

UNIVERSIDADE TIRADENTES  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE E AMBIENTE

**Utilização de filmes a base de pectina contendo extrato de  
própolis vermelha para recobrimento de sementes de  
girassol**

**SUELI JOSÉ PEREIRA CORRÊA**

ARACAJU

Abril - 2011

UNIVERSIDADE TIRADENTES  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE E AMBIENTE

**Utilização de filmes a base de pectina contendo extrato de  
própolis vermelha para recobrimento de sementes de  
girassol**

Dissertação de Mestrado submetida  
à banca examinadora como parte  
dos requisitos para a obtenção do  
título de Mestre em Saúde e  
Ambiente, na área de concentração  
em Saúde e Ambiente.

**SUELI JOSÉ PEREIRA CORRÊA**

**Orientadores:**

**Francine Ferreira Padilha, D.Sc.**

**Juliana Cordeiro Cardoso, D.Sc.**

ARACAJU

Abril – 2011

O AUTOR PERMITE A REPRODUÇÃO DE CÓPIAS OU PARTES DESTA DISSERTAÇÃO DE Mestrado SOMENTE PARA PROPÓSITOS ACADÊMICOS E CIENTÍFICOS DESDE QUE A FONTE SEJA CITADA.

C824u Corrêa, Sueli José Pereira

Utilização de filmes a base de pectina contendo extrato de própolis vermelha para recobrimento de sementes de girassol / Sueli José Pereira Corrêa; orientação [de] Francine Ferreira Padilha, Juliana Cordeiro Cardoso. – Aracaju: 2011.

80 f.: il.

Inclui bibliografias  
Dissertação (Mestre em Saúde e Ambiente) – Universidade Tiradentes (UNIT)

**UTILIZAÇÃO DE FILMES A BASE DE PECTINA CONTENDO EXTRATO DE PRÓPOLIS  
VERMELHA PARA RECOBRIMENTO DE SEMENTES DE GIRASSOL**

SUELÍ JOSÉ PEREIRA CORRÊA

DISSERTAÇÃO SUBMETIDA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE  
E AMBIENTE DA UNIVERSIDADE TIRADENTES COMO PARTE DOS  
REQUISITOS NECESSÁRIOS PARA A OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE EM  
SAÚDE E AMBIENTE.

Aprovada por:

---

Francine Ferreira Padilha, D.Sc.  
Orientadora

---

Juliana Cordeiro Cardoso, D.Sc.  
Orientadora

---

Ricardo Luiz Cavalcanti de Albuquerque Júnior, D.Sc.  
Examinador

---

Marcelo Augusto Gutierrez Carnelossi, D.Sc.  
Examinador

ARACAJU

Abril – 2011

*Para minha mãe Maria  
e minha filha Lorena,  
com carinho.*

*Ontem, fiquei horas esquecidas assistindo ao trabalho das formigas, indiferentes a  
quase tudo, na sua meta de construir.*

*E aprendi o quanto é importante fazer.*

*Fazer sempre e de tudo para alcançar os galhos mais altos da árvore da vida e  
melhor se alimentar do fruto ali quase esquecido: a PAZ.*

*Óh Deus!, Torna-me indiferente a tudo que não seja construir um mundo novo, onde  
as pessoas, bichos e coisas existam porque amam e  
entendem o amor como o único sentido da vida.*

*(DJAVAN, 1984)*

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por iluminar o meu caminho.

À Profa. Francine Ferreira Padilha, por ter me recebido nessa universidade, pelas orientações e por ter me proporcionado contatos com outras instituições para a realização desse trabalho.

À Profa. Juliana Cordeiro Cardoso, pela orientação, dedicação e serenidade em todos os meus momentos de aflição.

Ao Prof. Ricardo Luiz Cavalcanti de Albuquerque Júnior por todas as considerações feitas no seminário e qualificação deste trabalho.

Às pesquisadoras da EMDAGRO, Luzia Nilda Tabosa Andrade e Neusa Rosani Stahlschmidt Lima, pelo acompanhamento dos ensaios com os fungos e com as sementes, realizados na EMBRAPA.

Ao pesquisador Luiz Pereira Costa, que permitiu a realização das micrografias na UNICAMP. Obrigado especialmente pelas MEV's das sementes.

Ao Prof. Marcelo Augusto Gutierrez Carnelossi, por ter permitido a utilização do colorímetro e do micrômetro digital na Universidade Federal de Sergipe.

À minha amiga Lucyana Mendonça, por ter me levado ao local onde foi coletada a própolis utilizada nesse trabalho e por me apresentar ao Rio São Francisco (ele é maravilhoso!)

À CPKelco, pelo fornecimento da pectina.

Ao meu irmão Luca, pelo o incentivo para fazer o mestrado e pelo carinho incondicional. Você é um grande ser humano. Obrigada por acreditar tanto em mim!

À minha irmã Lisa e ao clã de Brasília (Camila e Jorge) por todo o carinho, apoio e orações.

A toda a minha família, pela torcida e orações. Gostaria de agradecer a cada um especialmente, mas o espaço reservado não é suficiente.

Ao meu marido Antonio, especialmente por estar em Aracaju. Seria muito difícil sem você aqui.

