \pm 0,8^{a,b}$
GC	$-54,8 \pm 3,9^a$	$-32,0 \pm 0,6^a$	$49,0 \pm 3,3^a$	$68,8 \pm 3,6^a$	$23,0 \pm 0,5^{a,b}$
2ª varredura					
Filme	T_{g1} (°C)	T_{m1} (°C)	T_{g2} (°C)	T_{m2} (°C)	ΔH (J/g)
G	$-76,2 \pm 2,3^b$	- - -	$31,8 \pm 0,9^a$	- - -	- - -
GT	$-62,6 \pm 8,9^a$	$-32,8 \pm 1,3^a$	$33,3 \pm 2,7^a$	- - -	- - -
GS	$-65,9 \pm 1,0^{a,b}$	$-33,8 \pm 1,3^a$	$33,3 \pm 1,6^a$	- - -	- - -
GC	$-56,3 \pm 3,9^a$	$-32,5 \pm 1,3^a$	$33,1 \pm 4,3^a$	- - -	- - -

Fonte: Própria autoria.

5.6.7 Ângulo de contato de água

O ângulo de contato de água da superfície de filmes com uma gota de água depende das forças moleculares coesivas e adesivas que existem no próprio líquido e entre o líquido e a superfície (Dammak *et al.*, 2017a). O ângulo de contato de água do filme controle G foi de $94,3 \pm 2,6^\circ$, e diminuiu significativamente com a adição das emulsões ($p < 0,05$), diminuindo a hidrofobicidade dos filmes ativos (Tabela 27). Comparando-se os emulsificantes, não houve diferença significativa entre os filmes GT, GS e GC (Tabela 27). Como foram observadas gotas de óleo na superfície dos filmes (Figura 29), era de se esperar um aumento na hidrofobicidade dos filmes. Porém, tem-se a presença dos emulsificantes nas superfícies das gotas de óleo, que são componentes anfifílicos, e tendem a reduzir a tensão superficial (Dammak *et al.*, 2017a). Os aminoácidos hidrofóbicos presentes nas cadeias de gelatina podem interagir com grupos hidrofóbicos das moléculas emulsificantes, causando uma reorientação dos grupos hidrofílicos destas moléculas na superfície do filme, causando sua interação com a gota de água, diminuindo o ângulo de contato de água (Pulla-Huillca *et al.*, 2021).

Tabela 27 – Ângulo de contato de água (ACA), solubilidade em água e permeabilidade ao vapor de água (PVA) de filmes à base de gelatina controle (G) e incorporados de emulsão encapsulando própolis vermelha bruta triturada produzida com Tween 80 (GT), saponina (GS) e caseinato de sódio (GC).

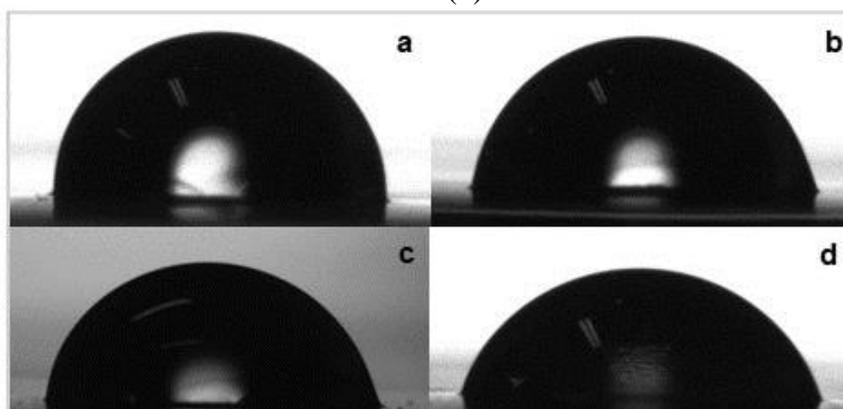
Filme	ACA (°)	Solubilidade (%)	PVA (g.mm/m ² .h.kPa)
G	94,3 ± 2,6 ^a	43,7 ± 0,6 ^a	0,40 ± 0,04 ^a
GT	84,2 ± 2,6 ^b	42,3 ± 0,8 ^{a,b}	0,37 ± 0,02 ^a
GS	81,0 ± 0,6 ^b	42,1 ± 0,5 ^b	0,38 ± 0,01 ^a
GC	78,8 ± 1,8 ^b	38,8 ± 0,2 ^c	0,36 ± 0,02 ^a

Fonte: Própria autoria.

Além disso, o ângulo de contato de água tem relação com a rugosidade da superfície do filme, por causa do aumento da área específica da superfície (Tessaro *et al.*, 2021). Como pode ser observado nas micrografias do MEV, a adição das emulsões causou a formação de gotas visíveis na superfície dos filmes, o que aumenta sua rugosidade (Figura 29). As imagens das gotas de água em contato com a superfície dos filmes podem ser observadas na Figura 33.

Este mesmo comportamento foi relatado por outros autores, com a diminuição do ângulo de contato de água com a adição de emulsões em filmes biopoliméricos (Dammak *et al.*, 2017a; Sun *et al.*, 2021; Tessaro *et al.*, 2021; Zhao *et al.*, 2023). No entanto, comparando o efeito de diferentes emulsificantes de emulsões A/O no ângulo de contato de água de filmes à base de isolado proteico de soja, Zhao *et al.* (2023) observaram uma diferença significativa entre os emulsificantes, o que foi atribuído aos diferentes níveis de hidrofiliicidade destes componentes.

Figura 33 – Gotas de água em contato com a superfície dos filmes de gelatina controle (a) e incorporados de emulsão estabilizada por Tween 80 (b), por saponina (c) e por caseinato de sódio (d).



Fonte: Própria autoria.

5.6.8 Solubilidade em água

A solubilidade de filmes é um parâmetro importante de se avaliar já que pode afetar a integridade do filme durante sua aplicação e até mesmo a migração de compostos ativos para o alimento (Cozmuta *et al.*, 2015). A solubilidade em água dos filmes ativos diminuiu significativamente com a adição das emulsões (Tabela 27). A solubilidade do filme de gelatina foi de 43,7% para 42,3% em GT, para 42,1% para GS e para 38,8% para GC. Muito possivelmente, essa redução na solubilidade foi devido à hidrofobicidade da fase óleo das emulsões incorporadas nos filmes, apesar da presença das estruturas oleosas na superfície desses filmes (Figura 29) não terem necessariamente aumentado sua hidrofobicidade (Tabela 27).

Ji *et al.* (2021) relataram uma queda significativa na solubilidade em água de filmes de gelatina de peixe com o aumento da concentração de nanoemulsão incorporada. Sun *et al.* (2021) e Alexandre *et al.* (2016) também observaram uma queda na solubilidade de filmes à base de gelatina quando adicionados de nanoemulsões carregadas de óleo essencial de lavanda e de gengibre, respectivamente. A presença de compostos apolares, como a fase óleo de emulsões, pode resultar em uma interferência no arranjo das cadeias polipeptídicas de gelatina no filme, a qual pode levar a uma redução da capacidade da gelatina de interagir com as moléculas de água (Pérez-Córdoba *et al.*, 2018).

5.6.9 Permeabilidade ao vapor de água (PVA)

Não se observou diferença significativa ($p > 0,05$) entre os valores da PVA dos filmes, que permaneceu em torno de 0,48 g.mm/m².h.kPa (Tabela 27). Dammak, Lourenço e Sobral (2019) relataram uma pequena diminuição na PVA de filmes à base de gelatina quando adicionados de emulsão de Pickering. Esse mesmo comportamento foi observado por Tessaro *et al.* (2021) na adição de emulsões duplas A/O/A em filmes de gelatina. Diferentemente, Ji *et al.* (2021) relataram um aumento na PVA de filmes de gelatina quando adicionados de emulsões contendo cinamaldeído.

Assim, pode-se observar que não houve influência do tipo de emulsificante na PVA dos filmes ativos à base de gelatina. Os filmes ativos podem ser considerados como sendo de um alto valor de PVA, ou seja, de baixa barreira ao vapor de água, que é característico de matrizes biopoliméricas plastificados com polióis, ambos higroscópicos (Pérez-Córdoba; Sobral, 2017).

5.6.10 Propriedades mecânicas

5.6.10.1 Teste de tração axial

As propriedades mecânicas dos filmes ativos estudadas foram a tensão na ruptura (TR) como medida da resistência do filme, a alongação na ruptura (ER), relacionada a elasticidade do filme, e o módulo elástico (ME) como medida da rigidez do filme, sendo todos estes parâmetros importantes para a aplicação de filmes como embalagem (Atarés; Chiralt, 2016). Na Tabela 28 é possível observar que a adição das emulsões T, S e C provocaram efeitos significativos nas propriedades mecânicas dos filmes de gelatina. Tais alterações podem ser resultadas tanto do efeito da interação e compatibilidade do emulsificante com a matriz (Dammak; Sobral, 2019; Xu *et al.*, 2021), quanto dos diferentes tamanhos de gotas das emulsões (item 5.5.1.1), parâmetro que também apresenta influência em tais propriedades (Fattahi; Seyedain-Ardabili, 2021; Liu *et al.*, 2021c; Zhao *et al.*, 2022). Outro parâmetro a ser levado em consideração é a presença dos demais componentes da própolis vermelha bruta, a qual apresenta uma composição heterogênea, contendo resinas, bálsamos e ceras (Anjum *et al.*, 2019).

Tabela 28 – Tensão na ruptura (TR), alongação na ruptura (ER) e módulo elástico (ME) de filmes à base de gelatina controle (G) e incorporados de emulsão encapsulando própolis vermelha bruta triturada produzida com Tween 80 (GT), saponina (GS) e caseinato de sódio (GC).

Filme	TR (MPa)	ER (%)	ME (MPa)
G	17,6 ± 0,6 ^c	19,6 ± 2,4 ^c	4,4 ± 0,2 ^b
GT	23,0 ± 1,1 ^b	60,6 ± 2,3 ^a	3,3 ± 0,3 ^b
GS	26,1 ± 1,3 ^{a,b}	51,3 ± 1,3 ^b	4,0 ± 0,5 ^b
GC	30,1 ± 2,2 ^a	7,3 ± 1,2 ^d	8,6 ± 0,8 ^a

Fonte: Própria autoria.

De modo geral, os filmes incorporados de emulsão encapsulando a própolis vermelha bruta se apresentaram mais resistentes à ruptura que o filme controle (Tabela 28). Os filmes GC (30,1 MPa) e GS (26,1 MPa) foram os mais resistentes, seguidos do GT (23 MPa) e G (17,6 MPa). Por outro lado, somente os filmes GT (60,6%) e GS (51,3%) apresentaram maior alongação na ruptura que o controle (19,6%). O GC apresentou valor muito pequeno (7,3%).

Assim, este filme (GC) foi o mais rígido, com módulo elástico valendo cerca do dobro (8,6 MPa) dos outros filmes (3,3-4,4 MPa).

Esses comportamentos podem ser atribuídos ao fato de que o Tween 80 pode melhorar a interação e a distribuição das gotas de óleo na matriz biopolimérica (Cao; Song, 2019). Este mesmo efeito pode ter ocorrido para os filmes adicionados de saponina. Sun *et al.* (2021) também relataram um aumento na TR e na ER de filmes à base de gelatina incorporados de nanoemulsões estabilizadas por Tween 80. Por outro lado, Almasi, Azizi e Amjadi (2020) observaram um aumento de resistência à tração de filmes de pectina, até uma determinada concentração de nanoemulsões estabilizadas por Tween 80, porém não houve diferença na ER. Em filmes à base de isolado proteico de soja incorporados de óleo de coco e utilizando saponina como emulsificante, Carpiné *et al.* (2016) determinaram resultados variados em relação a resistência à tração e a elongação dos filmes, que dependeram da proporção de saponina que foi adicionada ao filme.

No caso do filme GC, foi observado um aumento de TR e ME e diminuição de ER (Tabela 28). Isso pode ser explicado pelo fato de que o caseinato de sódio possui algumas porções hidrofóbicas que podem interagir com as cadeias de gelatina, podendo ser mais intensa do que com os demais emulsificantes (Dammak; Sobral, 2019). A diminuição na ER também pode ser atribuída ao aumento da porosidade interna dos filmes (Figura 29), causada pelo maior diâmetro de gota da emulsão C. Tal efeito foi observado por Moradi *et al.* (2012) em filmes de quitosana adicionados de óleo essencial. Dammak e Sobral (2019) também observaram um aumento da tração de ruptura e maior modo elástico em filmes de gelatina adicionados de nanoemulsões estabilizadas por caseinato de sódio e, não observaram diferença significativa na elongação na ruptura. Fattahi e Seyedain-Ardabili (2021) relataram um efeito plastificante ao adicionar emulsões com diferentes tamanhos de gota em filmes à base de CMC, sendo que as gotas com maiores diâmetros produziram filmes mais resistentes e com menor elongação na ruptura do que filmes adicionados com emulsões com menores tamanho de gota.

5.6.10.2 Teste de perfuração

A força na perfuração é a força máxima requerida para se romper um filme por penetração de uma sonda cilíndrica e está relacionada com a rigidez dos filmes (Acevedo-Fani *et al.*, 2015). Não se observou efeito das emulsões sobre a força na perfuração, cujos valores

ficaram próximos a 17,9 N para todos os filmes (Tabela 29). Por outro lado, observou-se um aumento da deformação na perfuração dos filmes GS (9,6%) e GT (9,1%) e diminuição em GC (6,5%) quando comparados com G (8,3%). Esses últimos resultados estão de acordo com o observado no teste de tração, no qual, os filmes GT e GS apresentaram uma maior ER e o filme GC uma menor GC em relação ao filme controle (Tabela 28).

Tabela 29 – Força máxima de perfuração (FP) e deformação na perfuração (DP) de filmes à base de gelatina controle (G) e incorporados de emulsão encapsulando própolis vermelha bruta triturada produzida com Tween 80 (GT), saponina (GS) e caseinato de sódio (GC).

Filme	FP (N)	DP (%)
G	16,8 ± 1,2 ^a	8,3 ± 0,4 ^b
GT	17,8 ± 0,9 ^a	9,1 ± 0,8 ^{a,b}
GS	18,6 ± 0,5 ^a	9,6 ± 0,1 ^a
GC	18,2 ± 1,2 ^a	6,5 ± 0,2 ^c

Fonte: Própria autoria.

Alexandre *et al.* (2016) observaram um aumento na FP e na DP em filmes à base de gelatina incorporados de óleo essencial de gengibre nanoemulsificados. Reyes, Landgraf e Sobral (2021) também relataram este mesmo comportamento em filmes à base de gelatina adicionados de extrato etanólico de própolis vermelha. Contrariamente, Acevedo-Fani *et al.* (2015) observaram uma diminuição da resistência à perfuração de filmes à base de alginato de sódio adicionados de diferentes óleos essenciais.

5.6.11 Propriedades ópticas

5.6.11.1 Parâmetros de cor e opacidade

Filmes de gelatina pura são incolores e os valores dos parâmetros de cor determinados corresponde praticamente aos valores do padrão branco usado como suporte nessas análises. Valores similares de parâmetros de cor de filmes de gelatina foram determinados em outros estudos (Bonilla *et al.*, 2018; Dammak *et al.*, 2017a; Tessaro *et al.*, 2021). Comparando-se os filmes incorporados de emulsão com o filme controle, pode-se observar que uma redução significativa na luminosidade (L*), um aumento no parâmetro a* e no b*, além de um muito importante aumento em ΔE^* (Tabela 30). Diferença de coloração dos filmes pode ser observada

visualmente na Figura 28 e está relacionada a adição das emulsões carregadas de PVBT que apresentaram característica de cor vermelho-alaranjada (Tabela 20).

Tabela 30 – Parâmetros de cor (L^* , a^* , b^*), diferença de cor (ΔE^*) e opacidade de filmes à base de gelatina controle (G) e incorporados de emulsão encapsulando própolis vermelha bruta triturada produzida com Tween 80 (GT), saponina (GS) e caseinato de sódio (GC).

Filme	L^*	a^*	b^*	ΔE^*	Opacidade
G	90,93 ± 0,09 ^a	-1,03 ± 0,03 ^c	4,07 ± 0,22 ^b	4,0 ± 0,2 ^b	0,3 ± 0,0 ^d
GT	80,77 ± 1,09 ^b	1,94 ± 0,52 ^b	27,55 ± 1,67 ^a	29,1 ± 1,9 ^a	2,3 ± 0,1 ^c
GS	76,66 ± 0,86 ^c	3,21 ± 0,26 ^a	28,90 ± 1,37 ^a	32,5 ± 1,7 ^a	6,7 ± 0,5 ^a
GC	78,70 ± 0,83 ^{b,c}	2,02 ± 0,40 ^b	27,44 ± 1,14 ^a	30,1 ± 1,4 ^a	5,2 ± 0,1 ^b

Fonte: Própria autoria.

Entre os filmes adicionados de emulsão, os filmes GS e GC apresentaram menores valores de luminosidade do que o GT. Quanto ao parâmetro a^* , o maior valor foi para GS, seguido do GC e GT. Já o parâmetro b^* não apresentou diferença significativa entre eles. A diferença de cor, que reflete a coloração total do filme, foi maior para os filmes adicionados de emulsão (30,6), ou seja, eles foram mais coloridos que G (4,0), porém, sem diferença significativa devido aos tipos de emulsificantes adicionados. (Tabela 30) Apesar das diferenças observadas na coloração das emulsões T, S e C (Tabela 20), não se observou o respectivo efeito nos filmes.

Uma diminuição na luminosidade dos filmes e aumento nos parâmetros a^* e b^* também foi observada por Reyes; Landgraf e Sobral (2021) em virtude da incorporação de extrato etanólico de própolis vermelha em filmes de gelatina. A cor de filmes ativos incorporados de emulsões é diretamente dependente do tipo de óleo ou composto ativo adicionado e também da presença de outros aditivos com emulsificantes, por exemplo (Mendes *et al.*, 2020).