À Suzane, por receber a minha família em sua casa na nossa chegada. Valeu Malu e João!

À tia Yara por cuidar com tanto carinho da minha filha Lorena, inclusive nos finais de semana.

À Isabela, pelas boas risadas nos dias de tensão total.

À minha querida amiga Dani, pelos 30 anos de amizade, completados nesse ano. Obrigada pelo carinho.

Aos meus amigos de laboratório: Andriele (estagiária desse trabalho), Klebson, Manu, Gabriel, Marx, Roneval, que fizeram essa caminhada ser mais divertida.

Aos meus amigos do mestrado, por compartilharem essa caminhada comigo, especialmente Emmanuela, Camila, Luci e Andréia.

Ao BNB, pela concessão da bolsa para a pesquisa.

Enfim, a todos que participaram de alguma forma para a realização desse trabalho ou que ficaram na torcida.

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	15
<b>2. OBJETIVOS</b>	18
2.1 Objetivo geral	18
2.1 Objetivos específicos	18
<b>3. CAPÍTULO 1 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	19
3.1 Girassol	20
3.2 Qualidade das sementes de girassol	22
3.3 Filmes para recobrimento	24
3.4 Pectina	26
3.5 Agente plastificante	28
3.6 Métodos para caracterização dos filmes I	30
3.6.1 Espessura	30
3.6.2 Permeabilidade ao vapor d'água	31
3.6.3 Propriedades mecânicas	32

3.6.4 Solubilidade em água	34
3.6.5 Propriedades óticas	34
3.6.6 Análise termogravimétrica	35
3.7 Filmes ativos antimicrobianos	36
3.8 Própolis	38
<b>4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>41</b>
<b>5. CAPÍTULO 2 – ARTIGO</b>	
<b>THE USE OF PECTIN-BASED FILMS CONTAINING RED PROPOLIS EXTRACT FOR SUNFLOWER SEED PROTECTION</b>	<b>52</b>
Introduction	55
Materials and methods	57
Results and discussion	62
Conclusion	74
References	74
<b>ANEXO</b>	<b>80</b>
A – Submissão do artigo	80

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO 2

<b>Table 1.</b> Experimental design: codes and real values of pectin and propylene glycol	58
<b>Table 2.</b> Analysis results of tensile strength (TS), elongation at break (E), Young's modulus (YM), water vapor permeability (WVP), water solubility ( $S_w$ ) and color difference ( $\Delta E$ ) of pectin film ( $F_0$ ) and pectin film with 5% HPE ( $F_5$ )	70
<b>Table 3.</b> Inhibitory effect of HPE on mycelial growth of <i>Alternaria alternata</i>	72
<b>Table 4.</b> Percent germination of sunflower seeds in the laboratory and greenhouse analyses	73

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO 1

**Figura 1:** Pectina de alto teor de metoxilação 27

**Figura 2:** Pectina de baixo teor de metoxilação 27

### CAPÍTULO 2

**Figure 1.** Surface response plot of effect of PEC and PG concentration on: (a) tensile strength, (b) tensile elongation at break and (c) Young's modulus and (d) water vapor permeability of experimental design films equilibrated to 58% RH. 66

**Figure 2.** Micrographs of films and coated seeds: (a) surface of film without HPE ( $F_0$ ); (b) surface of film with HPE 5% ( $F_5$ ); (c) cross-section of  $F_0$ ; (d) cross-section of  $F_5$ ; (e) seed coated with pectin film without HPE ( $SC_0$ ); (f) seed coated with pectin film containing HPE 5% ( $SC_5$ ). 67

**Figure 3.** Spectra of experimental design films 1-5 (a), film without HPE ( $F_0$ ) and film with 5% HPE ( $F_5$ ). 68

**Figure 4.** Curves of DTA (a), TG (b) and DrTGA (c)  $F_0$ ,  $F_1$ ,  $F_5$  films obtained in heating rate of  $10^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$  under a dynamic nitrogen atmosphere ( $50\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ). 71

## UTILIZAÇÃO DE FILMES A BASE DE PECTINA CONTENDO EXTRATO DE PRÓPOLIS VERMELHA PARA PROTEÇÃO DE SEMENTES DE GIRASSOL

Suelí José Pereira Corrêa

O uso de filmes a base de polímeros biodegradáveis contendo substâncias antifúngicas para o recobrimento de sementes pode proporcionar a redução de uso de agrotóxicos gerando diminuição de riscos para o agricultor e evitando contaminação ambiental. No presente trabalho, foram elaborados filmes a base de pectina com adição de propilenoglicol como plastificante. Os filmes obtidos foram caracterizados quanto a solubilidade, propriedades de barreira de água, mecânicas e óticas, microestrutura e infravermelho com transformada de Fourier. A formulação que apresentou o melhor desempenho mecânico e de permeabilidade, foi selecionada para a incorporação de diferentes concentrações de extrato hidroalcoólico de própolis vermelha. Foram confeccionados novos filmes contendo extrato de própolis (1%, 2,5%, 5% e 7,5%) e a ação antifúngica desses filmes contra o fungo *Alternaria alternata* foi estudada. O filme contendo 5% de extrato hidroalcoólico de própolis vermelha (F<sub>5</sub>) apresentou melhor desempenho antifúngico e sua formulação foi utilizada para recobrir as sementes de girassol. O filme utilizado para o recobrimento (F<sub>5</sub>) foi caracterizado com os mesmos parâmetros utilizados para o planejamento experimental e também análise térmica. A incorporação de 5% de HPE ao filme (F<sub>5</sub>) influenciou apenas as propriedades mecânicas. Foram obtidas micrografias das sementes recobertas apresentando suas características morfológicas. Os testes de germinação realizados não foram influenciados pelo recobrimento contendo extrato hidroalcoólico, indicando que esse material de recobrimento pode ser utilizado para a proteção das sementes.