Quanto a opacidade, observou-se um aumento significativo com a incorporação da emulsão nos filmes (Tabela 30). Entre os filmes ativos, o GS foi o que apresentou a maior opacidade (6,7), seguido do GC (5,2) e do GT (2,3). O aumento da opacidade dos filmes incorporado de emulsões tem sido relatado na literatura (Agudelo-Cuartas *et al.*, 2020; Kong *et al.*, 2020; Tessaro *et al.*, 2021). A presença de uma fase dispersa e não miscível tende a aumentar a opacidade de filmes devido às diferenças do índice de refração entre as fases, sendo influenciado pela concentração e tamanho das gotas dispersas, logo, a opacidade advém do espalhamento da luz produzido pelas gotas de óleo da emulsão que estão presentes na matriz polimérica (Pereda; Aranguren; Marcovich *s*, 2010).

5.6.11.2 Brilho

O brilho é uma propriedade relacionada ao polimento da superfície do filme, a qual pode ser influenciada pela rugosidade e apresenta uma escala arbitrária e adimensional (Dammak *et al.*, 2017a). O filme controle de gelatina apresentou um alto brilho, tanto no ângulo de 60° quanto no de 20° (Tabela 31), estando de acordo com valores relatados por outros pesquisadores (Alexandre *et al.*, 2016; Tessaro *et al.*, 2021).

Com a adição das emulsões, foi possível observar uma diminuição significativa nos valores de brilho em ambos ângulos estudados, sendo em ordem decrescente GT, GS e GC. A exceção foi entre o filme GS e GC à 20°, que não houve diferença significativa (Tabela 31).

Tabela 31 – Brilho a 20° e 60° da superfície de contato com o ar de filmes à base de gelatina controle (G) e incorporados de emulsão encapsulando própolis vermelha bruta triturada produzida com Tween 80 (GT), saponina (GS) e caseinato de sódio (GC).

Filme	Superfície ar	
	20°	60°
G	91,0 ± 4,4 ^a	154,4 ± 1,6 ^a
GT	16,7 ± 1,1 ^b	47,4 ± 1,5 ^b
GS	5,2 ± 0,8 ^c	22,7 ± 1,0 ^c
GC	3,6 ± 0,4 ^c	18,5 ± 1,0 ^d

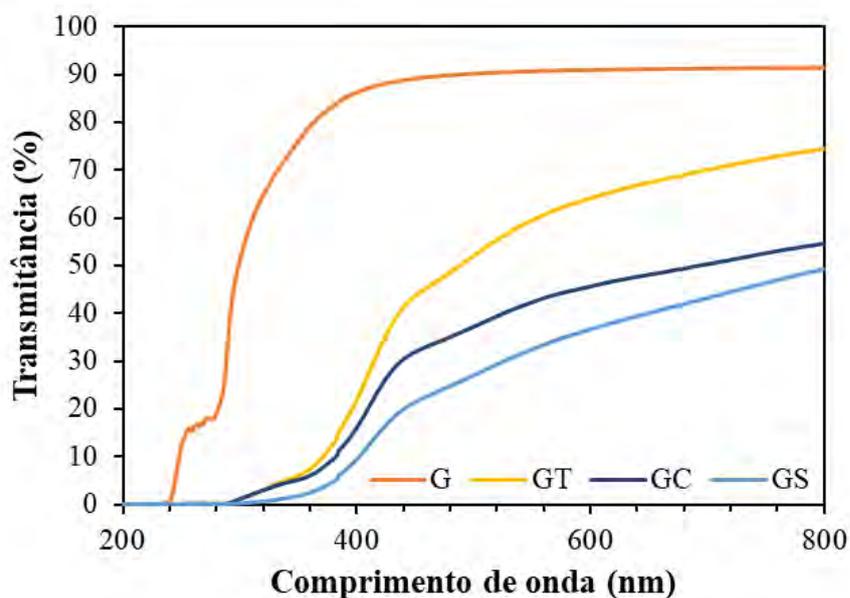
Fonte: Própria autoria.

O brilho de filmes está relacionado à alta ou baixa rugosidade da superfície, que afeta a difração da luz, assim, quanto maior a sua rugosidade, menor o brilho (Flaker *et al.*, 2015; Villalobos *et al.*, 2005). Assim, estes resultados podem ser atribuídos ao efeito das gotas de óleo presentes na superfície dos filmes, que podem ser vistas nas micrografias eletrônicas de varredura (Figura 29). O filme GT apresentou as menores gotas na superfície, aumentando tamanho destas no GS e ainda mais no GC, relacionado ao tamanho de gota das emulsões adicionadas. A emulsão C apresentou o maior tamanho de gota e, conseqüentemente, o filme GC foi o que apresentou a superfície mais irregular nas micrografias (Figura 29), sendo o filme com menor brilho (Tabela 31). Vários pesquisadores relataram uma diminuição no brilho de filmes à base de gelatina incorporados de emulsão (Dammak *et al.*, 2017a; Dammak; Sobral, 2019; Tessaro *et al.*, 2021). Dammak e Sobral (2019) compararam o brilho de filmes de gelatina adicionados de nanoemulsões estabilizadas por diferentes emulsificantes, porém, a diferença no brilho foi atribuída a diferença na rugosidade da superfície do filme.

5.6.11.3 Propriedades de barreira a luz UV/Visível

As propriedades ópticas dos filmes são importante para sua aplicação como embalagem de alimento, já que influencia na aparência da embalagem e/ou do produto embalado, e portanto, na comercialização (Dammak *et al.*, 2017a). Todos os filmes se mostraram com barreira total à luz UV até 240 nm para o filme controle, e até 300 nm para os filmes ativos (Figura 34). Resultados similares têm sido observados em outro trabalhos com filmes à base de gelatina (Dammak *et al.*, 2017a; Tessaro *et al.*, 2021). Os anéis aromáticos presentes em alguns aminoácidos da gelatina apresentam a capacidade de absorção da luz UV (Belitz; Grosch; Schieberle, 2009). A maior barreira nos filmes ativos foram devidos a presença de compostos fenólicos ricos em duplas ligações alternadas com simples ligações, que também tem a capacidade de absorver a luz UV (Belitz; Grosch; Schieberle, 2009).

Figura 34 – Espectros UV/Visível dos filmes à base de gelatina controle (G) e incorporados de emulsão encapsulando própolis vermelha bruta triturada produzida com Tween 80 (GT), saponina (GS) e caseinato de sódio (GC).



Fonte: Própria autoria.

A transmittância do filme controle G aumentou consideravelmente na faixa da luz visível em torno de 400 nm, atingindo um nível de transmittância de 90% (Figura 34). Com a adição das emulsões, a barreira à luz visível diminuiu, principalmente na faixa entre 300 e 450 nm, aumentando em comprimentos de onda maiores, porém, com menor transmittância do que o filme G. O filme com menor transmittância foi o GS, seguido pelo GC e GT.

Quando compara-se com a opacidade dos filmes, observa-se que GS foi o filme com maior opacidade, decaindo para GC e GT (Tabela 30). Outros estudos tem relatado o aumento da barreira à luz visível de filmes adicionados de emulsões (Agudelo-Cuartas *et al.*, 2020; Jahromi; Niakousari; Golmakani, 2022; Oun; Shin; Kim, 2022). Em filmes à base de gelatina adicionados de própolis vermelha, Reyes, Landgraf e Sobral (2021) relataram um aumento à barreira à luz visível até, aproximadamente, 500 nm. Este fato pode estar relacionado à composição da própolis vermelha, que contém compostos fenólicos, que possuem capacidade de absorção da luz visível.

5.6.12 Atividade antioxidante

A concentração de compostos fenólicos totais e atividade antioxidante dos filmes controle de gelatina apresentaram valores baixos, mas os filmes incorporados com as emulsões incorporadas com PVBT apresentaram maiores valores, constituindo-se em filmes ativos, ou seja, com atividade antioxidante (Tabela 32). A atividade antioxidante de filmes à base de gelatina (G) já foi relatada em outros trabalhos (Lin *et al.*, 2023; Reyes; Landgraf; Sobral, 2021; Roy; Priyadarshi; Rhim, 2022; Roy; Rhim, 2021). Esse resultado é atribuído à presença dos aminoácidos presentes na gelatina, como tirosina, fenilalanina e triptofano, que apresentam estruturas aromáticas em seus resíduos e que podem reagir com os radicais livres, por conta de suas cadeias fenólicas laterais (Boeira *et al.*, 2022). Dammak e Sobral (2019) não observaram nenhuma atividade antioxidante nos filmes controle à base de gelatina.

A atividade antioxidante dos filmes adicionados de emulsões está relacionada a presença dos compostos ativos da própolis vermelha bruta, a qual contém componentes reconhecidos por apresentarem esta propriedade (Righi *et al.*, 2011; Rufatto *et al.*, 2017) e como foi observado na seção 5.5.6, na análise das emulsões. Comparando-se o efeito dos emulsificantes, observa-se que não houve diferença significativa nos compostos fenólicos totais entre os filmes ativos GT, GS e GC (Tabela 32). Tal fato era esperado, já que a concentração de emulsão adicionada foi a mesma para todas emulsões testadas e corroborou com os resultados da concentração de fenólicos totais nas emulsões (Tabela 23). Para a atividade antioxidante por FRAP, a maior atividade foi encontrada no filme GT com uma ligeira queda significativa para os filmes GS e GC, o mesmo ocorreu na avaliação da atividade antioxidante das emulsões, sendo a emulsão T com a maior atividade antioxidante por este método (Tabela 23). No método ABTS⁺⁺ não houve

diferença significativa entre os filmes GC e GT, havendo uma ligeira queda para GS (Tabela 32).

Tabela 32 – Compostos fenólicos totais e atividade antioxidante pelos métodos de ABTS^{•+} (2,2'-azino-bis(3-etilbenzoatiazolin)-6-ácido sulfônico) e FRAP (método de redução do íon férrico) de filmes à base de gelatina controle (G) e incorporados de emulsão encapsulando própolis vermelha bruta triturada produzida com Tween 80 (GT), saponina (GS) e caseinato de sódio (GC).

Filme	Compostos fenólicos totais (mg AGE/g)	ABTS ^{•+} (mg TE/g)	FRAP	
			(mg TE/g)	(mg FeSO ₄ /g)
G	1,1 ± 0,2 ^b	1,42 ± 0,15 ^c	0,22 ± 0,05 ^c	0,20 ± 0,07 ^c
GT	3,7 ± 0,4 ^a	9,43 ± 0,22 ^{a,b}	3,37 ± 0,14 ^a	7,23 ± 0,29 ^a
GS	3,7 ± 0,3 ^a	8,32 ± 0,71 ^b	3,08 ± 0,12 ^{a,b}	6,57 ± 0,27 ^b
GC	3,4 ± 0,5 ^a	10,27 ± 0,7 ^a	2,95 ± 0,14 ^b	6,30 ± 0,31 ^b

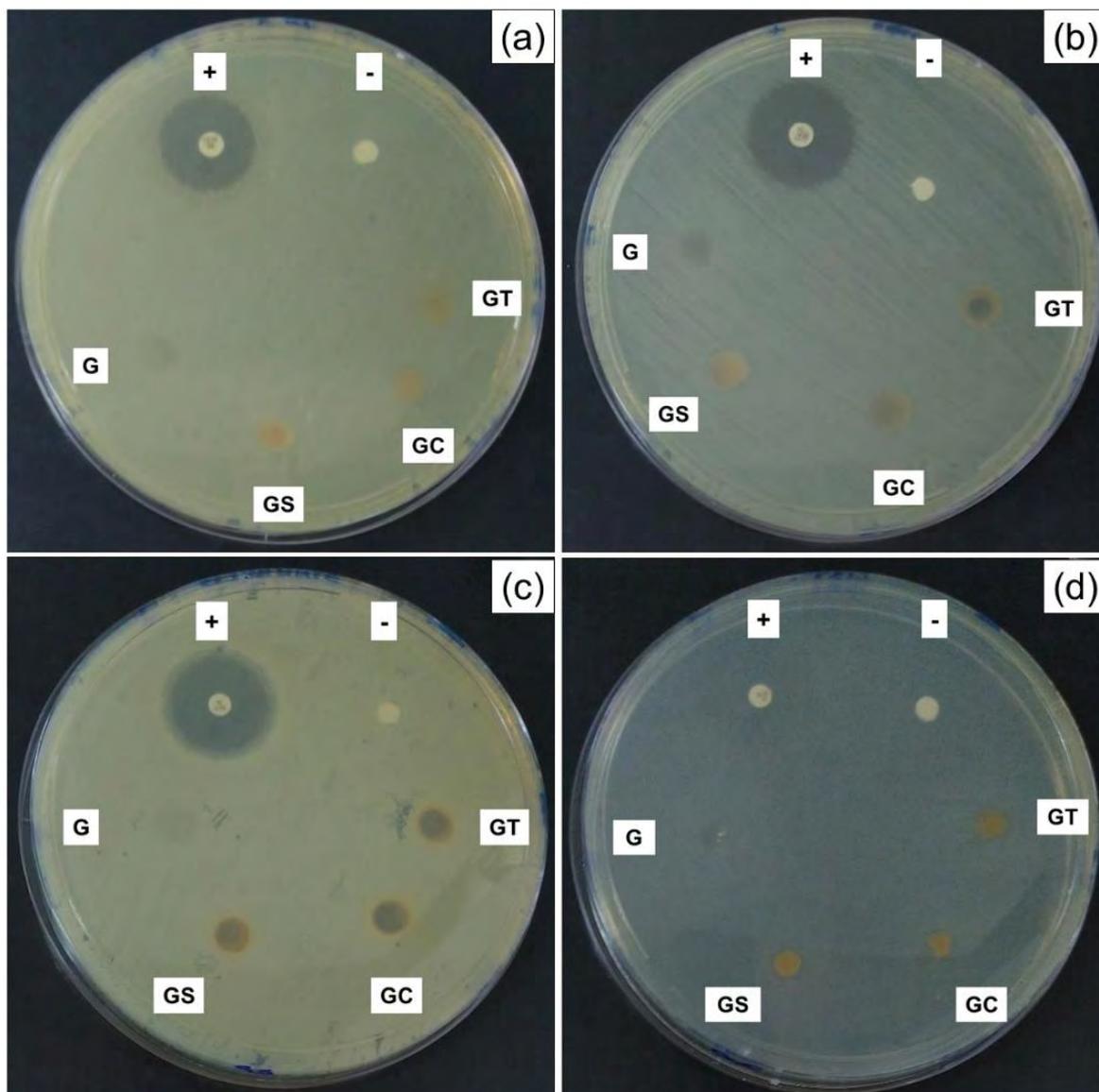
AGE = ácido gálico equivalente; TE = Trolox equivalente. Fonte: Própria autoria.

Assim, mesmo com diferenças significativas, a queda na atividade antioxidante foi baixa, sendo uma diferença entre a maior atividade antioxidante e a menor de 0,42 mg TE/g de filme e 0,93 mg FeSO₄/g filme no método FRAP, e de 0,84 mg TE/g de filme, podendo ser consideradas irrelevantes (Tabela 32). Diversos autores têm relatado atividade antioxidante em filmes biopoliméricos adicionados de extrato etanólico de própolis vermelha, como em filmes à base de gelatina (Reyes; Landgraf; Sobral, 2021), à base de carragenana e amido de milho (Chang-Bravo; López-Córdoba; Martino, 2014) e à base de celulose bacteriana (Hodel *et al.*, 2022). Costa *et al.* (2014) relataram a eficácia de filmes à base de amido de mandioca incorporados de extrato de própolis vermelha de retardar processos de oxidação da manteiga. Vários estudos vêm relatando a eficiência do uso de extratos de diferentes tipos de própolis na preservação de frutas e vegetais (Pu *et al.*, 2023) e em vários outros tipos de alimentos (Segueni *et al.*, 2023).

5.6.13 Atividade antimicrobiana

Apesar das emulsões encapsuladas de PVBT apresentarem efeitos positivos contra *S. aureus* e *L. monocytogenes* (Figura 27), os filmes ativos não provocaram halo de inibição para nenhuma das bactérias testadas (Figura 35).

Figura 35 – Atividade antimicrobiana por teste de difusão em disco de filmes à base de gelatina controle (G) e incorporados de emulsão encapsulando própolis vermelha bruta triturada produzida com Tween 80 (GT), saponina (GS) e caseinato de sódio (GC), para o controle positivo (+) e negativo (-) e para as bactérias *E. coli* (a), *Salmonella* (b), *S. aureus* (c) e *L. monocytogenes* (d).



Fonte: Própria autoria.

A formação de halo de inibição está relacionada a concentração e a difusão dos compostos ativos através do ágar e, como a PVBT está em baixa concentração no filme e está encapsulada pela emulsão e pela matriz biopolimérica, isto pode ter dificultado a sua liberação para agir como agente antimicrobiano e, conseqüentemente, não formando halo de inibição (Tessaro *et al.*, 2021).

Em filmes de gelatina contendo emulsão dupla (A/O/A) carregadas de extrato de folhas de pitangueira, Tessaro *et al.* (2021) relataram a formação de halo de inibição apenas para a

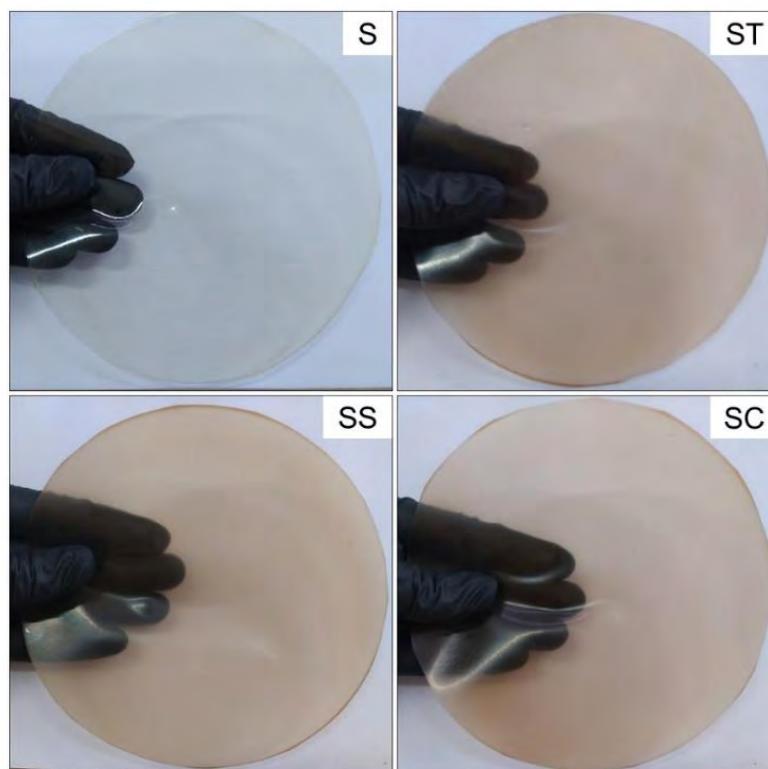
bactéria *S. aureus* dentre as três bactérias testadas, justificando a baixa concentração de compostos ativos e a liberação mais lenta como causas do comportamento para as demais bactérias testadas. Barreiros *et al.* (2022) avaliando a atividade antimicrobiana *in vitro* de FFF à base de goma xantana observaram que na mesma concentração de uma mistura de óleos essenciais adicionada, a FFF incorporada com os óleos essenciais livres foi mais efetiva contra o crescimento microbiano do que os óleos essenciais encapsulados em nanoemulsões. Aqueles autores atribuíram tal comportamento ao fato dos componentes estabilizantes atuarem como uma barreira a mais para a difusão dos compostos ativos, promovendo uma liberação controlada.