Palavras-chave: pectina, filme de recobrimento, *Alternaria alternata*, semente de girassol, própolis

## THE USE OF PECTIN-BASED FILMS CONTAINING RED PROPOLIS EXTRACT FOR SUNFLOWER SEED PROTECTION

Suelí José Pereira Corrêa

The use of seed coating with active films based on biodegradable polymers containing natural active substances may assist in finding of whole characteristics necessary to ensure the quality of this product, reduce of operator exposure to pesticides and facilitate the handling of treatment in relation the product quantities used for it. In this work, pectin-based films were prepared with propylene glycol (PG) as plasticizer. The films obtained were characterized by solubility, water barrier, mechanical and optical properties, microstructure, and FTIR. The formulation that shows the better performance was selected to incorporation of different concentrations of hydroalcoholic red propolis extract (HPE). The antifungal action of films prepared, containing HPE incorporation (1%, 2.5%, 5% and 7.5%) against *Alternaria alternata* was studied. Film with 5% HPE (F<sub>5</sub>) showed the best result and was used as film coating of sunflower seeds. The F<sub>5</sub> film was characterized with the same parameters used at experimental design adding thermal analysis. Photomicrographs were obtained of seed coated, showing the morphological characteristics of them. Germination tests of seed coated not showing influence of HPE for it, indicating that this material may be used for seed protection.

Key-words: pectin; film coating; *Alternaria alternata*; sunflower seed; propolis

## 1. INTRODUÇÃO

A cultura de girassol é uma das principais culturas mundiais, com uma produção prevista para a safra 2010/2011 na ordem de 33,78 milhões de toneladas. Em abril de 2010 o preço foi cotado em US\$ 346,00 a tonelada, nos Estados Unidos. No Brasil, a produção de girassol na safra 2009/2010 ficou em torno de 96,3 mil toneladas, sendo os preços cotados em sacas de 60 kg, no mês de maio/2010, em média a R\$ 38,76 (US\$ 364,82/tonelada).

Apesar de pequena a produção brasileira no contexto mundial, o Brasil é um país com grande potencial para expansão da cultura do girassol, principalmente pela sua extensão territorial. Nos estados de Sergipe e Bahia, a cultura do girassol tem sido incentivada devido ao programa do governo federal para a fomentação da produção de biodiesel. A Petrobras Biocombustíveis firmou contrato, em 2008 com agricultores familiares locais, garantindo a compra de toda a produção de grãos, os quais são beneficiados e transformados em biocombustível na usina localizada em Candeias/BA, que atualmente está sendo duplicada.

As sementes são componentes essenciais de qualquer sistema de cultivo e a sua qualidade é o fator preponderante para garantir o sucesso da produtividade no campo, mantendo um alto índice de produção. Dentre os desafios para manter a qualidade das sementes estão os processos para garantir a sanidade das sementes.

A mancha de alternaria e a podridão branca são as principais doenças transmitidas pelas sementes de girassol. No entanto, outras doenças, não menos importantes, também têm sido registradas, sendo provocadas principalmente pelo ataque de fungos. Estima-se que as doenças são responsáveis por uma perda anual média de 12% da produção de girassol no mundo, sendo este o fator mais limitante para a cultura na maioria das regiões produtoras. Além da redução de produtividade, dependendo da gravidade da doença, a perda da produção pode chegar a 100%.

Novas tecnologias têm sido desenvolvidas para proteger as sementes e minimizar os danos causados pela utilização de sementes de baixa qualidade, especialmente as sementes contaminadas por microrganismos que transmitem e disseminam várias doenças para o campo. Uma das tecnologias propostas para o controle dessas doenças é o recobrimento de sementes.

A tecnologia de recobrimento tem suas origens na indústria farmacêutica e vem sendo pesquisada pela indústria alimentícia e agrícola para buscar novos mercados potenciais. A indústria de sementes tem utilizado esta tecnologia para o aumento de massa nas sementes com a aplicação de materiais aglomerantes, como areia, vermiculita, polímeros sintéticos e nutrientes para crescimento. Entretanto, a aplicação de materiais poliméricos biodegradáveis e com substâncias ativas ainda é incipiente. O uso do recobrimento de sementes com diferentes materiais, como filmes ativos a base de polímeros biodegradáveis, pode facilitar a obtenção de um conjunto de características necessárias ao estabelecimento das plântulas no campo. Pois, além de oferecerem proteção às sementes, os filmes para recobrimento podem ser incorporados de aditivos que possibilitam a redução da exposição dos operadores aos agrotóxicos e ainda facilitam o manejo do tratamento quanto às quantidades de produto utilizado.

Os aditivos incorporados aos recobrimentos, para liberação de substâncias ativas com a função de proteger as sementes contra o ataque de microrganismos podem ser sintéticos ou naturais, como por exemplo, a própolis, utilizada suas propriedades biológicas (antimicrobiana, antiinflamatória, cicatrizante, entre outras) há milhares de anos. As pesquisas com própolis têm aumentado nas últimas décadas no sentido de caracterizar esse produto e identificar quais substâncias estão presentes na sua constituição e a partir desses resultados buscarem aplicações específicas para esse produto.

No Brasil, a diversidade da flora, propicia existência de diferentes variedades de própolis, visto que este produto é oriundo de brotos, botões florais e exsudados resinosos das plantas, alvo de coleta das abelhas. Atualmente, existem 13 tipos de variedades, descritos na literatura, sendo a mais recentemente catalogada a própolis vermelha, que tem

sido encontrada ao longo do mar e costa de rios no nordeste brasileiro, como a região do rio São Francisco, no interior de Sergipe. Em pesquisas recentes, a própolis vermelha tem demonstrado ação antimicrobiana mesmo em baixas concentrações.

Assim agregar valor às sementes de girassol, utilizando métodos e tecnologias de produção como a de recobrimento ativo com utilização de produtos naturais e biodegradáveis, é a principal exigência de um mercado cada vez mais competitivo e primoroso por atitudes de sustentabilidade ambiental.

O presente trabalho teve por objetivo desenvolver e caracterizar filme biodegradável, a base de pectina, contendo extrato de própolis vermelha para recobrir sementes de girassol.

Este trabalho foi dividido em dois capítulos, sendo primeiro capítulo dedicado a revisão de literatura dos temas estudados e o segundo capítulo apresentado em forma de artigo intitulado de “Utilização de filmes a base de pectina contendo extrato de própolis vermelha para proteção de sementes de girassol”.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo geral

Desenvolver e caracterizar filme biodegradável, a base de pectina, contendo extrato de própolis vermelha para recobrir sementes de girassol.

### 2.2. Objetivos específicos

- a) Elaborar filmes com diferentes concentrações de pectina e propilenoglicol, utilizando planejamento experimental;
- b) Caracterizar os filmes obtidos por análises de solubilidade, propriedades de barreira de água, mecânica e óticas, microestrutura e infravermelho com transformada de Fourier;
- c) Incorporar extrato hidroalcoólico de própolis vermelha em diferentes concentrações (1%, 2,5%, 5% e 7,5%) em filme de pectina obtido a partir do planejamento experimental;
- d) Avaliar a ação antifúngica contra *Alternaria alternata* dos filmes com diferentes concentrações de extrato hidroalcoólico de própolis vermelha;
- e) Caracterizar o filme com a concentração de própolis definida para recobrimento por análises de solubilidade, propriedades de barreira de água, mecânica e óticas, microestrutura, termogravimetria e infravermelho com transformada de Fourier;
- f) Recobrir as sementes de girassol com o filme contendo extrato hidroalcoólico de própolis vermelha e avaliar por microscopia eletrônica de varredura a morfologia da semente recoberta;
- g) Avaliar a influência do recobrimento na germinação das sementes de girassol.

**3. CAPÍTULO 1**  
**REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### 3. CAPÍTULO 1 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1. Girassol

O girassol (*Helianthus annuus L.*) é uma dicotiledônea da família *Compositae*, com sistema radicular do tipo pivotante, ou seja, possui uma raiz principal vigorosa que pode penetrar o solo na ausência de obstáculos, em profundidades superiores a um metro, conferindo-lhe maior reciclagem de nutriente e maior resistência à seca e ao tombamento (KAKIDA *et al.*, 1981). O caule é robusto, ereto, provido ou não de pêlos e geralmente sem ramificações, e as folhas são alternadas, pecioladas com grande variação de número (8 a 70), forma e tamanho. A inflorescência é do tipo capítulo com diâmetro variando de 6 a 50 cm (CASTIGLIONI *et al.*, 1994). O fruto do girassol, chamado de aquênio, é composto de pericarpo (casca ou tegumento), e pela semente propriamente dita (amêndoa), de tamanho, cor e teor de óleo variável, de acordo com as características de cada cultivar (KAKIDA *et al.*, 1981).

Originária da América do Norte, a planta do girassol se desenvolve e produz bem na maior parte dos estados brasileiros. O seu cultivo deve ser evitado em regiões muito úmidas, pois a ocorrência de doenças por excesso de umidade dificulta a produção nessas áreas (FREIRE *et al.*, 2007). O ciclo vegetativo do girassol varia entre 90 a 130 dias e seu florescimento ocorre em média, 60 dias após a semeadura (EMBRAPA, 2010). O desenvolvimento do girassol não requer solos com elevada fertilidade. O solo pode variar de arenoso a argiloso, porém não pode haver compactação da mesmo, sendo a drenagem essencial para o seu desenvolvimento (CÂMARA, 2001).