Atividade antimicrobiana tem sido relatada em estudos com filmes ativos adicionados de própolis vermelha, porém destaca-se que a própolis foi adicionada na forma de extrato em sua forma livre e não em sistemas emulsificados. Como, por exemplo, Reyes, Landgraf e Sobral (2021) observaram halo de inibição *S. aureus* e *S. Enteritidis* de filmes à base de gelatina adicionados de extrato de própolis vermelha. Hodel *et al.* (2022) relataram efeito antibacteriano contra *S. aureus* de filmes à base de celulose bacteriana adicionados de extrato de própolis vermelha, o que não foi observado nos filmes adicionados de extrato de própolis verde. Entretanto, nenhum dos tipos de própolis estudados apresentaram efeito contra *E. coli* (Hodel *et al.*, 2022). Costa *et al.* (2014) relataram uma redução no crescimento de microrganismos em queijos embalados com filmes à base de amido de mandioca adicionados de extrato de própolis vermelha.

5.7 CARACTERIZAÇÃO DOS FILMES À BASE DE ISOLADO PROTEICO DE SOJA

Os filmes à base de isolado proteico de soja controle (S) e incorporados das emulsões com diferentes emulsificantes (ST, SS e SC) se apresentaram homogêneos e transparentes (Figura 36). Porém, foi possível observar a presença de óleo na superfície de contato com o ar do filme para todos os filmes adicionados de emulsões, independente da emulsão.

Figura 36 – Filmes ativos à base de isolado proteico de soja controle (S) e incorporados de emulsão encapsulando própolis vermelha bruta triturada produzida com Tween 80 (ST), saponina (SS) e caseinato de sódio (SC).



Fonte: Própria autoria.

5.7.1 Espessura

As espessuras dos filmes ativos à base de isolado proteico de soja não apresentaram diferença significativa ($p > 0,05$) com a incorporação das emulsões produzidas com os diferentes emulsificantes, permanecendo em torno de 0,091 mm (Tabela 33). Este comportamento demonstrou a efetividade no controle de massa de FFF adicionada às placas no preparo dos filmes.

Tabela 33 – Espessura e umidade de filmes à base de isolado proteico de soja controle (S) e incorporados de emulsão encapsulando própolis vermelha bruta triturada produzida com Tween 80 (ST), saponina (SS) e caseinato de sódio (SC).

Filme	Espessura (mm)	Umidade (%)
S	$0,092 \pm 0,002^a$	$17,0 \pm 0,3^a$
ST	$0,090 \pm 0,002^a$	$12,5 \pm 0,4^c$
SS	$0,091 \pm 0,004^a$	$13,6 \pm 0,6^b$
SC	$0,089 \pm 0,004^a$	$13,8 \pm 0,2^b$

Fonte: Própria autoria.

5.7.2 Umidade

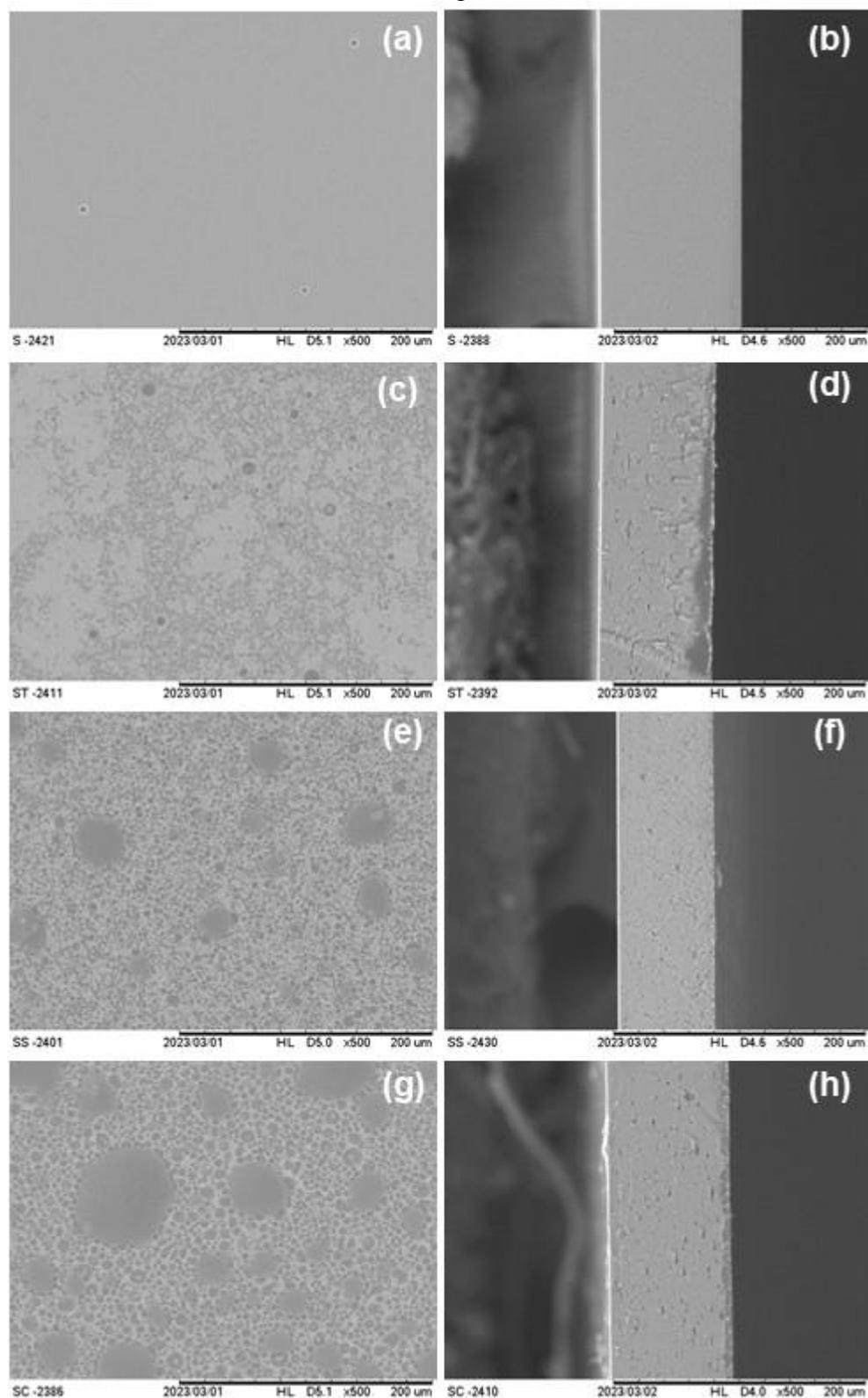
A umidade do filme controle S foi de $17,0 \pm 0,3\%$ e diminuiu significativamente ($p < 0,05$) quando as emulsões foram incorporadas, sendo a menor umidade obtida para o filme ST (Tabela 33). Ghoshal e Shivani (2022) observaram uma diminuição na umidade dos filmes de concentrado proteico de soro de leite e amido de tamarindo com o aumento da concentração de nanoemulsão carregada de óleo essencial de tomilho. Este mesmo efeito também foi observado por Ji *et al.* (2021) com a adição de nanoemulsões em filmes à base de gelatina de peixe. Já Agudelo-Cuartas *et al.* (2020) não observaram uma diferença significativa na umidade de filmes de concentrado proteico de soro de leite incorporados de nanoemulsões carregadas de α -tocoferol.

5.7.3 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Os filmes controle de IPS apresentaram superfície superior e a do corte transversal homogêneas e uniformes (Figura 37). Com a adição das emulsões, foi possível observar a formação de bolhas de óleo em sua superfície. Com a emulsão de T, as bolhas observadas foram menores, e aumentaram com a emulsão S e ainda mais com a C. Tais resultados corroboram o tamanho de gota obtido para as emulsões apresentados na seção 5.5.2. Esse resultado explica o aspecto visual oleoso observado na superfície de contato com o ar dos filmes. Este resultado é corroborado por Zhao *et al.* (2023) que observaram acúmulo de gotas de óleo na superfície dos filmes de IPS e, as gotas observadas aumentaram em tamanho de acordo com o emulsificante utilizado nas emulsões A/O, estando relacionado com o tamanho de gota encontrado nas emulsões.

Na seção transversal, o filme controle se apresentou uniforme, enquanto que os filmes adicionados de emulsão apresentaram poros (Figura 37). Galus (2018) relatou uma microestrutura heterogênea e irregular de filmes à base de IPS adicionados de óleo de canola, observando gotas de óleo da superfície dos filmes, sendo este comportamento atribuído à baixa miscibilidade entre o óleo e a matriz de proteína. Segundo Atarés e Chiralt (2016), durante o processo de secagem dos filmes podem ocorrer fenômenos de desestabilização das emulsões, iniciando pelo aumento da concentração da fase óleo com a evaporação de água promovendo a floculação das gotas seguido da coalescência e cremação que levam as gotas de óleo para a superfície do filme, podendo ocorrer até a perda de compostos ativos por evaporação.

Figura 37 – Micrografias da superfície (a, c, e, g) da seção transversal (b, d, f, h) de filmes à base de isolado proteico de soja controle (a,b) e incorporados de emulsão encapsulando própolis vermelha triturada produzida com Tween 80 (c,d), saponina (e,f) e caseinato de sódio (g,h).



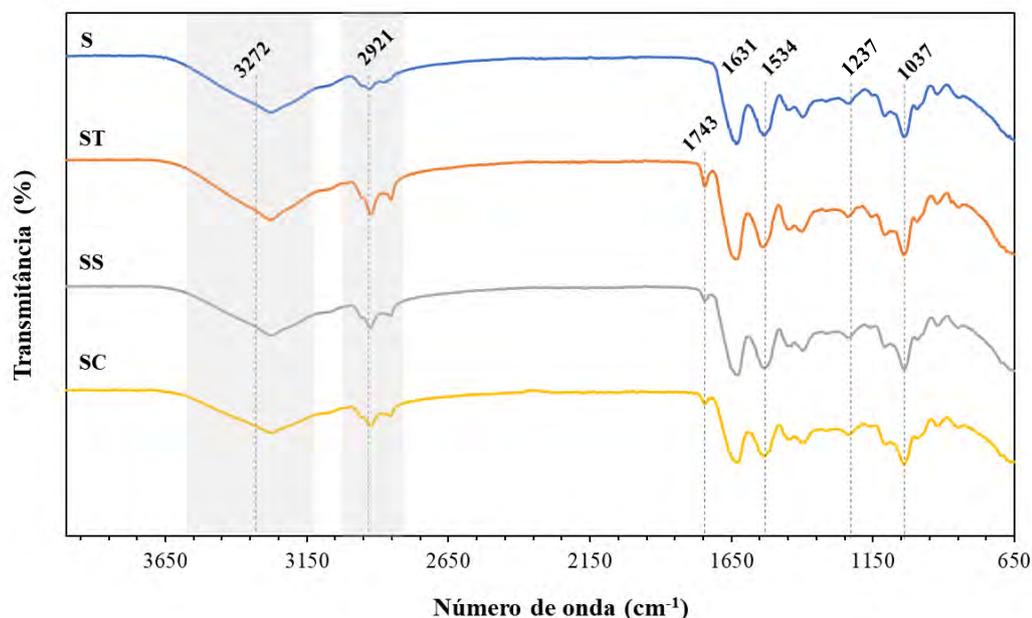
Fonte: Própria autoria.

Paglione *et al.* (2019) observaram a presença de poros e cavidades de diferentes tamanhos nas seções transversais de filmes de concentrado proteico de soja adicionados de óleo essencial de orégano.

5.7.4 Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)

O filme S, composto somente por IPS, apresentou bandas entre 3000 e 3500 cm^{-1} , correspondentes ao estiramento de ligações amida e hidroxila e em 2921 cm^{-1} , que está relacionada a ligações C-H (Figura 38). As bandas em 1631 cm^{-1} , 1534 cm^{-1} e 1237 cm^{-1} correspondem ao estiramento do grupo carbonila (C=O), a ligação N-H (amida I) e estiramento da ligação C-N, respectivamente. A banda em 1037 cm^{-1} corresponde a interação entre o plastificante glicerol e as cadeias de biopolímero (Bonilla *et al.*, 2018; Ji *et al.*, 2021). Outros estudos de FTIR em filmes de IPS corroboram estes resultados (Carpiné *et al.*, 2016; Su *et al.*, 2008; Zhao *et al.*, 2023).

Figura 38 – Espectros FTIR (infravermelho por transformada de Fourier) para os filmes à base de isolado proteico de soja controle (S) e incorporados de emulsão encapsulando própolis vermelha bruta triturada produzida com Tween 80 (ST), saponina (SS) e caseinato de sódio (SC).



Fonte: Própria autoria.

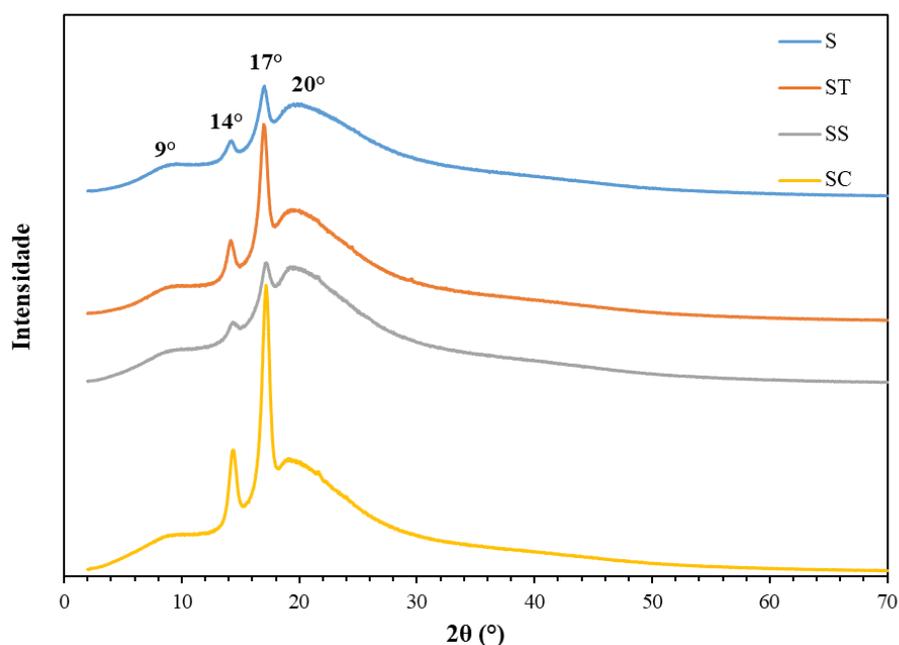
Os filmes ativos apresentaram as mesmas bandas presentes no filme controle S, porém, uma nova banda em 1743 cm^{-1} foi observada. Esta banda está relacionada ao estiramento de grupos carbonila (C=O) presentes em ésteres de ácido graxo, devido à presença do óleo da

emulsão, sendo observado por outros autores ao adicionarem emulsões (Zhao *et al.*, 2023) ou óleos (Carpiné *et al.*, 2016) em filme à base de IPS.

5.7.5 Difração de raios X (DRX)

No filme controle (S), pode-se observar dois picos principais em $2\theta = 9^\circ$ e em $2\theta = 20^\circ$ (Figura 39). Estes picos representam a as estruturas de α -hélice e β -folha do IPS (Chen *et al.*, 2013). Estes mesmos picos foram observados em outros estudos (Garrido *et al.*, 2013; Jiang *et al.*, 2023; Xu *et al.*, 2015).

Figura 39 – Difratoograma de raios X para os filmes à base de isolado proteico de soja controle (S) e incorporados de emulsão encapsulando própolis vermelha bruta triturada produzida com Tween 80 (ST), saponina (SS) e caseinato de sódio (SC).



Fonte: Própria autoria.