Por se apresentar resistente à seca, ao frio e ao calor, o girassol apresenta grande potencialidade de cultivo em larga escala no Brasil (LOPES, 2003). Além disso, o cultivo do girassol pode aumentar a diversificação do sistema produtivo, podendo ser semeado em sucessão a culturas de milho e soja (LAZZAROTTO *et al.*, 2005).

No Brasil, a produção de girassol (grão) na safra 2009/2010 ficou em torno de 96,3 mil toneladas, e teve uma concentração nas regiões Centro-Oeste (Mato Grosso, Goiás e Mato Grosso do Sul, com 58,70%, 8,70% e 3,14%, respectivamente), Sul (Rio Grande do Sul e Paraná, com 25,47%, 1,05%, respectivamente) e Nordeste (Rio Grande do Norte, com

1,47% e Ceará, também com 1,47%). Os preços da saca de 60 kg do grão de girassol ficaram, no mês de maio/2010, no Centro-Sul ficaram, em média, a R\$ 38,76 (CONAB, 2010).

O girassol é considerado, dentre os óleos vegetais, como um dos óleos de melhor qualidade nutricional e organoléptica, possuindo um rendimento médio de 47% de óleo límpido, de cor amarelo dourado claro, com odor e sabor suave característico. Devido ao alto índice de ácido linoléico (Ômega 6) e de tocoferóis (vitamina E), o óleo de girassol vem sendo indicado em dietas para redução de colesterol, por sua baixa quantidade de ácidos graxos saturados (ABOISSA, 2010).

Para a safra 2010/11, segundo o *United States Department of Agriculture (USDA)*, a previsão é de uma produção de girassol na ordem de 33,78 milhões de toneladas. Devido as suas características especiais, cerca de 90% da produção de girassol são destinados ao processamento industrial, resultando em cerca de 13,07 milhões de toneladas de farelo e 12,17 milhões de toneladas de óleo (CONAB, 2010).

Nos estados de Sergipe e Bahia, a cultura de girassol tem sido incentivada devido ao programa do governo federal para a fomentação da produção de biodiesel. A Petrobrás Biocombustíveis firmou contrato, em 2008 com agricultores familiares locais, garantindo a compra de toda a produção de grãos para beneficiamento e transformação em biocombustível na usina localizada em Candeias/BA, que iniciou a sua duplicação em março de 2010. Na safra 2008/2009, foram adquiridos da agricultura familiar cerca de 18 mil toneladas de grãos de mamona e girassol. Com a duplicação da usina concluída, serão necessárias 114 mil toneladas de oleaginosas produzidas pela agricultura familiar, ampliando assim a participação dos agricultores familiares no projeto de produção de biodiesel, possibilitando maior geração de trabalho e renda no campo (BIODIESELBR, 2010). Além disso, a massa, resultante da extração do óleo, rende uma torta altamente protéica, usada na produção de ração (EMBRAPA, 2010). Deve ser salientado que para este aumento na ordem de 600% é necessário a utilização de sementes isentas de patógenos que interfiram na qualidade da produção e do produto beneficiado.

### 3.2. Qualidade de sementes de girassol

A qualidade das sementes consiste na produção de plantas saudáveis para obtenção de uma boa colheita, sendo que os aspectos genéticos, físicos, fisiológicos e sanitários estão diretamente relacionados com esta propriedade (GRISI *et al.*, 2009).

O desenvolvimento de novas tecnologias de produção e cultivares têm contribuído para minimizar os efeitos negativos do ambiente sobre a produção e a qualidade das sementes, no entanto, é necessário aumentar o conhecimento sobre como os fatores ambientais podem afetar o processo fisiológico que determina a viabilidade e vigor, uma vez que a produção de sementes de baixo vigor é um problema crônico da indústria de sementes (GRISI *et al.*, 2009). Sabe-se também que todas as culturas são suscetíveis a ataques de patógenos, transmitidos através das sementes, que podem ser devastadores (HENNING, 2004).

O girassol é hospedeiro de mais de 35 organismos fitopatogênicos, sendo a maioria fungos que reduzem o poder germinativo e podem ser disseminados, estabelecendo focos primários de infecção em novas áreas de cultivo. Estima-se que as doenças são responsáveis por uma perda anual média de 12% da produção de girassol no mundo, sendo este o fator mais limitante para a cultura na maioria das regiões produtoras. Dependendo das condições climáticas, as perdas na produção provocadas pelas doenças podem alcançar 100% (MACHADO, 1994; LEITE, 1997).

A mancha de alternária é uma das principais doenças do girassol, causada pelo fungo *Alternaria spp.*, ocorrendo em praticamente todas as regiões do Brasil e em todas as épocas de plantio. Os danos causados pela doença podem ser atribuídos à diminuição da área fotossintética da planta, devido à formação de manchas foliares e à desfolha precoce, resultando na redução do diâmetro dos capítulos, do número de aquênios por capítulo, do peso de 1000 aquênios e do teor de óleo. As plantas severamente afetadas apresentam também a sua maturação antecipada (GODOY e FERNANDES, 1985). Três espécies do fungo foram relatadas como patogênicas ao girassol no Brasil: *A. helianthi*, *A. zinniae* e *A. alternata* e as condições ótimas para a germinação de seus conídios são alta umidade relativa (acima de 70%) e temperatura entre 25°C a 30°C (DAVET *et al.*, 1991).

A podridão branca é outra doença causada por um fitopatógeno, o fungo *Sclerotinia sclerotiorum* que é considerado o mais importante para a cultura do girassol no mundo. A infecção pode ocorrer na raiz e no colo da planta, na haste ou no capítulo, podendo matar rapidamente as plântulas infectadas. Sua ocorrência afeta seriamente a produção e a qualidade dos aquênios, que ficam com menor peso. As perdas associadas à podridão de capítulo refletem diretamente na produção, com redução no número de aquênios por capítulo, no peso de aquênios e na concentração de óleo. A qualidade do óleo extraído de grãos infectados pelo fungo é inferior, devido ao aumento da concentração de ácidos graxos livres. Além desses prejuízos, o fungo persiste durante muitos anos no solo, representando um perigo potencial permanente para a cultura do girassol (DAVET *et al.*, 1991).

A ferrugem do girassol é outra doença causada por fungos (*Puccinia helianthi*), que causa redução na produtividade e na qualidade de aquênios, pela diminuição do peso e do teor de óleo, mas, aparentemente, tem pouca influência sobre os teores dos ácidos graxos no grão (ZIMMER e HOES, 1978).

O agente causal do míldio é o fungo *Plasmopara halstedii* e os danos causados por essa doença podem decorrer da morte precoce das plantas ou da perda total da produção e, ainda, da contaminação das sementes (PEREYRA e ESCANDE, 1994).

Outras doenças que afetam a cultura do girassol foram relatadas no Brasil: mosaico (vírus do mosaico do picão), mancha e crestamento bacterianos (*Pseudomonas syringae* pv. *helianthi* e *Pseudomonas cichorii*), podridão da medula da haste (*Erwinia* sp), bolha branca (*Albugo tragopogi*), oídio (*Erysiphe cichoracearum*), mancha cinzenta da haste (*Phomopsis helianthi*), mancha preta da haste (*Phoma oleracea* var. *helianthi-tuberosi*), tombamento e podridões radiculares (*Sclerotium rolfsii*) (LEITE, 1997). Como a maioria dos agentes etiológicos das doenças é transmitida pelas sementes, principalmente as causadas por fungos, os testes de sanidade são conduzidos em laboratório, antes da utilização dessas sementes no campo, a fim de reduzir focos de infecção em novas áreas de cultivo e garantir a produtividade (MACHADO, 1994).

A qualidade das sementes é determinada utilizando-se instrumentos específicos para a condução dos testes básicos que se encontram nas Regras para Análise de Sementes (RAS) (BRASIL, 1992).

Os procedimentos e padrões para determinar a qualidade das sementes foram desenvolvidos visando à uniformidade de resultados das análises. As metodologias compreendem definições e procedimentos fundamentais, baseados no minucioso conhecimento dos princípios que devem orientar a análise de sementes (BRASIL, 1992).

Assim, a utilização de sementes sadias é de grande importância para a garantia de bons rendimentos em qualquer cultivo agrícola. No Brasil, ainda são poucos os estudos realizados em patologia de sementes de girassol, no entanto, a crescente importância da cultura do girassol tem gerado uma demanda para que novos estudos e novas tecnologias sejam propostos a fim de garantir a sanidade desta cultura, como o recobrimento de sementes (GOMES *et al.* 2008; BATISTA *et al.*, 2005; SALUSTIANO *et al.*, 2005).

### **3.3. Filmes para recobrimento**

O recobrimento desempenha uma importante função na conservação, distribuição e comercialização do produto recoberto, sendo que suas principais funções são a proteção do produto em relação a danos mecânicos, físicos e microbiológicos (FALGUERA *et al.*, 2011).

O recobrimento de sementes com filmes possibilita uma aplicação uniforme de agentes químicos e biológicos contra o ataque de patógenos, reduzindo desta forma os impactos sobre o meio ambiente e saúde do agricultor. Esse método também pode ser utilizado para controlar as condições de estocagem das sementes, prevenindo o aumento de umidade e garantindo sua qualidade, visto que mesmo uma pequena elevação do teor de umidade da semente é suficiente para reduzir sua capacidade de germinação (KAVAK e ESER, 2009).

Os filmes podem ser compostos por substâncias biodegradáveis ou blendas com outros compostos. Os filmes biodegradáveis são películas finas que podem ser formadas a partir de polímeros naturais, de origem animal ou vegetal, sendo que, quando lançados no meio ambiente, convertem-se em compostos simples, mineralizados, que não agredem o biosistema (CHANDRA e RUSTGI, 1998). Para a elaboração desses filmes é necessária a presença de pelo menos um polímero capaz de formar uma matriz contínua e coesa (GUILBERT *et al.*, 1997).

Os principais grupos de polímeros naturais utilizados para a produção de filmes são: **proteínas** (caseínas, proteínas do soro do leite, glúten, zeína, colágeno e gelatina); **polissacarídeos** (derivados da celulose, quitosana, amido, alginatos, pectinas e gomas); e **lipídios** (monoglicerídeos, ácidos graxos, ceras naturais, etc.) (KESTER e FENNEMA, 1986). Estes polímeros apresentam grande disponibilidade na natureza, ampla variedade de estruturas, biocompatibilidade, atoxicidade e são de fácil modificação química e bioquímica (SOUTO-MAIOR *et al.*, 2008).