Com a adição das emulsões não foi possível observar que se houve deslocamento dos picos, no entanto, houve um ligeiro aumento na intensidade dos mesmos quando comparados ao filme controle (Figura 39). Contrariamente, alguns estudos têm relatado uma diminuição na intensidade dos picos e, conseqüentemente, da cristalinidade de filmes incorporados por sistemas emulsionados (Dammak; Lourenço; Sobral, 2019; Ranjbaryan; Pourfathi; Almasi, 2019). Outros autores não observaram influência da adição de emulsões na cristalinidade de filmes biopoliméricos (Ghadetaj; Almasi; Mehryar, 2018; Kong *et al.*, 2020). Já Mendes *et al.* (2020) observou um aumento e afinamento dos picos característicos de filmes à base de amido

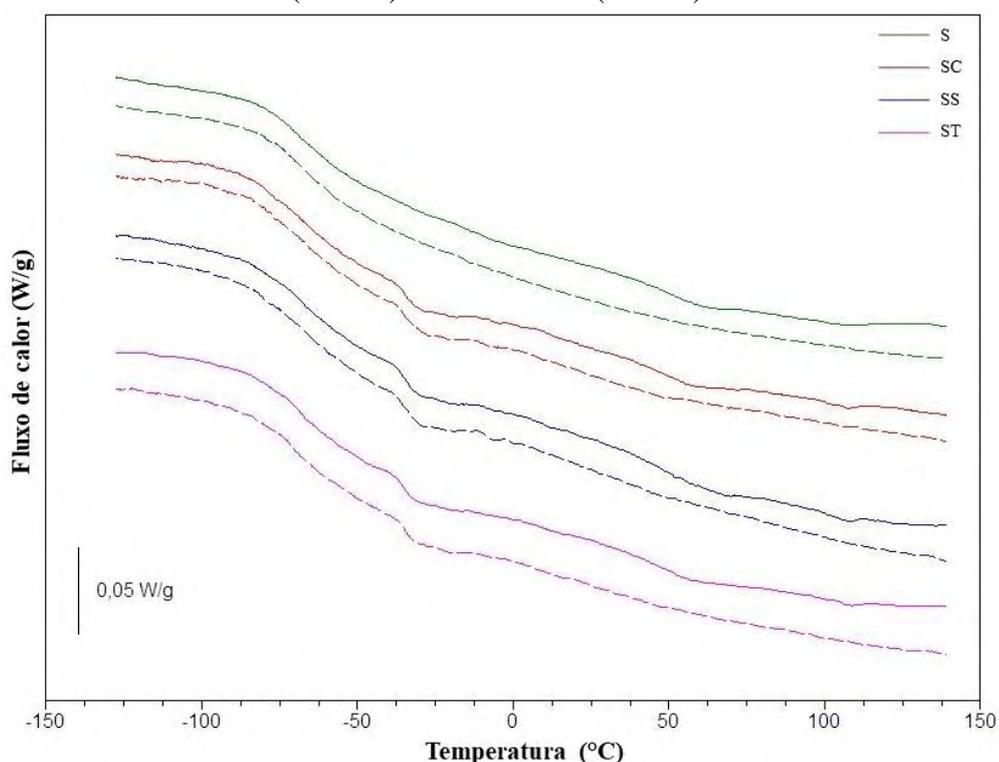
adicionados de nanoemulsões carregadas de óleo essencial de capim-limão. Segundo as micrografias (Figura 37), houve uma migração de óleo para a superfície dos filmes de IPS, logo, as gotas de óleo não interagiram fortemente com a matriz biopolimérica. Além disso, a presença de óleo na superfície juntamente com a PVB pode afetar a análise.

Os picos observados em 14° e 17° não foram relatados em outros estudos, e apareceram em amostras aleatórias, como pode ser observado nos filmes de gelatina (Figura 31), logo eles são considerados artefatos e não serão discutidos neste trabalho.

5.7.6 Calorimetria diferencial de varredura (DSC)

No filme controle S foram observados (Figura 40) na primeira varredura, uma Tg em temperaturas baixas (~72°C), correspondente às frações ricas em glicerol (Sobral; Habitante, 2001), uma segunda temperatura de transição vítrea (~50°C), que está relacionada à temperatura de transição vítrea do IPS (Zhao *et al.*, 2023), e um pico endotérmico em 106°C, correspondente ao processo de desnaturação da β -conglucina (Denavi *et al.*, 2009).

Figura 40 – Termogramas das análises térmicas dos filmes à base de isolado proteico de soja controle (S) e incorporados de emulsão encapsulando própolis vermelha bruta triturada produzida com Tween 80 (ST), saponina (SS) e caseinato de sódio (SC) para a 1ª varredura (—) e 2ª varredura (-----).



Fonte: Própria autoria.

Nos filmes ativos foram observados os mesmos eventos térmicos adicionados de uma pequena endoterma (-35°C), que está relacionada a fusão de lipídios presentes nas emulsões adicionadas aos filmes (Figura 40) (Pérez-Córdoba *et al.*, 2018).

Na segunda varredura, a T_g do IPS e a endoterma de desnaturação do aminoácido não foram observados para nenhum dos filmes (Tabela 34). A ausência da endoterma pode ser atribuída ao fato de que o aminoácido foi completamente desnaturado após a primeira varredura, logo, não foi observado este processo na segunda varredura.

Tabela 34 – Temperaturas de transição vítrea (T_g), temperatura de fusão (T_m) e entalpia (ΔH) dos filmes à base de isolado proteico de soja controle (S) e incorporados de emulsão encapsulando própolis vermelha bruta triturada produzida com Tween 80 (ST), saponina (SS) e caseinato de sódio (SC).

1ª varredura					
Filme	T_{g1} ($^{\circ}\text{C}$)	T_{m1} ($^{\circ}\text{C}$)	T_{g2} ($^{\circ}\text{C}$)	T_{m2} ($^{\circ}\text{C}$)	ΔH (J/g)
S	$-71,6 \pm 2,8^a$	- - -	$49,7 \pm 4,8^a$	$106,7 \pm 1,1^a$	$0,28 \pm 0,03^a$
ST	$-68,8 \pm 0,5^a$	$-34,6 \pm 0,8^a$	$48,6 \pm 3,9^a$	$106,2 \pm 1,8^a$	$0,29 \pm 0,09^a$
SS	$-68,9 \pm 1,3^a$	$-36,0 \pm 0,9^a$	$47,5 \pm 2,7^a$	$106,8 \pm 0,6^a$	$0,37 \pm 0,05^a$
SC	$-71,6 \pm 5,4^a$	$-34,4 \pm 2,0^a$	$49,8 \pm 3,8^a$	$107,1 \pm 0,7^a$	$0,32 \pm 0,04^a$
2ª varredura					
Filme	T_{g1} ($^{\circ}\text{C}$)	T_{m1} ($^{\circ}\text{C}$)	T_{g2} ($^{\circ}\text{C}$)	T_{m2} ($^{\circ}\text{C}$)	ΔH (J/g)
S	$-70,2 \pm 3,7^a$	- - -	- - -	- - -	- - -
ST	$-69,3 \pm 1,9^a$	$-35,2 \pm 0,6^a$	- - -	- - -	- - -
SS	$-66,6 \pm 0,4^a$	$-35,4 \pm 1,0^a$	- - -	- - -	- - -
SC	$-67,3 \pm 1,7^a$	$-34,7 \pm 1,0^a$	- - -	- - -	- - -

Fonte: Própria autoria.

Uma segunda endoterma em temperaturas superiores às da encontrada neste estudo tem sido relatada na literatura (Denavi *et al.*, 2009; Guerrero *et al.*, 2011), no entanto, não foi observada neste trabalho. Esta segunda endoterma está relacionada ao processo de desnaturação da glicinina, entretanto, o pH da solução formadora de filme e processos de secagem podem levar a desnaturação do aminoácido (Denavi *et al.*, 2009), o que pode ter ocorrido neste caso e, logo, este evento térmico não foi observado. As propriedades térmicas de filmes de IPS têm sido estudadas por DSC em vários outros estudos (Chen; Zhang; Cao, 2005; Su *et al.*, 2008; Zhao *et al.*, 2023).

A temperatura de transição vítrea do IPS combinado ao glicerol é bastante discutida e apresenta resultados não consistentes (Su *et al.*, 2008). Félix *et al.*, (2014) encontraram uma Tg de 90°C. Já Zhao *et al.* (2023) relataram uma Tg de, aproximadamente, 58°C, e Chen, Zhang e Cao (2005), valores mais próximos ao encontrado neste estudo. Denavi *et al.* (2009) não observaram a presença da Tg da fração proteica em filmes de IPS. De fato, não é tão fácil determinar a transição vítrea nem o fenômeno de fusão em materiais à base de proteínas (Harnkarnsujarit, 2017). Além disso, a umidade dos filmes pode influenciar a Tg de filmes de IPS plastificados por glicerol (Chen; Zhang; Cao, 2005), o que poderia explicar as variações encontradas entre os vários autores.

5.7.7 Ângulo de contato de água

O ângulo de contato de água do filme controle (S) foi de 76° e, com a adição das emulsões, ocorreu uma diminuição neste significativa apenas para GT (Tabela 35). Para o filme GS e GC não houve diferença significativa com o filme controle (Tabela 35). Logo, a adição da emulsão T tornou a superfície do filme mais hidrofílica.

Tabela 35 – Ângulo de contato de água (ACA), solubilidade em água e permeabilidade ao vapor de água (PVA) de filmes à base de isolado proteico de soja controle (S) e incorporados de emulsão encapsulando própolis vermelha bruta triturada produzida com Tween 80 (ST), saponina (SS) e caseinato de sódio (SC).

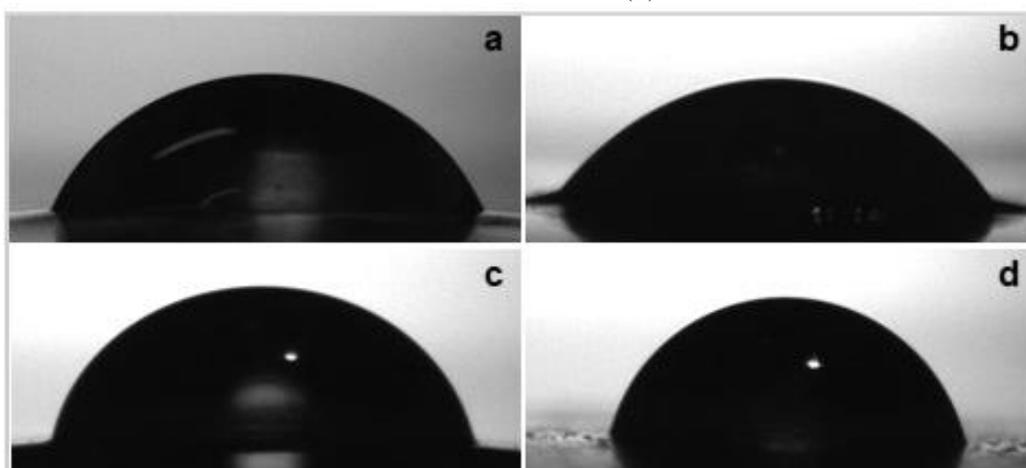
Filme	ACA (°)	Solubilidade (%)	PVA (g.mm/m ² .h.kPa)
S	76 ± 4 ^a	55,1 ± 0,9 ^{a,b}	0,48 ± 0,05 ^a
ST	58 ± 4 ^b	52,8 ± 0,9 ^c	0,45 ± 0,00 ^a
SS	85 ± 3 ^a	53,1 ± 0,7 ^{b,c}	0,37 ± 0,06 ^a
SC	78 ± 4 ^a	55,6 ± 1,0 ^a	0,46 ± 0,08 ^a

Fonte: Própria autoria.

Como foi observada a migração das gotas de óleo para a superfície dos filmes (Figura 37), era esperado um aumento na hidrofobicidade dos filmes. No entanto, a presença do emulsificante Tween 80 na superfície das gotas de óleo pode ter reduzido a tensão superficial das gotas e, conseqüentemente, tornado a superfície mais hidrofílica (Dammak *et al.*, 2017a). O emulsificante, por ser uma molécula, anfifílica, apresenta porções hidrofílicas e hidrofóbicas. As porções hidrofóbicas podem interagir com as porções hidrofóbicas das proteínas, causando um rearranjo dessas moléculas na superfície do filme, fazendo com que as porções hidrofílicas

se tornem disponíveis para interagir com a gota de água, causando a diminuição da hidrofobicidade do filme (Pulla-Huillca *et al.*, 2021). Porém, os demais emulsificantes não produziram o mesmo efeito (Tabela 35). Tal fato pode ser explicado pela maior migração de óleo para a superfície destes filmes, com maiores tamanhos de gota das emulsões, sendo que a natureza hidrofóbica da fase óleo superou as interações entre as moléculas emulsificantes e a gota de água. Zhao *et al.* (2023) relataram uma diminuição no ângulo de contato de água da superfície de filmes de IPS com a adição de emulsão produzida com diferentes emulsificantes, sendo que alguns apresentaram superfícies menos hidrofóbicas do que outros. As imagens das gotas de água com a superfície dos filmes podem ser observadas na Figura 41.

Figura 41 – Gotas de água em contato com a superfície dos filmes de isolado proteico de soja controle (a) e incorporados de emulsão estabilizada por Tween 80 (b), por saponina (c) e por caseinato de sódio (d).



Fonte: Própria autoria.

5.7.8 Solubilidade em água

Todos os filmes à base de IPS apresentaram alta solubilidade em água, variando entre 52,8 e 55,6% ($p > 0,05$) (Tabela 35). Como o IPS apresenta uma matriz hidrofílica, ele tende a ter uma alta solubilidade a água e, até mesmo, se dissolver por completo (Rhim *et al.*, 2006; Su *et al.*, 2008). Denavi *et al.* (2009) observaram uma variação de, aproximadamente, 57% a 86% de solubilidade em água de filmes de IPS produzidos com a proteína extraída em laboratório, e 27% a 45% para filmes produzidos a partir de IPS comerciais.

Com a adição das emulsões houve uma ligeira queda da solubilidade nos filmes GT e GS, porém não houve diferença significativa para o filme GC (Tabela 35). Vários autores relatam uma diminuição na solubilidade de filmes biopoliméricos com a incorporação de

emulsões (Lin *et al.*, 2023; Roy; Rhim, 2021; Sun *et al.*, 2021). Tal redução na solubilidade dos filmes está relacionada a presença de compostos hidrofóbicos, como o óleo e a própria PVB. Comparando-se os emulsificantes, observa-se que apenas o GC apresentou diferença significativa, com uma solubilidade superior.

5.7.9 Permeabilidade ao vapor de água (PVA)

Os filmes de IPS, com ou sem emulsão, se mostraram sendo fraca barreira ao vapor de água, com PVA em torno de 0,45 g.mm/m².h.kPa. Ou seja, a adição das emulsões não afetou significativamente esta propriedade (Tabela 35). Similarmente a este estudo, Otoni *et al.* (2016) relataram a não influência da adição de emulsões com gotas em tamanho micro, carregadas de carvacrol, na PVA de filmes à base de IPS. Isto pode ocorrer devido ao efeito plastificante causado pela adição da emulsão nos filmes, o que leva a um enfraquecimento de ligações dissulfídicas e de hidrogênio na matriz de IPS (Otoni *et al.*, 2016).

Roy e Rhim (2021) também não observaram diferença significativa na PVA de filmes à base de blenda gelatina/agar incorporados de emulsões Pickering. Ghoshal e Shivani (2022) observaram até mesmo um aumento na PVA de filmes formados por concentrado proteico de soro de leite e amido de tamarindo adicionados de emulsões contendo óleo essencial de tomilho. Contrariamente, Zhao *et al.* (2023) observaram que houve uma diminuição significativa na PVA de filmes ativos à base de IPS adicionados de emulsões A/O produzidas com diferentes emulsificantes, mas, alguns emulsificantes não apresentaram diferenças significativas entre si, mesmo que os tamanhos de gota das emulsões tenham sido diferentes. Aqueles autores atribuíram esse comportamento ao efeito sinérgico do grau de migração do óleo e o tamanho de gota da emulsão além da boa distribuição das gotas pela matriz (Zhao *et al.*, 2023). A permeabilidade ao vapor de água dos filmes incorporados de emulsões depende da concentração, do tamanho de gota, do tipo de lipídio e do emulsificante utilizado na emulsão (Otoni *et al.*, 2016)

5.7.10 Propriedades mecânicas

5.7.10.1 Teste de tração uniaxial

A incorporação das emulsões encapsulando PVBT não influenciou a TR ($p > 0,5$) dos filmes à base de IPS (Tabela 36). Avaliando o módulo elástico, o filme SS apresentou o maior ME e o ST o menor. Na ER, houve um aumento significativo para os filmes ativos em comparação ao filme controle S, sendo o maior valor para o filme ST ($189,8 \pm 11,2\%$), seguindo do SS ($135,7 \pm 9,5\%$) e do SC ($122,6 \pm 13,2\%$) (Tabela 36).

Tabela 36 – Tensão na ruptura (TR), alongação na ruptura (ER) e módulo elástico (ME) de filmes à base de isolado proteico de soja controle (S) e incorporados de emulsão encapsulando própolis vermelha bruta triturada produzida com Tween 80 (ST), saponina (SS) e caseinato de sódio (SC).

Filme	TR (MPa)	ER (%)	ME (MPa)
S	$4,2 \pm 0,2^a$	$103,1 \pm 12,5^c$	$1,5 \pm 0,1^{a,b}$
ST	$3,7 \pm 0,2^a$	$189,8 \pm 11,2^a$	$0,9 \pm 0,1^b$
SS	$4,9 \pm 0,9^a$	$135,7 \pm 9,5^b$	$1,9 \pm 0,4^a$
SC	$3,8 \pm 0,5^a$	$122,6 \pm 13,2^{b,c}$	$1,5 \pm 0,2^{a,b}$

Fonte: Própria autoria.

A emulsão T causou um efeito plastificante no filme de IPS, com uma pequena diminuição da TR, mesmo que não significativa, e o aumento de ER (Tabela 36). A emulsão T atuou como um plastificante, o qual interfere nas ligações dissulfídicas e de hidrogênio dos filmes, causando uma redução na sua rigidez e um aumento na sua alongação (Otoni *et al.*, 2016). Zhao *et al.* (2023) observaram um efeito plastificante, com a diminuição de RT e aumento de ER em filmes de IPS adicionados de emulsões produzidas com diferentes emulsificantes. O mesmo comportamento foi observado por Otoni *et al.*, (2016) na incorporação de emulsões com tamanhos de gota nano e micro em filmes de IPS. O aumento na ER de filmes à base de IPS incorporados de emulsões está relacionado a presença de lipídios e emulsificantes, que são capazes de enfraquecer as ligações intermoleculares entre as cadeias poliméricas, influenciando nas propriedades de extensibilidade dos filmes (Carpiné *et al.*, 2016).

Quando comparadas entre os filmes ativos, filme SS foi o que apresentou a maior resistência, seguido de SC e ST. Já na ER, observou-se que ST apresentou o maior ER, seguido de SS e SC. Estes efeitos podem ter ocorrido devido às diferenças de tamanho de gota e migração destas para a superfície do filme. Como visto na seção 5.5.2, os diâmetros médios de gota das emulsões S e C foram maiores que as da T. Zhao *et al.* (2023) observou o mesmo efeito em filmes de IPS incorporados de emulsões A/O produzidas com diferentes emulsificantes. Os

emulsificantes que produziram emulsões com menores diâmetros de gota produziram filmes com menor TR e maior ER, enquanto que os filmes com maiores tamanhos de gota, resultaram em filmes com maiores TR e menores ER (Zhao *et al.*, 2023). A porosidade dos filmes também pode afetar a sua TR, como o filme ST apresentou uma maior porosidade em sua microestrutura interna (Figura 37), isso pode levar a uma menor resistência do filme. Uma maior porosidade e descontinuidade da matriz polimérica, pode afetar a rigidez da rede de proteínas do filme, resultando em uma menor TR (Zhao *et al.*, 2023).

5.7.10.2 Testes de perfuração

Não se observou diferença significativa na FP, que permaneceu em torno de 5,6 N, mas houve um aumento na DP para os filmes adicionados de emulsão, com o maior DP para o filme ST (Tabela 37). Estes resultados estão de acordo com o observado no teste de tração, no qual observou-se filmes mais extensíveis com a adição das emulsões (Tabela 36).

Tabela 37 – Força máxima de perfuração (FP) e deformação na perfuração (DP) de filmes à base de isolado proteico de soja controle (S) e incorporados de emulsão encapsulando própolis vermelha bruta triturada produzida com Tween 80 (ST), saponina (SS) e caseinato de sódio (SC).

Filme	FP (N)	DP (%)
S	5,5 ± 0,3 ^a	6,9 ± 0,5 ^b
ST	5,4 ± 0,8 ^a	9,3 ± 0,9 ^a
SS	5,9 ± 0,9 ^a	7,8 ± 0,8 ^{a,b}
SC	5,7 ± 0,1 ^a	8,2 ± 0,7 ^{a,b}

Fonte: Própria autoria.

Reyes, Landgraf e Sobral (2021) observaram um aumento na FP e na DP de filmes à base de gelatina incorporados de extrato etanólico de própolis vermelha. O mesmo comportamento foi observado por Alexandre *et al.* (2016) em filmes de gelatina incorporados de óleo essencial de gengibre.

5.7.11 Propriedades ópticas

5.7.11.1 Parâmetros de cor e opacidade

O filme controle (S) apresentou uma luminosidade alta ($L^* = 88,1 \pm 0,2$), parâmetro a^* perto do zero ($-3,4 \pm 0,1$) e b^* relativamente elevado ($14,4 \pm 0,6$), indicando uma coloração amarelada (Tabela 38), conforme se pode observar na Figura 36. Esta coloração dos filmes era esperada já que o isolado proteico de soja comercial se apresenta como um pó de coloração amarela (Galus, 2018). Outros autores observaram valores de parâmetros L^* , a^* e b^* semelhantes aos encontrados neste trabalho (Jiang *et al.*, 2023; Wang *et al.*, 2016; Zhao *et al.*, 2023).

Com a incorporação das emulsões, observa-se que a luminosidade (L^*) diminuiu significativamente, o parâmetro a^* aumentou, passando para um valor de cor tendendo ao vermelho, e o parâmetro b^* também aumentou, tendendo para uma cor mais amarelada (Tabela 38). Estas alterações estão relacionadas à incorporação das emulsões, que apresentaram altos valores de a^* e b^* , devido à presença da PVBT (Tabela 20).

Tabela 38 – Parâmetros de cor (L^* , a^* , b^*), diferença de cor (ΔE^*) e opacidade de filmes à base de isolado proteico de soja controle (S) e incorporados de emulsão encapsulando própolis vermelha bruta triturada produzida com Tween 80 (ST), saponina (SS) e caseinato de sódio (SC).

Filme	L^*	a^*	b^*	ΔE^*	Opacidade
S	$88,1 \pm 0,2^a$	$-3,4 \pm 0,1^b$	$14,4 \pm 0,6^c$	$14,5 \pm 0,6^c$	$1,8 \pm 0,4^c$
ST	$74,0 \pm 2,4^c$	$4,9 \pm 1,2^a$	$26,5 \pm 1,8^a$	$32,2 \pm 2,8^a$	$4,8 \pm 0,6^a$
SS	$73,7 \pm 0,6^c$	$5,3 \pm 0,7^a$	$28,4 \pm 1,7^a$	$34,2 \pm 1,2^a$	$5,9 \pm 0,6^a$
SC	$77,9 \pm 0,2^b$	$3,7 \pm 0,1^a$	$22,1 \pm 0,4^b$	$26,4 \pm 0,3^b$	$3,1 \pm 0,3^b$

Fonte: Própria autoria.

Reyes, Landgraf e Sobral (2021) também observaram uma diminuição na luminosidade e um aumento dos parâmetros a^* e b^* em filmes de gelatina incorporados de extrato etanólico de própolis, sendo estes resultados atribuídos à presença da própolis vermelha. A cor dos filmes incorporados de compostos ativos está diretamente relacionada ao tipo de compostos adicionado ao filme, bem como à presença de outros componentes como emulsificantes (Mendes *et al.*, 2020).

Comparando-se os emulsificantes, o filme SC apresentou o menor L^* e b^* , porém não houve diferença significativa no parâmetro a^* . As diferenças encontradas entre filmes adicionados com as emulsões podem ser atribuídas às colorações próprias de cada emulsão (Tabela 20). Zhao *et al.* (2023) observaram uma diminuição no L^* e aumento nos parâmetros

a* e b* de filmes de IPS adicionados de emulsão A/O estabilizadas com diferentes emulsificantes, porém, não observou grande interferência destes nesta propriedade.

A opacidade do filme de IPS aumentou significativamente com a adição das emulsões (Tabela 38). Entre os diferentes emulsificantes, os filmes com maiores opacidades foram ST e SS, sem diferença significativa entre eles, seguidos do filme SC. Zhao *et al.* (2023) relataram uma diminuição na transparência de filmes de IPS, incorporados de emulsão A/O e tal efeito foi distinto para diferentes emulsificantes utilizados na estabilização das emulsões. As diferenças foram atribuídas ao tamanho de gota e migração de óleo, que afetam diretamente as propriedades ópticas dos filmes (Zhao *et al.*, 2023).

5.7.11.2 Brilho

O brilho foi medido na superfície de contato com o ar e nos ângulos de 20° e 60°. Em ambos os ângulos testados foi possível observar uma diminuição significativa dos valores de brilho com a incorporação das emulsões (Tabela 39). Como o brilho da superfície de um filme está relacionado à sua rugosidade (Flaker *et al.*, 2015; Villalobos *et al.*, 2005), a migração das gotas de óleo para a superfície dos filmes de IPS (Figura 37) contribuíram para o aumento da rugosidade da superfície e, conseqüentemente, para a diminuição do seu brilho.

Tabela 39 – Brilho a 20° e 60° da superfície de contato com o ar de filmes à base de isolado proteico de soja controle (S) e incorporados de emulsão encapsulando própolis vermelha bruta triturada produzida com Tween 80 (ST), saponina (SS) e caseinato de sódio (SC).

Filme	20°	60°
S	28,2 ± 3,2 ^a	76,8 ± 4,0 ^a
ST	13,2 ± 0,2 ^b	51,7 ± 2,0 ^b
SS	3,7 ± 0,7 ^c	27,8 ± 2,3 ^d
SC	6,8 ± 1,0 ^c	35,8 ± 2,9 ^c

Fonte: Própria autoria.

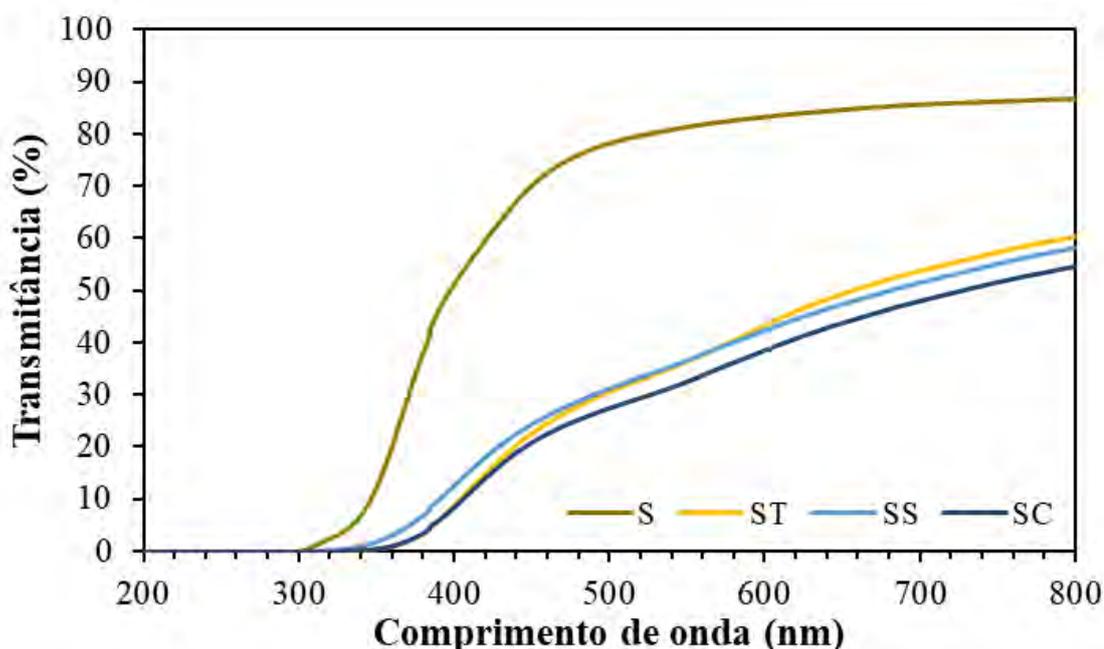
Comparando-se os emulsificantes, o que apresentou o maior brilho à 20° foi o filme ST e os menores valores os filmes SS e SC, sem diferença significativa entre estes (Tabela 39). Comparando-se o observado nas micrografias (Figura 37), os filmes SS e SC foram os que apresentaram maior concentração de gotas de óleo na superfície e com tamanhos de gota maior, o que pode ter contribuído para a diminuição do brilho, já que este está relacionado a rugosidade

da superfície. No ângulo de 60°, houve o mesmo comportamento, exceto pelo fato de que o filme SS apresentou um valor de brilho significativamente menor do que o SC. Outros autores têm observado a diminuição do brilho em filmes adicionados de emulsões, sendo atribuído ao aumento da rugosidade da superfície do filme (Dammak *et al.*, 2017a; Dammak; Sobral, 2019; Tessaro *et al.*, 2021).

5.7.11.3 Propriedades de barreira a luz UV/Visível

Os filmes à base de IPS apresentaram barreira à luz UV (Figura 42). Os filmes S apresentam uma barreira total à luz UV até 300 nm, devido a presença de aminoácidos que tem a capacidade de absorção da luz UV, dentre os quais estão a tirosina, fenilalanina e triptofano (Guerrero *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2016), e até 360 nm para os filmes ativos, devido a presença de compostos fenólicos da PVBT (Belitz; Grosch; Schieberle, 2009).

Figura 42 – Espectros UV/Visível dos filmes à base de isolado proteico de soja controle (S) e incorporados de emulsão encapsulando própolis vermelha bruta triturada produzida com Tween 80 (ST), saponina (SS) e caseinato de sódio (SC).



Fonte: Própria autoria.

Na faixa de comprimento de onda da luz visível, o filme controle S apresentou uma alta transmitância, a qual é diminuída com a adição das emulsões (Figura 42), sem grandes diferenças na barreira à luz visível, sendo que os três emulsificantes utilizados para estabilizar as emulsões apresentaram praticamente o mesmo comportamento. Além do efeito da adição das

emulsões na matriz biopolimérica, que tem sido relatado por diversos autores (Agudelo-Cuartas *et al.*, 2020; Jahromi; Niakousari; Golmakani, 2022; Oun; Shin; Kim, 2022), a própolis vermelha também pode ser responsável por esta diminuição, como observado por Reyes, Landgraf e Sobral (2021), sendo que os compostos fenólicos presentes na própolis possuem a capacidade de absorção da luz na região do visível.

5.7.12 Atividade antioxidante

Os resultados das análises de compostos fenólicos totais, pelo método de Folin-Ciocalteu, e da atividade antioxidante dos filmes ativos à base de IPS, determinados pelos métodos FRAP e ABTS^{•+}, demonstraram uma quantidade elevada de compostos fenólicos totais e atividade antioxidante no filme controle (Tabela 40). Resultados similares foram observados em outros trabalhos com filmes à base de proteínas de soja (Echeverría *et al.*, 2016; Paglione *et al.*, 2019; Wang *et al.*, 2016). Alguns aminoácidos presentes nas proteínas de soja apresentam cadeias fenólicas, como triptofano, tirosina e fenilalanina, que podem reagir com o reagente Folin-Ciocalteu gerando resultado positivo (Wang *et al.*, 2016). Além disso os peptídeos glicinina e β -conglucina, presentes na soja e, conseqüentemente, nos seus derivados (Vasconcellos *et al.*, 2014) e isoflavonas, ácido clorogênico, caféico e ferúlico presentes, em sua maioria, na forma glicosilada, no isolado de proteína de soja (Echeverría *et al.*, 2016), podem contribuir para a atividade antioxidante dos filmes controle.

Tabela 40 – Compostos fenólicos totais e atividade antioxidante pelos métodos de ABTS^{•+} (2,2'-azino-bis(3-etilbenzoatiazolin)-6-ácido sulfônico) e FRAP (método de redução do íon férrico) de filmes à base de isolado proteico de soja controle (S) e incorporados de emulsão encapsulando própolis vermelha bruta triturada produzida com Tween 80 (ST), saponina (SS) e caseinato de sódio (SC).

Filme	Compostos fenólicos totais (mg AGE/g)	ABTS ^{•+} (mg TE/g)	FRAP	
			(mg TE/g)	(mg FeSO ₄ /g)
S	1,84 ± 0,11 ^b	5,21 ± 0,34 ^b	1,22 ± 0,09 ^c	2,44 ± 0,21 ^c
ST	4,17 ± 0,18 ^a	12,64 ± 0,65 ^a	4,10 ± 0,21 ^a	8,85 ± 0,46 ^a
SS	4,12 ± 0,07 ^a	11,50 ± 0,69 ^a	3,09 ± 0,27 ^b	6,61 ± 0,59 ^b
SC	4,19 ± 0,12 ^a	12,22 ± 0,68 ^a	3,73 ± 0,33 ^{a,b}	8,06 ± 0,92 ^{a,b}

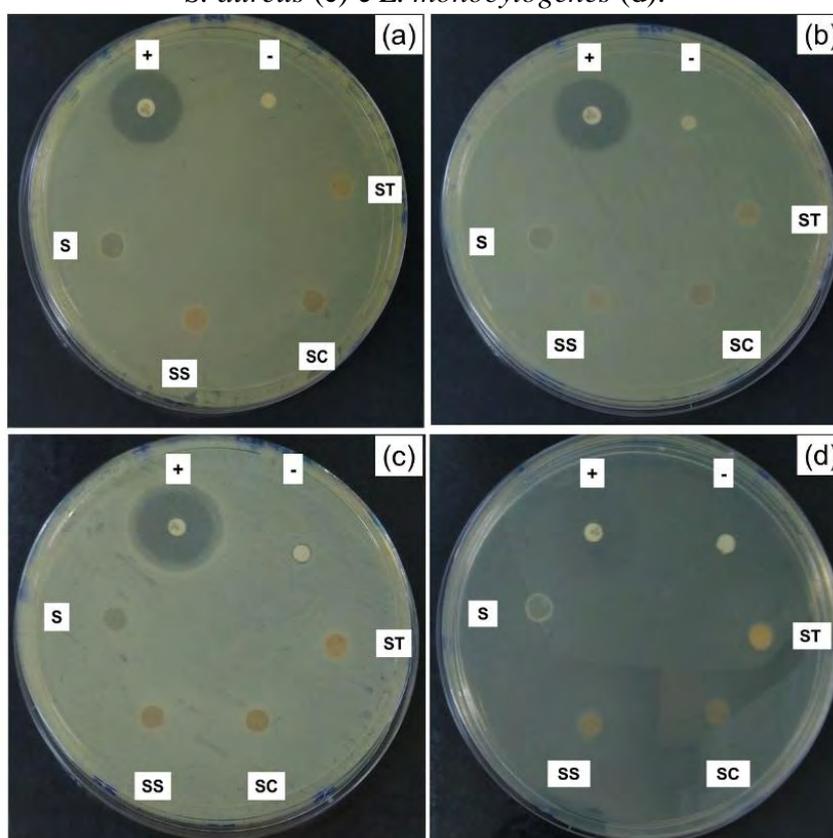
AGE = ácido gálico equivalente; CE = catequina equivalente; QE = quercetina equivalente; TE = Trolox equivalente. Fonte: Própria autoria.

A adição das emulsões aumentou significativamente o conteúdo de compostos fenólicos totais e a atividade antioxidante dos filmes à base de IPS (Tabela 40), resultado esperado pelo fato de as mesmas serem carreadoras da PVBT e apresentarem atividade antioxidante. Comparando-se os diferentes emulsificantes, observa-se que não houve diferença significativa entre eles, assim como não houve nas emulsões (Tabela 23). Filmes adicionados de extrato etanólico de própolis têm sido relatados com atividade antioxidante (Chang-Bravo; López-Córdoba; Martino, 2014; Hodel *et al.*, 2022; Reyes; Landgraf; Sobral, 2021).

5.7.13 Atividade antimicrobiana

Os resultados das análises dos filmes ativos à base de IPS apresentaram um comportamento semelhante aos dos filmes de gelatina, sem a presença de halo de inibição para nenhuma das bactérias testadas (Figura 43).