A técnica de produção dos filmes a partir de uma solução filmógena envolve, inicialmente, uma etapa de solubilização do polímero em um solvente (água, etanol, solução de ácido acético, etc.) ao qual podem ser incorporados diversos aditivos (plastificantes, agentes reticulantes, agentes antimicrobianos, etc.). Posteriormente, a solução formadora do filme é vertida sobre um suporte e submetida a um processo de desidratação até uma condição que permita um fácil desprendimento do molde ou aplicada no recobrimento de um produto, sendo este processo denominado de casting (CUQ *et al.*, 1995).

Os recobrimentos são aplicados ou confeccionados diretamente sobre o produto ou alimento a ser protegido, enquanto os filmes são estruturas independentes que após sua fabricação podem ser utilizadas para envolver os produtos, como embalagens. Os filmes podem localizar-se na superfície ou como finas camadas entre diferentes partes do produto (FALGUEIRA *et al.*, 2011).

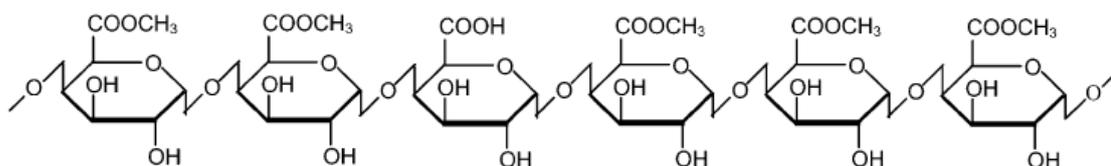
O uso de filmes ou recobrimento baseados em polímeros naturais depende de vários fatores, incluindo custo, disponibilidade, atributos funcionais, propriedades mecânicas (resistência e flexibilidade), qualidades ópticas (brilho e opacidade), propriedades de barreira (permeabilidade ao vapor de água, O<sub>2</sub> e CO<sub>2</sub>), resistência estrutural à água (solubilidade) e aceitação sensorial. Estas características resultam de diversos parâmetros, tais como: características físico-químicas e concentração da macromolécula e dos demais constituintes (solvente, plastificante, agente antimicrobiano, etc.), pH, condições de secagem e condições ambientais (temperatura e umidade) (VIERA *et al.*, 2011).

### 3.4. Pectina

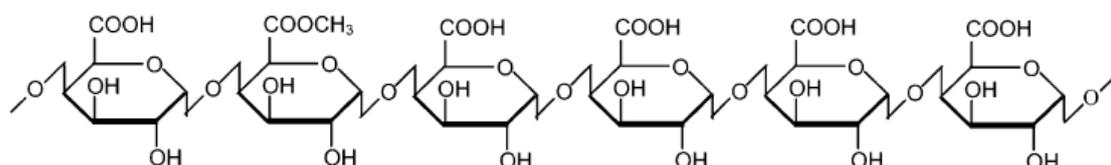
A pectina é encontrada na parede celular de plantas superiores como uma substância cimentante na lamela média e como um espessante da parede celular (THAKUR *et al.*, 1997). As substâncias pécticas são polissacarídeos com estruturas complexas, altamente ramificados, hidrofílicos e ricos em ácido D-galacturônico (BUCHANAN *et al.*, 2000). Este polissacarídeo contribui para a adesão entre as células, firmeza e resistência mecânica do tecido, sendo também determinante para a firmeza dos vegetais, característica estabelecida durante o seu crescimento, amadurecimento, armazenamento e processamento. Está associado, naturalmente, à celulose, hemicelulose e lignina, sendo designado enquanto nesta condição de protopectina (PAIVA *et al.*, 2009).

Durante a produção comercial da pectina, muitas de suas estruturas complexas são perdidas, prevalecendo, principalmente, as regiões de ácido galacturônico de diferentes comprimentos e grau de esterificação (MAY, 1997). As pectinas são produzidas, principalmente, a partir da casca de frutas cítricas e polpa de maçã. Esses materiais são aquecidos em água quente contendo ácido mineral, sob condições controladas de pH e temperatura. No caso da maçã, um segundo tratamento com carvão e amilase é feito para eliminar, respectivamente, a cor e o amido. Uma filtração posterior retira partículas e impurezas insolúveis, resultando em um extrato razoavelmente brilhante (THAKUR *et al.*, 1997).

A pectina apresenta elevado peso molecular e dependendo do grau de substituição dos grupos carboxilas, presentes nos monômeros de ácido D-galacturônico, por grupos metoxila (-OCH<sub>3</sub>), a pectina pode ser classificada como de alta metoxilação/esterificação (acima de 50%) e de baixa metoxilação/esterificação (abaixo de 50%) (SOUTO-MAIOR *et al.*, 2008), como pode ser observado nas Figuras 1 e 2, respectivamente.