Figura 43 – Atividade antimicrobiana por teste de difusão em disco de filmes à base de isolado proteico de soja controle (S) e incorporados de emulsão encapsulando própolis vermelha triturada produzida com Tween 80 (ST), saponina (SS) e caseinato de sódio (SC), para o controle positivo (+) e negativo (-) e para as bactérias *E. coli* (a), *Salmonella* (b), *S. aureus* (c) e *L. monocytogenes* (d).



Fonte: Própria autoria.

Nas emulsões carregadas de PVBT foi possível observar a formação de halo de inibição para as bactérias Gram (+), *S. aureus* e *L. monocytogenes* (Figura 27), mas nos filmes a concentração dos compostos ativos é muito mais baixa do que a adicionada nas emulsões, o que interfere no seu efeito. Outra causa seria a maior dificuldade de os compostos se difundirem através do ágar, já que eles estão encapsulados tanto pela emulsão, quanto pela matriz biopolimérica (Tessaro *et al.*, 2021). Contrariamente a este resultado, Paglione *et al.* (2019) relataram um maior halo de inibição em filmes ativos à base de proteína concentrada de soja adicionados de óleo essencial de orégano microencapsulado por gelificação iônica do que filmes adicionados do óleo essencial livre. Aqueles autores atribuíram tal efeito ao fato da alteração na taxa de liberação e na deformação das microcápsulas que auxiliaram na difusão do óleo essencial pelo ágar.

Como já abordado nesta tese, filmes ativos adicionados de própolis vermelha na forma de extrato etanólico têm demonstrado efeitos antimicrobianos contra *S. aureus* (Hodel *et al.*, 2022; Reyes; Landgraf; Sobral, 2021) e contra *S. enteritidis* (Reyes; Landgraf; Sobral, 2021) e até mesmo com efeitos antimicrobianos quando aplicados em alimentos (Costa *et al.*, 2014). Entretanto, como a própolis vermelha foi aplicada na forma de extrato etanólico, tanto a concentração adicionada pode ser maior do que a utilizada neste trabalho quanto a difusão dos compostos ativos pelo ágar pode ser facilitada.

6 CONCLUSÕES

A própolis vermelha bruta apresentou coloração tendendo ao vermelho escuro, mas depois de triturada, sua coloração aparentava vermelho alaranjado. Dentre suas propriedades físico-química tem o fato de ter apresentado a formação de polimorfos após aquecimento e resfriamento e uma temperatura de fusão em, aproximadamente, 60°C, parâmetro importante para a produção das emulsões.

Nas emulsões produzidas com emulsificante Tween 80, a concentração deste emulsificante afetou a estabilidade, o diâmetro médio de gota e o *span* das emulsões. Já o número de ciclos de homogeneização afetou somente o diâmetro médio de gota. A concentração de PGPR na fase óleo não afetou nenhuma das variáveis dependentes, a não ser o efeito da interação com a concentração de Tween 80 no diâmetro médio de gota.

Nas emulsões produzidas com saponina, o número de ciclos de homogeneização afetou sua estabilidade e a concentração de emulsificante afetou seu diâmetro médio. Para a produção de emulsões com caseinato de sódio, somente a concentração deste emulsificante foi estudada, apresentando efeito na estabilidade, no diâmetro médio de gota e no valor de *span*. As melhores emulsões foram selecionadas com base na sua maior estabilidade e menor diâmetro médio de gota.

As emulsões com Tween 80 apresentaram o maior índice de estabilidade e menor diâmetro médio de gota, enquanto a de saponina apresentou a menor estabilidade e tamanho de gota intermediário. Já a emulsão com caseinato de sódio apresentou uma estabilidade intermediária e maior diâmetro médio de gota. As emulsões, produzidas com os três emulsificantes, apresentaram coloração característica da própolis vermelha bruta triturada e apresentaram um comportamento reológico característico de fluidos newtonianos. A diferença está no fato de que as emulsões produzidas com saponina e caseinato de sódio apresentaram uma tensão de escoamento inicial.

Todas emulsões apresentaram boa atividade antioxidante, comparável aos extratos etanólicos de própolis vermelha. Quanto a atividade antimicrobiana, apenas foi observado halo de inibição contra as bactérias Gram-positivas *S. aureus* e *L. monocytogenes*.

Os filmes ativos à base de gelatina apresentaram uma estrutura porosa interna e a formação de gotas de óleo na sua superfície, o que pode ter aumentado a sua rugosidade superficial. Com isso, o brilho e o ângulo de contato de água diminuíram, não apresentando influência no tipo de emulsificante da emulsão. A permeabilidade ao vapor de água não foi

afetada. A incorporação das emulsões produziu filmes mais resistentes, com maior tensão na ruptura e módulo elástico. A elongação na ruptura aumentou com a adição das emulsões produzidas com Tween 80 e saponina, porém, diminuiu para a emulsão produzida com caseinato de sódio. Os filmes ativos apresentaram coloração característica das emulsões e mais opacos, sendo o filme mais opaco o incorporado de emulsão com saponina. Consequentemente, eles apresentaram uma boa barreira à luz UV-vivível, sendo o filme mais opaco o que apresentou a maior barreira.

Os filmes ativos à base de isolado proteico de soja apresentaram uma maior quantidade de gotas de óleo na sua superfície e estrutura interna também porosa. A incorporação das emulsões diminuiu o ângulo de contato de água apenas do filme incorporado com a emulsão produzida com Tween 80. A resistência dos filmes ativos não foi afetada pelas emulsões, porém, a elongação na ruptura aumentou para todas as emulsões. Quanto a aparência, os filmes ativos apresentaram coloração característica das emulsões encapsulando a própolis vermelha bruta triturada e maior opacidade, sendo o mais opaco o filme incorporado com a emulsão produzida com saponina. Os filmes ativos apresentaram maior barreira à luz UV/visível do que o filme controle, mas não houve diferença entre os tipos de emulsificantes.

Ambas as matrizes apresentaram atividade antioxidante quando as emulsões foram incorporadas aos filmes. Na atividade antimicrobiana, nenhum dos filmes ativos apresentou halo de inibição para nenhuma das bactérias testadas, apesar de as emulsões terem apresentado atividade contra as bactérias Gram-positivas.

Pode-se concluir que é possível produzir emulsões O/A encapsulando a própolis vermelha bruta triturada com uma boa estabilidade e que o emulsificante Tween 80 é o mais efetivo nesta produção e estabilização. Os filmes ativos incorporados destas emulsões apresentaram características interessantes, principalmente as mecânicas e de barreira à luz, para seu uso como embalagem ativa de alimentos.

Referências

- ACEVEDO-FANI, A. *et al.* Edible films from essential-oil-loaded nanoemulsions: Physicochemical characterization and antimicrobial properties. **Food Hydrocolloids**, v. 47, p. 168–177, 2015.
- AGUDELO-CUARTAS, C. *et al.* Characterization of whey protein-based films incorporated with natamycin and nanoemulsion of α -tocopherol. **Heliyon**, v. 6, n. 4, p. e03809, 2020.
- ALDANA-MEJÍA, J. A. *et al.* A validated HPLC-UV method for the analysis of phenolic compounds in Brazilian red propolis and *Dalbergia ecastaphyllum*. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 198, p. 114029, 2021.
- ALENCAR, S. M. *et al.* Chemical composition and biological activity of a new type of Brazilian propolis: Red propolis. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 113, n. 2, p. 278–283, 2007.
- ALEXANDRE, E. M. C. *et al.* Gelatin-based films reinforced with montmorillonite and activated with nanoemulsion of ginger essential oil for food packaging applications. **Food Packaging and Shelf Life**, v. 10, p. 87–96, 2016.
- ALIZADEH, L. *et al.* Characterization of sodium caseinate/Hydroxypropyl methylcellulose concentrated emulsions: Effect of mixing ratio, concentration and wax addition. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 128, p. 796–803, 2019.
- ALMASI, H.; AZIZI, S.; AMJADI, S. Development and characterization of pectin films activated by nanoemulsion and Pickering emulsion stabilized marjoram (*Origanum majorana* L.) essential oil. **Food Hydrocolloids**, v. 99, p. 105338, 2020.
- ANDRADE, J. K. S. *et al.* Development and characterization of microencapsules containing spray dried powder obtained from Brazilian brown, green and red propolis. **Food Research International**, v. 109, p. 278–287, 2018.
- ANJUM, S. I. *et al.* Composition and functional properties of propolis (bee glue): A review. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 26, n. 7, p. 1695–1703, 2019.
- ARELLANO, S. *et al.* Essential oil microemulsions inactivate antibiotic-resistant *Salmonella* Newport and spoilage bacterium *Lactobacillus casei* on Iceberg lettuce during 28-day storage at 4°C. **Food Control**, v. 130, p. 108209, 2021.
- ARTIGA-ARTIGAS, M. *et al.* Influence of essential oils and pectin on nanoemulsion formulation: A ternary phase experimental approach. **Food Hydrocolloids**, v. 81, p. 209–219, 2018.
- ASTM - American Society of Testing and Materials. ASTM-D224-16 - Standard Practice for Calculation of Color Tolerances and Color Differences from Instrumentally Measured Color Coordinates. In: **Annual book of ASTM Standards**. Philadelphia, PA, USA, 2016.
- ASTM - American Society of Testing and Materials. ASTM-D2457-03 - Standard Test

Method for Specular Gloss of Plastic Films and Solid Plastics. In: **Annual book of ASTM Standards**. West Conshohocken, PA, USA, 2003.

ASTM - American Society of Testing and Materials. ASTM-F1306 - Standard Test Method for Slow Rate Penetration Resistance of Flexible Barrier Films and Laminates. In: **Annual book of ASTM Standards**. West Conshohocken, PA, USA, 2008.

ASTM - American Society of Testing and Materials. ASTM D882-02 - Standard test method for tensile properties of thin plastics sheeting. In: **Annual book of ASTM Standards**. West Conshohocken, PA, USA, 2002.

ASTM - American Society of Testing and Materials. ASTM E96-96 - Standard test method for water vapor transmission materials. In: **Annual book of ASTM Standards**. Philadelphia, PA, USA, 1996.

ATARÉS, L.; CHIRALT, A. Essential oils as additives in biodegradable films and coatings for active food packaging. **Trends in Food Science & Technology**, v. 48, p. 51–62, 2016.

AW, Y. Z. *et al.* Cellulose nanocrystal (CNC)-stabilized Pickering emulsion for improved curcumin storage stability. **LWT - Food Science and Technology**, v. 159, p. 113249, 2022.

BANZATO, T. P. *et al.* Antiproliferative flavanoid dimers isolated from Brazilian red propolis. **Journal of Natural Products**, v. 83, n. 6, p. 1784–1793, 2020.

BARREIROS, Y. *et al.* Xanthan gum-based film-forming suspension containing essential oils: Production and in vitro antimicrobial activity evaluation against mastitis-causing microorganisms. **LWT - Food Science and Technology**, v. 153, p. 112470, 2022.

BELITZ, H. D.; GROSCH, W.; SCHIEBERLE, P. **Food Chemistry**. 4. ed. Berlin: Springer, 2009.

BENZIE, I. F. F.; STRAIN, J. J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: The FRAP assay. **Analytical Biochemistry**, v. 239, n. 1, p. 70–76, 1996.

BIGI, F. *et al.* Characterization of chitosan-hydroxypropyl methylcellulose blend films enriched with nettle or sage leaf extract for active food packaging applications. **Food Hydrocolloids**, v. 120, p. 106979, 2021.

BISPO JÚNIOR, W. *et al.* Atividade antimicrobiana de frações da própolis vermelha de Alagoas, Brasil. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 33, n. 1, p. 3–10, 2012.

BOEIRA, C. P. *et al.* Effect of corn stigma extract on physical and antioxidant properties of biodegradable and edible gelatin and corn starch films. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 208, p. 698–706, 2022.

BONILLA, J. *et al.* Antioxidant potential of eugenol and ginger essential oils with gelatin/chitosan films. **Food Bioscience**, v. 23, p. 107–114, 2018.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento. Instrução Normativa nº 3, de 19 de janeiro de 2001: Aprova os regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade de

Apitoxina, Cera de Abelha, Geleia Real, Geleia Real Liofilizada, Pólen Apícola Própolis e Extrato de Própolis. **Diário Oficial da União**, Poder executivo, Brasília, DF, 2001.

BUENO-SILVA, B. *et al.* Effect of neovestitol–vestitol containing Brazilian red propolis on accumulation of biofilm in vitro and development of dental caries in vivo. **Biofouling**, v. 29, n. 10, p. 1233–1242, 2013.

BUENO-SILVA, B. *et al.* Main pathways of action of Brazilian red propolis on the modulation of neutrophils migration in the inflammatory process. **Phytomedicine**, v. 23, n. 13, p. 1583–1590, 2016.

BUENO-SILVA, B. *et al.* The effect of seasons on Brazilian red propolis and its botanical source: chemical composition and antibacterial activity. **Natural Product Research**, v. 31, n. 11, p. 1318–1324, 2017.

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

CABRAL, I. S. R. *et al.* Composição fenólica, atividade antibacteriana e antioxidante da própolis vermelha brasileira. **Química Nova**, v. 32, n. 6, p. 1523–1527, 2009.

CALEGARI, M. A. *et al.* Propolis from Southwest of Parana produced by selected bees: Influence of seasonality and food supplementation on antioxidant activity and phenolic profile. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 89, n. 1, p. 45–55, 2017.

CAO, T. L.; SONG, K. BIN. Effects of gum karaya addition on the characteristics of loquat seed starch films containing oregano essential oil. **Food Hydrocolloids**, v. 97, p. 105198, 2019.

CARPINÉ, D. *et al.* Effect of the natural surfactant *Yucca schidigera* extract on the properties of biodegradable emulsified films produced from soy protein isolate and coconut oil. **Industrial Crops and Products**, v. 83, p. 364–371, 2016.

CARVALHO, A. A. *et al.* In vivo antitumoural activity and composition of an oil extract of Brazilian propolis. **Food Chemistry**, v. 126, n. 3, p. 1239–1245, 2011.

CAVENDISH, R. L. *et al.* Antinociceptive and anti-inflammatory effects of Brazilian red propolis extract and formononetin in rodents. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 173, p. 127–133, 2015.

CERQUEIRA, M. A. *et al.* Design of bio-nanosystems for oral delivery of functional compounds. **Food Engineering Reviews**, v. 6, p. 1–19, 2013.

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

CHEN, J. *et al.* Determination of the domain structure of the 7S and 11S globulins from soy proteins by XRD and FTIR. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 93, n. 7, p. 1687–1691, 2013.

CHEN, P.; ZHANG, L.; CAO, F. Effects of moisture on glass transition and microstructure of glycerol-plasticized soy protein. **Macromolecular Bioscience**, v. 5, n. 9, p. 872–880, 2005.

CHEN, X. *et al.* Controlled release mechanism of complex bio-polymeric emulsifiers made microspheres embedded in sodium alginate based films. **Food Control**, v. 73, p. 1275–1284, 2017.

CHEVALIER, R. C.; GOMES, A.; CUNHA, R. L. Tailoring W/O emulsions for application as inner phase of W/O/W emulsions: Modulation of the aqueous phase composition. **Journal of Food Engineering**, v. 297, p. 110482, 2021.

CORREA-PACHECO, Z. N. *et al.* Physicochemical characterization and antimicrobial activity of edible propolis-chitosan nanoparticle films. **Progress in Organic Coatings**, v. 137, p. 105326, 2019.

COSTA, S. S. *et al.* Bi-functional biobased packing of the cassava starch, glycerol, licuri nanocellulose and red propolis. **Plos One**, v. 9, n. 11, p. e112554, 2014.

COZMUTA, A. M *et al.* Preparation and characterization of improved gelatin films incorporating hemp and sage oils. **Food Hydrocolloids**, v. 49, p. 144–155, 2015.

CUNHA, M. C. DA *et al.* Propolis extract from different botanical sources in postharvest conservation of papaya. **Acta Scientiarum. Technology**, v. 40, n. 1, p. e31074, 2018.

DAINELLI, D. *et al.* Active and intelligent food packaging: legal aspects and safety concerns. **Trends in Food Science & Technology**, v. 19, p. S103–S112, 2008.

DAMMAK, I. *et al.* Properties of active gelatin films incorporated with rutin-loaded nanoemulsions. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 98, p. 39–49, 2017a.

DAMMAK, I. *et al.* Properties of gelatin-based films incorporated with chitosan-coated microparticles charged with rutin. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 101, p. 643–652, 2017b.

DAMMAK, I. *et al.* Nanoemulsions: Using emulsifiers from natural sources replacing synthetic ones—A review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 19, n. 5, p. 2721–2746, 2020.

DAMMAK, I. *et al.* Advances in biopolymeric active films incorporated with emulsified lipophilic compounds: a review. **RSC Advances**, v. 11, p. 28148–28168, 2021.

DAMMAK, I.; LOURENÇO, R. V.; SOBRAL, P. J. A. Active gelatin films incorporated with Pickering emulsions encapsulating hesperidin: Preparation and physicochemical characterization. **Journal of Food Engineering**, v. 240, n. December 2017, p. 9–20, 2019.

DAMMAK, I.; SOBRAL, P. J. A. Formulation and Stability Characterization of Rutin-Loaded Oil-in-Water Emulsions. **Food and Bioprocess Technology**, v. 10, n. 5, p. 926–939, 2017.

- DAMMAK, I.; SOBRAL, P. J. A. Formulation optimization of lecithin-enhanced pickering emulsions stabilized by chitosan nanoparticles for hesperidin encapsulation. **Journal of Food Engineering**, v. 229, p. 2–11, 2018a.
- DAMMAK, I.; SOBRAL, P. J. A. Effect of different biopolymers on the stability of hesperidin-encapsulating O/W emulsions. **Journal of Food Engineering**, v. 237, p. 33–43, 2018b.
- DAMMAK, I.; SOBRAL, P. J. A. Active gelatin films incorporated with eugenol nanoemulsions: effect of emulsifier type on films properties. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 54, n. 9, p. 2725–2735, 2019.
- DAMMAK, I.; SOBRAL, P. J. A. Curcumin nanoemulsions stabilized with natural plant-based emulsifiers. **Food Bioscience**, v. 43, p. 101335, 2021.
- DAUGSCH, A. *et al.* Brazilian red propolis - Chemical composition and botanical origin. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 5, n. 4, p. 435–441, 2008.
- DEBEAUFORT, F.; QUEZADA-GALLO, J.-A.; VOILLEY, A. Edible films and coatings: Tomorrow's packagings: A review. **Critical Reviews in Food Science**, v. 38, n. 4, p. 299–313, 1998.
- DENAVI, G. *et al.* Effects of drying conditions on some physical properties of soy protein films. **Journal of Food Engineering**, v. 90, n. 3, p. 341–349, 2009.
- DICKINSON, E. Hydrocolloids at interfaces and the influence on the properties of dispersed systems. **Food Hydrocolloids**, v. 17, n. 1, p. 25–39, 2003.
- DINI, H. *et al.* Effect of edible composite film based on chitosan and cumin essential oil-loaded nanoemulsion combined with low-dose gamma irradiation on microbiological safety and quality of beef loins during refrigerated storage. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 164, p. 1501–1509, 2020.
- EBRAHIMI, P. *et al.* Ferulic acid lecithin-based nano-emulsions prepared by using spontaneous emulsification process. **Iranian Journal of Chemistry and Chemical Engineering**, v. 32, n. 3, p. 17–25, 2013.
- ECHEVERRÍA, I. *et al.* Structure, functionality, and active release of nanoclay–soy protein films affected by clove essential oil. **Food and Bioprocess Technology**, v. 9, n. 11, p. 1937–1950, 2016.
- EL-GUENDOZ, S. *et al.* Effect of poplar-type propolis on oxidative stability and rheological properties of O/W emulsions. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 26, n. 8, p. 1073–1082, 2018.
- ELBAZ, N. M. *et al.* Chitosan-based nano-in-microparticle carriers for enhanced oral delivery and anticancer activity of propolis. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 92, p. 254–269, 2016.
- EZZAT, S. M. *et al.* Cytotoxicity, antioxidant, anti-inflammatory activity, and GC-MS

analysis of Egyptian propolis. **Comparative Clinical Pathology**, v. 28, n. 6, p. 1589–1598, 2019.

FANG, Y. *et al.* Tensile and barrier properties of edible films made from whey proteins. **Journal of Food Science**, v. 67, n. 1, p. 188–193, 2002.

FATTAHI, R.; SEYEDAIN-ARDABILI, M. A comparative study on the effect of homogenization conditions on the properties of the film-forming emulsions and the resultant films. **Food Chemistry**, v. 352, p. 129319, 2021.

FÉLIX, M. *et al.* Development of albumen/soy biobased plastic materials processed by injection molding. **Journal of Food Engineering**, v. 125, n. 1, p. 7–16, 2014.

FENG, X. *et al.* Effect of cinnamon essential oil nanoemulsion emulsified by OSA modified starch on the structure and properties of pullulan based films. **LWT - Food Science and Technology**, v. 134, p. 110123, 2020.

FERREIRA, J. C. *et al.* Baccharin and *p*-coumaric acid from green propolis mitigate inflammation by modulating the production of cytokines and eicosanoids. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 278, p. 114255, 2021.

FLAKER, C. H. C. *et al.* Gelatin-based nanocomposite films: A study on montmorillonite dispersion methods and concentration. **Journal of Food Engineering**, v. 167, p. 65–70, 2015.

FRANCHIN, M. *et al.* Neovestitol, an isoflavonoid isolated from Brazilian red propolis, reduces acute and chronic inflammation: involvement of nitric oxide and IL-6. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 1–12, 2016.

FRANCHIN, M. *et al.* Food-grade delivery systems of Brazilian propolis from *Apis mellifera*: From chemical composition to bioactivities in vivo. **Food Chemistry**, v. 432, p. 137175, 2024.

FROZZA, C. O. DA S. *et al.* Chemical characterization, antioxidant and cytotoxic activities of Brazilian red propolis. **Food and Chemical Toxicology**, v. 52, p. 137–142, 2013.

GAHRUIE, H. H. *et al.* Characterization of basil seed gum-based edible films incorporated with *Zataria multiflora* essential oil nanoemulsion. **Carbohydrate Polymers**, v. 166, p. 93–103, 2017.

GALUS, S. Functional properties of soy protein isolate edible films as affected by rapeseed oil concentration. **Food Hydrocolloids**, v. 85, p. 233–241, 2018.

GALVÃO, K. C. S.; VICENTE, A. A.; SOBRAL, P. J. A. Development, characterization, and stability of O/W pepper nanoemulsions produced by high-pressure homogenization. **Food Bioprocess Technology**, v. 11, p. 355–367, 2018.

GANIARI, S.; CHOULITOU, E.; OREOPOULOU, V. Edible and active films and coatings as carriers of natural antioxidants for lipid food. **Trends in Food Science & Technology**, v. 68, p. 70–82, 2017.

GARRIDO, T. *et al.* Preparation and characterization of soy protein thin films: Processing–properties correlation. **Materials Letters**, v. 105, p. 110–112, 2013.

GARTI, N.; MCCLEMENTS, D. J. **Encapsulation technologies and delivery systems for food ingredients and nutraceuticals**. 1 ed. Sawston: Woodhead Publishing, 2012.

GHADETAJ, A.; ALMASI, H.; MEHRYAR, L. Development and characterization of whey protein isolate active films containing nanoemulsions of *Grammosciadium ptrocarpum* Bioss. essential oil. **Food Packaging and Shelf Life**, v. 16, p. 31–40, 2018.

GHOSHAL, G.; SHIVANI. Thyme essential oil nano-emulsion/Tamarind starch/Whey protein concentrate novel edible films for tomato packaging. **Food Control**, v. 138, p. 108990, 2022.

GOMES, A. ; *et al.* Plant protein-based delivery systems: An emerging approach for increasing the efficacy of lipophilic bioactive compounds. **Molecules** **2022**, Vol. **27**, Page **60**, v. 27, n. 1, p. 60, 2021a.

GOMES, A. *et al.* Interactions of β -carotene with WPI/Tween 80 mixture and oil phase: Effect on the behavior of O/W emulsions during in vitro digestion. **Food Chemistry**, v. 341, p. 128155, 2021b.

GONÇALVES, G. M. S.; SREBERNICH, S. M.; SOUZA, J. A. DE M. Stability and sensory assessment of emulsions containing propolis extract and/or tocopheryl acetate. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 47, n. 3, p. 585–592, 2011.

GONTARD, N.; GUILBERT, S.; CUQ, J. Edible wheat gluten films: Influence of the main process variables on film properties using response surface methodology. **Journal of Food Science**, v. 57, n. 1, p. 190–195, 1992.

GONTARD, N.; RING, S. Edible Wheat gluten film: influence of water content on glass transition temperature. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 44, n. 11, p. 3474–3478, 1996.

GUERRERO, P. *et al.* Characterization of soy protein-based films prepared with acids and oils by compression. **Journal of Food Engineering**, v. 107, n. 1, p. 41–49, 2011.

GUZMÁN-GUTIÉRREZ, S. L. *et al.* Mexican propolis: a source of antioxidants and anti-inflammatory compounds, and isolation of a novel chalcone and ϵ -caprolactone derivative. **Molecules**, v. 23, n. 2, p. 334, 2018.

HARNKARNSUJARIT, N. Glass-Transition and Non-equilibrium States of Edible Films and Barriers. In: BHANDARI, B; ROOS, Y. H. **Non-Equilibrium States and Glass Transitions in Foods: Processing Effects and Product-Specific Implications**. Sawston: Woodhead Publishing, 2017. p. 349–377.

HASSAN, B. *et al.* Recent advances on polysaccharides, lipids and protein based edible films and coatings: A review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 109, p. 1095–1107, 2018.

HATANO, A. *et al.* Antioxidant activity and phenolic constituents of red propolis from Shandong, China. **Food Science and Technology Research**, v. 18, n. 4, p. 577–584, 2012.

HODEL, K. V. S. *et al.* Active potential of bacterial cellulose-based wound dressing: analysis of its potential for dermal lesion treatment. **Pharmaceutics**, v. 14, n. 6, p. 1222, 2022.

HU, J. *et al.* Emulsions containing composite (clove, oregano, and cinnamon) essential oils: Phase inversion preparation, physicochemical properties and antibacterial mechanism. **Food Chemistry**, v. 421, p. 136201, 2023.

HUA, L. *et al.* Improving the functionality of chitosan-based packaging films by crosslinking with nanoencapsulated clove essential oil. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 192, p. 627–634, 2021.

IRIGOITI, Y. *et al.* The use of propolis as a functional food ingredient: A review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 115, p. 297–306, 2021.

JAFARI, S. M. *et al.* Re-coalescence of emulsion droplets during high-energy emulsification. **Food Hydrocolloids**, v. 22, n. 7, p. 1191–1202, 2008.

JAHROMI, M.; NIAKOUSARI, M.; GOLMAKANI, M. T. Fabrication and characterization of pectin films incorporated with clove essential oil emulsions stabilized by modified sodium caseinate. **Food Packaging and Shelf Life**, v. 32, p. 100835, 2022.

JANSEN-ALVES, C. *et al.* Propolis microparticles produced with pea protein: Characterization and evaluation of antioxidant and antimicrobial activities. **Food Hydrocolloids**, v. 87, p. 703–711, 2019.

JI, M. *et al.* Physical properties and bioactivities of fish gelatin films incorporated with cinnamaldehyde-loaded nanoemulsions and vitamin C. **LWT-Food Science and Technology**, v. 135, p. 110103, 2021.

JIANG, J. *et al.* Preparation and characterization of soy protein isolate films by pretreatment with cysteine. **Food Chemistry: X**, v. 18, p. 100735, 2023.

JIANG, T.; CHARCOSSET, C. Encapsulation of curcumin within oil-in-water emulsions prepared by premix membrane emulsification: Impact of droplet size and carrier oil type on physicochemical stability and in vitro bioaccessibility. **Food Chemistry**, v. 375, p. 131825, 2022.

JIMÉNEZ-SAELICES, C. *et al.* Chitin Pickering emulsion for oil inclusion in composite films. **Carbohydrate Polymers**, v. 242, p. 116366, 2020.

KACI, M. *et al.* Nanoemulsions and topical creams for the safe and effective delivery of lipophilic antioxidant coenzyme Q10. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 167, p. 165–175, 2018.

KONG, R. *et al.* Development and characterization of corn starch/PVA active films incorporated with carvacrol nanoemulsions. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 164, p. 1631–1639, 2020.

KRALOVA, I.; SJÖBLOM, J. Surfactants used in food industry: A review. **Journal of Dispersion Science and Technology**, v. 30, n. 9, p. 1363–1383, 2009.

LAM, R. S. H.; NICKERSON, M. T. Food proteins: A review on their emulsifying properties using a structure–function approach. **Food Chemistry**, v. 141, n. 2, p. 975–984, 2013.

LIN, L. *et al.* Preparation and characterization of gelatin active packaging film loaded with eugenol nanoparticles and its application in chicken preservation. **Food Bioscience**, v. 53, p. 102778, 2023.

LI, Z.; GAN, W.; HE, X.; LU, H.; ZHANG, Y. Effect of particle size, transparency and light intensity on the color of powder. **IOP Conference Series: Earth and Environmental Science**. 545, 012027, 2020.

LIU, D. *et al.* Corn starch/polyvinyl alcohol based films incorporated with curcumin-loaded Pickering emulsion for application in intelligent packaging. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 188, p. 974–982, 2021a.

LIU, J. *et al.* Effect of cellulose nanocrystal-stabilized cinnamon essential oil Pickering emulsions on structure and properties of chitosan composite films. **Carbohydrate Polymers**, v. 275, p. 118704, 2022.

LIU, T. *et al.* Fabrication and comparison of active films from chitosan incorporating different spice extracts for shelf life extension of refrigerated pork. **LWT - Food Science and Technology**, v. 135, p. 110181, 2021b.

LIU, Z. *et al.* Characterization of a novel konjac glucomannan film incorporated with Pickering emulsions: Effect of the emulsion particle sizes. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 179, p. 377–387, 2021c.

LOPEZ, B. G. C. *et al.* Antimicrobial and cytotoxic activity of red propolis: an alert for its safe use. **Journal of Applied Microbiology**, v. 119, n. 3, p. 677–687, 2015.

LÓPEZ, B. G. C. *et al.* Phytochemical markers of different types of red propolis. **Food Chemistry**, v. 146, p. 174–180, 2014.

MA, Q. *et al.* Physical, mechanical, and antimicrobial properties of chitosan films with microemulsions of cinnamon bark oil and soybean oil. **Food Hydrocolloids**, v. 52, p. 533–542, 2016.

MACHADO, B. A. S. *et al.* Chemical composition and biological activity of extracts obtained by supercritical extraction and ethanolic extraction of brown, green and red propolis derived from different geographic regions in Brazil. **Plos One**, v. 11, n. 1, p. e0145954, 2016.

MARIANO-NASSER, F. A. DE C. *et al.* Modified atmosphere using propolis in post-harvested ‘Eva’ organic apple. **Emirates Journal of Food and Agriculture**, v. 32, n. 3, p. 172–180, 2020.

MARTÍNEZ-GONZÁLEZ, M. DEL C. *et al.* Effect of nanostructured chitosan/propolis coatings on the quality and antioxidant capacity of strawberries during storage. **Coatings**, v.

10, n. 2, p. 90, 2020.

MARTINOTTI, S.; RANZATO, E. Propolis: a new frontier for wound healing? **Burns & Trauma**, v. 3, n. 1, 2015.

McCLEMENTS, D. J. **Food emulsions: Principles, practices, and techniques**. 2nd. ed. Boca Raton : CRC Press, 2004a.

McCLEMENTS, D. J. Protein-stabilized emulsions. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 9, n. 5, p. 305–313, 2004b.

McCLEMENTS, D. J. Advances in edible nanoemulsions: Digestion, bioavailability, and potential toxicity. **Progress in Lipid Research**, v. 81, p. 101081, 2021.

McCLEMENTS, D. J.; BAI, L.; CHUNG, C. Recent advances in the utilization of natural emulsifiers to form and stabilize emulsions. **Food Science and Technology**, v. 8, p. 205–236, 2017.

McCLEMENTS, D. J.; DECKER, E. A.; WEISS, J. Emulsion-based delivery systems for lipophilic bioactive components. **Journal of Food Science**, v. 72, n. 8, p. R109–R124, 2007.

McCLEMENTS, D. J.; JAFARI, S. M. Improving emulsion formation, stability and performance using mixed emulsifiers: A review. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 251, p. 55–79, 2018.

McCLEMENTS, D. J.; RAO, J. Food-grade nanoemulsions: Formulation, fabrication, properties, performance, biological fate, and potential toxicity. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 51, n. 4, p. 285–330, 2011.

MEHMOOD, T. *et al.* Optimization of soya lecithin and Tween 80 based novel vitamin D nanoemulsions prepared by ultrasonication using response surface methodology. **Food Chemistry**, v. 289, n. January, p. 664–670, 2019.

MENDES, J. F. *et al.* Correlating emulsion characteristics with the properties of active starch films loaded with lemongrass essential oil. **Food Hydrocolloids**, v. 100, p. 105428, 2020.

MOHAMED, S. A. A.; EL-SAKHAWY, M.; EL-SAKHAWY, M. A. M. Polysaccharides, protein and lipid -based natural edible films in food packaging: A review. **Carbohydrate Polymers**, v. 238, p. 116178, 2020.

MONTEIL, J. *et al.* Method to prepare aqueous propolis dispersions based on phase separation. **Food Chemistry**, v. 389, p. 133072, 2022.

MORADI, M. *et al.* Characterization of antioxidant chitosan film incorporated with *Zataria multiflora* Boiss essential oil and grape seed extract. **LWT - Food Science and Technology**, v. 46, n. 2, p. 477–484, 2012.

MORENO, M. A. *et al.* Antifungal edible coatings containing Argentinian propolis extract and their application in raspberries. **Food Hydrocolloids**, v. 107, p. 105973, 2020.

- MOZAFARPOUR, R.; KOOCHKEKI, A. Fabrication of emulsion gels based on sonicated grass pea (*Lathyrus sativus* L.) protein as a delivery system for β -carotene: Kinetic modeling and release behavior. **LWT - Food Science and Technology**, v. 184, p. 115020, 2023.
- NASCIMENTO, T. G. *et al.* Comprehensive multivariate correlations between climatic effect, metabolite-profile, antioxidant capacity and antibacterial activity of Brazilian red propolis metabolites during seasonal study. **Scientific Reports - Nature Research**, v. 9, n. 1, p. 1–16, 2019.
- NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS - NCCLS. Performance standards for antimicrobial disc susceptibility test. **7th Ed. Approved Standard**. Wayne, PA, 2000.
- NORCINO, L. B. *et al.* Pectin films loaded with copaiba oil nanoemulsions for potential use as bio-based active packaging. **Food Hydrocolloids**, v. 106, p. 105862, 2020.
- NORI, M. P. *et al.* Microencapsulation of propolis extract by complex coacervation. **LWT - Food Science and Technology**, v. 44, n. 2, p. 429–435, 2011.
- OLDONI, T. L. C. *et al.* Isolation and analysis of bioactive isoflavonoids and chalcone from a new type of Brazilian propolis. **Separation and Purification Technology**, v. 77, n. 2, p. 208–213, 2011.
- OLEWNIK-KRUSZKOWSKA, E. *et al.* Polylactide-based films with the addition of poly(ethylene glycol) and extract of propolis—physico-chemical and storage properties. **Foods**, v. 11, n. 10, p. 1488, 2022.
- OLIVEIRA, P. F. DE *et al.* Comparative evaluation of antiproliferative effects of Brazilian green propolis, its main source *Baccharis dracunculifolia*, and their major constituents artemillin C and baccharin. **Planta medica**, v. 80, n. 6, p. 490–492, 2014.
- OLIVEIRA FILHO, J. G. DE *et al.* New approach in the development of edible films: The use of carnauba wax micro- or nanoemulsions in arrowroot starch-based films. **Food Packaging and Shelf Life**, v. 26, p. 100589, 2020.
- OLIVEIRA, L. F. A. DE M. *et al.* Antioxidant and antimicrobial activity of red propolis embedded mesoporous silica nanoparticles. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 46, n. 7, p. 1199–1208, 2020.
- OMAR, N. A.; SIDIQUE, S. N. M.; AHMAD, F. T. Antifungal properties of water extract propolis coating against anthracnose (*Colletotrichum gloeosporioides*) disease on strawberry (*Fragaria ananassa*). **Malaysian Applied Biology**, v. 49, n. 4, p. 253–260, 2020.
- OMAR, R. M. K. *et al.* Chemical characterisation of Nigerian red propolis and its biological activity against *Trypanosoma Brucei*. **Phytochemical Analysis**, v. 27, n. 2, p. 107–115, 2016.
- OTONI, C. G. *et al.* Edible films from methylcellulose and nanoemulsions of clove bud (*Syzygium aromaticum*) and oregano (*Origanum vulgare*) essential oils as shelf life extenders for sliced bread. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, n. 22, p. 5214–5219,

2014.

OTONI, C. G. *et al.* Mechanical and water barrier properties of isolated soy protein composite edible films as affected by carvacrol and cinnamaldehyde micro and nanoemulsions. **Food Hydrocolloids**, v. 57, p. 72–79, 2016.

OUN, A. A.; SHIN, G. H.; KIM, J. T. Multifunctional poly(vinyl alcohol) films using cellulose nanocrystals/oregano and cellulose nanocrystals/cinnamon Pickering emulsions: Effect of oil type and concentration. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 194, p. 736–745, 2022.

OZDAL, T. *et al.* Investigation of antioxidant capacity, bioaccessibility and LC-MS/MS phenolic profile of Turkish propolis. **Food Research International**, v. 122, p. 528–536, 2019.

PAGLIONE, I. DOS S. *et al.* Comparative study of the properties of soy protein concentrate films containing free and encapsulated oregano essential oil. **Food Packaging and Shelf Life**, v. 22, p. 100419, 2019.

PATEIRO, M. *et al.* Effect of addition of green tea, chestnut and grape extract on the shelf-life of pig liver pâté. **Food Chemistry**, v. 147, p. 386–394, 2014.

PAULO, F. *et al.* Propolis microencapsulation by double emulsion solvent evaporation approach: Comparison of different polymeric matrices and extract to polymer ratio. **Food and Bioproducts Processing**, v. 127, p. 408–425, 2021.

PEREDA, M. *et al.* Chitosan-gelatin composites and bi-layer films with potential antimicrobial activity. **Food Hydrocolloids**, v. 25, n. 5, p. 1372–1381, 2011.

PEREDA, M.; ARANGUREN, M. I.; MARCOVICH S, N. E. Caseinate films modified with tung oil. **Food Hydrocolloids**, v. 24, n. 8, p. 800–808, 2010.

PÉREZ-CÓRDOBA, L. J. *et al.* Physico-chemical, antimicrobial and antioxidant properties of gelatin-chitosan based films loaded with nanoemulsions encapsulating active compounds. **Food Hydrocolloids**, v. 79, p. 544–559, 2018.

PÉREZ-CÓRDOBA, L. J.; SOBRAL, P. J. A. Physical and antioxidant properties of films based on gelatin, gelatin-chitosan or gelatin-sodium caseinate blends loaded with nanoemulsified active compounds. **Journal of Food Engineering**, v. 213, p. 47–53, 2017.

PICCINELLI, A. L. *et al.* Cuban and Brazilian red propolis: Botanical origin and comparative analysis by high-performance liquid chromatography-photodiode array detection/ electrospray ionization tandem mass spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, n. 12, p. 6484–6491, 2011.

POBIEGA, K. *et al.* Growth biocontrol of foodborne pathogens and spoilage microorganisms of food by polish propolis extracts. **Molecules**, v. 24, n. 16, p. 2965, 2019.

POBIEGA, K. *et al.* Prolonging the shelf life of cherry tomatoes by pullulan coating with ethanol extract of propolis during refrigerated storage. **Food and Bioprocess Technology**, v.

13, n. 8, p. 1447–1461, 2020.

PU, Y. *et al.* Advances in propolis and propolis functionalized coatings and films for fruits and vegetables preservation. **Food Chemistry**, v. 414, p. 135662, 2023.

PUJIRAHAYU, N. *et al.* Antibacterial activity of oil extract of Trigona propolis. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 7, n. 6, p. 419–422, 2015.

PULLA-HUILLCA, P. V. *et al.* Wettability of gelatin-based films: The effects of hydrophilic or hydrophobic plasticizers and nanoparticle loads. **Journal of Food Engineering**, v. 297, p. 110480, 2021.

RAMANAUSKIENE, K. *et al.* Analysis of the antimicrobial activity of propolis and lysozyme in semisolid emulsion systems. **Acta Poloniae Pharmaceutica - Drug Research**, v. 66, n. 6, p. 681–688, 2009.

RANJBARYAN, S.; POURFATHI, B.; ALMASI, H. Reinforcing and release controlling effect of cellulose nanofiber in sodium caseinate films activated by nanoemulsified cinnamon essential oil. **Food Packaging and Shelf Life**, v. 21, p. 100341, 2019.

RE, R. *et al.* Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 26, n. 9–10, p. 1231–1237, 1999.

REGUEIRA NETO, M. S. *et al.* Seasonal variation of Brazilian red propolis: Antibacterial activity, synergistic effect and phytochemical screening. **Food and Chemical Toxicology**, v. 107, p. 572–580, 2017.

REIS, C. A.; GOMES, A.; SOBRAL, P. J. A. Films based on biopolymers incorporated with active compounds encapsulated in emulsions : Properties and. **Foods**, v. 12, p. 3602, 2023.

REN, Z. *et al.* Characteristics and in vitro digestion of resveratrol encapsulated in Pickering emulsions stabilized by tea water-insoluble protein nanoparticles. **Food Chemistry: X**, v. 18, p. 100642, 2023.

REYES, L. M.; LANDGRAF, M.; SOBRAL, P. J. A. Gelatin-based films activated with red propolis ethanolic extract and essential oils. **Food Packaging and Shelf Life**, v. 27, p. 100607, 2021.

RHIM, J.-W. *et al.* preparation and properties of biodegradable multilayer films based on soy protein isolate and poly(lactide). **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 45, p. 3059–3066 2006.

RIBEIRO, A. C. B. *et al.* From mango by-product to food packaging: Pectin-phenolic antioxidant films from mango peels. **International Journal of Biological Macromolecules**, 2021.

RIGHI, A. A. *et al.* Brazilian red propolis: unreported substances, antioxidant and antimicrobial activities. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 91, n. 13, p. 2363–2370, 2011.

- ROY, S.; PRIYADARSHI, R.; RHIM, J.-W. Gelatin/agar-based multifunctional film integrated with copper-doped zinc oxide nanoparticles and clove essential oil Pickering emulsion for enhancing the shelf life of pork meat. **Food Research International**, v. 160, p. 111690, 2022.
- ROY, S.; RHIM, J. W. Gelatin/agar-based functional film integrated with Pickering emulsion of clove essential oil stabilized with nanocellulose for active packaging applications. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 627, p. 127220, 2021.
- RUFATTO, L. C. *et al.* Red propolis: Chemical composition and pharmacological activity. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 7, n. 7, p. 591–598, 2017.
- RUFATTO, L. C. *et al.* Brazilian red propolis: Chemical composition and antibacterial activity determined using bioguided fractionation. **Microbiological Research**, v. 214, p. 74–82, 2018.
- SANCHEZ, L. T.; PINZON, M. I.; VILLA, C. C. Development of active edible films made from banana starch and curcumin-loaded nanoemulsions. **Food Chemistry**, v. 371, p. 131121, 2022.
- SANTOS, R. S. DOS *et al.* The effect of carbomer 934P and different vegetable oils on physical stability, mechanical and rheological properties of emulsion-based systems containing propolis. **Journal of Molecular Liquids**, v. 307, p. 112969, 2020.
- SEGUENI, N. *et al.* Review on propolis applications in food preservation and active packaging. **Plants**, v. 12, n. 8, p. 1654, 2023.
- SEIBERT, J. B. *et al.* Development of propolis nanoemulsion with antioxidant and antimicrobial activity for use as a potential natural preservative. **Food Chemistry**, v. 287, p. 61–67, 2019.
- SHAH, B. R.; XU, W.; MRÁZ, J. Fabrication, stability and rheological properties of zein/chitosan particles stabilized Pickering emulsions with antioxidant activities of the encapsulated vit-D3. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 191, p. 803–810, 2021.
- SHARIFI, M.; GOLI, S. A. H.; FAYAZ, G. Exploitation of high-intensity ultrasound to modify the structure of olive oil organogel containing propolis wax. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 54, n. 2, p. 509–515, 2019.
- SHEHATA, M. G. *et al.* Chemical analysis, antioxidant, cytotoxic and antimicrobial properties of propolis from different geographic regions. **Annals of Agricultural Sciences**, v. 65, n. 2, p. 209–217, 2020.
- SHI, Y. *et al.* Nano-emulsion prepared by high pressure homogenization method as a good carrier for Sichuan pepper essential oil: Preparation, stability, and bioactivity. **LWT - Food Science and Technology**, v. 154, p. 112779, 2022.
- SINGLETON, V. L.; ROSSI, J. A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-

phosphotungstic acid reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 16, n. 3, 1965.

SOBRAL, P. J. A. *et al.* Mechanical, water vapor barrier and thermal properties of gelatin based edible films. **Food Hydrocolloids**, v. 15, n. 4–6, p. 423–432, 2001.

SOBRAL, P. J. A.; HABITANTE, A. M. Q. B. Phase transitions of pigskin gelatin. **Food Hydrocolloids**, v. 15, n. 4–6, p. 377–382, 2001.

SOBRAL, P. J. A. Influência da espessura de biofilmes feitos à base de proteínas miofibrilares sobre suas propriedades funcionais. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 35, n. 6, p. 1251–1259, 2000.

SOGUT, E. Active whey protein isolate films including bergamot oil emulsion stabilized by nanocellulose. **Food Packaging and Shelf Life**, v. 23, p. 100430, 2020.

SONG, C. *et al.* Anti-aflatoxic nano-emulsions based on *Monarda didyma* and *Neopallasia pectinata* essential oils as novel green agent for food preservation. **Industrial Crops and Products**, v. 180, p. 114777, 2022.

SOUZA, A. G. *et al.* Starch-based films enriched with nanocellulose-stabilized Pickering emulsions containing different essential oils for possible applications in food packaging. **Food Packaging and Shelf Life**, v. 27, p. 100615, 2021.

SU, J. F. *et al.* Properties of soy protein isolate/poly(vinyl alcohol) blend “green” films: Compatibility, mechanical properties, and thermal stability. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 110, n. 6, p. 3706–3716, 2008.

SUN, H. *et al.* Antibacterial and antioxidant activities of sodium starch octenylsuccinate-based Pickering emulsion films incorporated with cinnamon essential oil. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 159, p. 696–703, 2020.

SUN, X. *et al.* Development of functional gelatin-based composite films incorporating oil-in-water lavender essential oil nano-emulsions: Effects on physicochemical properties and cherry tomatoes preservation. **LWT - Food Science and Technology**, v. 142, p. 110987, 2021.

TALEBI, F. *et al.* Incorporation of spice essential oils into poly-lactic acid film matrix with the aim of extending microbiological and sensorial shelf life of ground beef. **LWT - Food Science and Technology**, v. 96, p. 482–490, 2018.

TAVERNIER, I. *et al.* The Potential of Waxes to Alter the Microstructural Properties of Emulsion-Templated Oleogels. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 120, n. 3, p. 1700393, 2018.

TESSARO, L. **Produção de emulsão dupla A/O/A rica em extrato de folha de pitangueira (*Eugenia uniflora* L.) para aplicação em filmes ativos de gelatina e/ou quitosana**. 2021. 151 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2021.

- TESSARO, L. *et al.* Gelatin and/or chitosan-based films activated with “Pitanga” (*Eugenia uniflora* L.) leaf hydroethanolic extract encapsulated in double emulsion. **Food Hydrocolloids**, v. 113, p. 106523, 2021.
- TESSARO, L. *et al.* Stable and bioactive W/O/W emulsion loaded with “Pitanga” (*Eugenia uniflora* L.) leaf hydroethanolic extract. **Journal of Dispersion Science and Technology**, v. 43, n. 12, p. 1890–1900, 2022.
- TESSARO, L.; MARTELLI-TOSI, M.; SOBRAL, P. J. A. Development of W/O emulsion for encapsulation of “Pitanga” (*Eugenia uniflora* L.) leaf hydroethanolic extract: droplet size, physical stability and rheology. **Food Science and Technology**, v. 42, p. e65320, 2022.
- TONYALI, B. *et al.* Release kinetics of cinnamaldehyde, eugenol, and thymol from sustainable and biodegradable active packaging films. **Food Packaging and Shelf Life**, v. 24, p. 100484, 2020.
- TYLKOWSKI, B. *et al.* Extraction of biologically active compounds from propolis and concentration of extract by nanofiltration. **Journal of Membrane Science**, v. 348, n. 1–2, p. 124–130, 2010.
- VALENCIA, G. A. *et al.* Physical and morphological properties of nanocomposite films based on gelatin and Laponite. **Applied Clay Science**, v. 124–125, p. 260–266, 2016.
- VASCONCELLOS, F. C. S. *et al.* Antimicrobial and antioxidant properties of-conglycinin and glycinin from soy protein isolate. **Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci**, v. 3, n. 8, p. 144–157, 2014.
- VIDAL, O. L. *et al.* Active packaging films containing antioxidant extracts from green coffee oil by-products to prevent lipid oxidation. **Journal of Food Engineering**, v. 312, p. 110744, 2022.
- VILELA, C. *et al.* A concise guide to active agents for active food packaging. **Trends in Food Science & Technology**, v. 80, p. 212–222, 2018.
- VILLALOBOS, R. *et al.* Gloss and transparency of hydroxypropyl methylcellulose films containing surfactants as affected by their microstructure. **Food Hydrocolloids**, v. 19, n. 1, p. 53–61, 2005.
- WAGH, V. D. Propolis: A wonder bees product and its pharmacological potentials. **Advances in Pharmacological Sciences**, v. 2013, p. 12, 2013.
- WANG, D. *et al.* Incorporation of apricot (*Prunus armeniaca*) kernel essential oil into chitosan films displaying antimicrobial effect against *Listeria monocytogenes* and improving quality indices of spiced beef. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 162, p. 838–844, 2020.
- WANG, H. *et al.* Physical and antioxidant properties of flexible soy protein isolate films by incorporating chestnut (*Castanea mollissima*) bur extracts. **LWT - Food Science and Technology**, v. 71, p. 33–39, 2016.

WEIGEL, F. *et al.* Lutein-enriched emulsion-based delivery systems: Influence of emulsifiers and antioxidants on physical and chemical stability. **Food Chemistry**, v. 242, n. July 2017, p. 395–403, 2018.

WU, M. *et al.* ZnO nanoparticles stabilized oregano essential oil Pickering emulsion for functional cellulose nanofibrils packaging films with antimicrobial and antioxidant activity. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 190, p. 433–440, 2021.

XU, F. *et al.* Preparation of cross-linked soy protein isolate-based environmentally-friendly films enhanced by PTGE and PAM. **Industrial Crops and Products**, v. 67, p. 373–380, 2015.

XU, T. *et al.* Characterization of chitosan based polyelectrolyte films incorporated with OSA-modified gum arabic-stabilized cinnamon essential oil emulsions. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 150, p. 362–370, 2020a.

XU, Y. *et al.* Effects of zein stabilized clove essential oil Pickering emulsion on the structure and properties of chitosan-based edible films. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 156, p. 111–119, 2020b.

XU, Y. *et al.* Characterization of chitosan film with cinnamon essential oil emulsion co-stabilized by ethyl-N α -lauroyl-L-arginate hydrochloride and hydroxypropyl- β -cyclodextrin. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 188, p. 24–31, 2021.

YANG, S. J. *et al.* Encapsulation of propolis flavonoids in a water soluble polymer using pressurized carbon dioxide anti-solvent crystallization. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 94, p. 138–146, 2014.

YANG, W. *et al.* Preservation of orange juice using propolis. **Journal of Food Science and Technology**, v. 54, n. 11, p. 3375–3383, 2017.

YANG, Y. *et al.* Formation and stability of emulsions using a natural small molecule surfactant: Quillaja saponin (Q-Naturale®). **Food Hydrocolloids**, v. 30, n. 2, p. 589–596, 2013.

YUAN, D. *et al.* A novel composite edible film fabricated by incorporating W/O/W emulsion into a chitosan film to improve the protection of fresh fish meat. **Food Chemistry**, v. 385, p. 132647, 2022.

ZHAI, X. *et al.* Emulsions stabilized by nanofibers from bacterial cellulose: New potential food-grade Pickering emulsions. **Food Research International**, v. 103, p. 12–20, 2018.

ZHANG, K. *et al.* Development of antimicrobial films with cinnamaldehyde stabilized by ethyl lauroyl arginate and cellulose nanocrystals. **Food Packaging and Shelf Life**, v. 33, p. 100886, 2022a.

ZHANG, W. *et al.* Antibacterial Activity of Chinese red propolis against *Staphylococcus aureus* and MRSA. **Molecules**, v. 27, n. 5, p. 1693, 2022b.

ZHAO, R. *et al.* The physiochemical and preservation properties of anthocyanidin/chitosan

nanocomposite-based edible films containing cinnamon-perilla essential oil pickering nanoemulsions. **LWT - Food Science and Technology**, v. 153, p. 112506, 2022.

ZHAO, Y. *et al.* Effect of W/O pre-emulsion prepared with different emulsifiers on the physicochemical properties of soy protein isolate-based emulsion films. **Food Hydrocolloids**, v. 139, p. 108440, 2023.

ZHISHEN, J.; MENGCHENG, T.; JIANMING, W. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. **Food Chemistry**, v. 64, n. 4, p. 555–559, 1999.

ZHU, Z. *et al.* Comparison of natural and synthetic surfactants at forming and stabilizing nanoemulsions: Tea saponin, Quillaja saponin, and Tween 80. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 536, p. 80–87, 2019.