**Figura 1:** Pectina de alto teor de metoxilação (THARANATHAN, 2003)



**Figura 2:** Pectina de baixo teor de metoxilação (THARANATHAN, 2003)

A importância da pectina na tecnologia e no processamento de alimentos, bebidas e fármacos está relacionada a sua função de conferir firmeza, retenção de sabor e aroma, assim como ao seu papel de hidrocolóide na dispersão e estabilização de diversas emulsões. A formação de gel é a principal característica funcional da pectina e depende essencialmente das características do meio: pH, teores de sólidos solúveis e cátions divalentes, além de depender da concentração da pectina e do seu grau de metoxilação (PAIVA *et al.*, 2009).

A estrutura molecular de um gel aquoso apresenta três elementos: (a) zonas de junção, onde as moléculas poliméricas estão juntas; (b) segmentos de inter-junção dos polímeros que são relativamente móveis; e (c) água presa na rede polimérica. Uma zona de junção pode envolver ligações covalentes, eletrostáticas, de hidrogênio ou interações hidrofóbicas (THAKUR *et al.*, 1997).

Existem vários estudos sobre a formação e aplicação de coberturas ou cápsulas de géis de pectina em alimentos ou fármacos, e que, por serem em forma de uma película, são também denominados de filmes (TRIPATHI *et al.*, 2010; MAFTOONAZAD *et al.*, 2007; KANG *et al.*, 2005), mas apenas alguns desses trabalhos produziram filmes independentes para poder determinar características físicas desses produtos (SOUTO-MAIOR *et al.* 2008).

ALVES *et al.* (2010) verificaram as propriedades de barreira de filmes a base de blendas de pectina e kappa carragena com incorporação de flocos de mica e observaram uma diminuição da permeabilidade ao vapor de água, e também dos gases CO<sub>2</sub> e O<sub>2</sub> em relação aos filmes sem a incorporação dos flocos de mica. SILVA *et al.* (2009) avaliaram o efeito da concentração do plastificante em filmes de pectina e alginato reticulados com íons de cálcio e concluíram que o aumento da concentração do plastificante (glicerol) diminuiu a resistência à tração dos filmes compostos e aumentou a solubilidade em água, a umidade e o alongamento desses filmes.

BATISTA *et al.* (2005), estudaram o efeito da adição de ácidos graxos sobre as propriedades dos filmes de pectina e observaram que a utilização da mistura desses componentes na preparação dos filmes aumentou os valores de tensão da ruptura e da alongação, no entanto não diminuiu a permeabilidade ao vapor de água em relação aos filmes produzidos com a adição dos ácidos graxos individualmente. Também nesse estudo foi observada a alta solubilidade dos filmes produzidos e os autores sugerem que filmes com essa característica podem ser utilizados para cobertura de sementes agrícolas que necessitem de rápida germinação no campo ou como carreadores de aditivos necessários ao crescimento das mesmas.

### **3.5. Agente Plastificante**

A adição de um agente plastificante ao filme é requerida quando ocorrem intensas forças intermoleculares na cadeia polimérica que promovem a fragilidade desse filme. Os plastificantes têm a capacidade de reduzir essas forças, aumentando a flexibilidade e extensibilidade dos filmes. Esse aumento da maleabilidade e da mobilidade da cadeia polimérica promove, por conseqüência, o aumento dos coeficientes de difusão de gases e água (BERTUZZI *et al.*, 2007). KESTER e FENNEMA (1986) definiram agente plastificante como composto de baixa volatilidade e alto ponto de fusão, capazes de reduzir as forças intermoleculares e aumentar a mobilidade de cadeias poliméricas.

A incorporação do plastificante aos filmes pode modificar as propriedades de adesão, permeabilidade ao vapor de água, ao oxigênio e também as propriedades mecânicas e térmicas. As interações entre os plastificantes e os polímeros podem sofrer

interferências de fatores como: tamanho molecular, configuração e número total de grupos hidroxilas dos plastificantes (BATISTA, 2004).

Diversos plastificantes têm sido comumente utilizados na elaboração de filmes biodegradáveis: glicerol, sorbitol, propilenoglicol, polietilenoglicol, etilenoglicol, entre outros (GHASEMLOU et al. 2011). No entanto, para a escolha do plastificante a ser adicionado na formulação do filme, deve ser considerada a compatibilidade deste com o polímero e o solvente utilizados, de modo que o mesmo apresente-se totalmente disperso na solução filmógena, evitando a formação de um filme com camadas distintas (SILVA et al., 2009; FARRO, 2008).

MALI *et al.* (2005) analisaram o efeito de diferentes concentrações dos plastificantes glicerol e sorbitol nas propriedades mecânicas de filmes a base de amido de mandioca e observaram que o aumento da concentração dos plastificantes, promoveu uma diminuição dos valores de tensão e do módulo de Young dos filmes.

Ao estudar a permeabilidade ao vapor de água de filmes de amido de milho com alto teor de amilose em função da concentração de glicerol, BERTUZZI *et al.* (2007) verificaram um aumento linear dessa propriedade ao aumentar a concentração do plastificante e relataram que esses resultados podem ser devido as modificações estruturais na cadeia do amido, provocada pelo caráter hidrofílico do plastificante adicionado, que favoreceu a absorção e dessorção de moléculas de água. MULLER *et al.* (2008) avaliaram os efeitos da concentração do glicerol e sorbitol nas propriedades de barreira de água de filmes de amido e verificaram que os grupos hidrofílicos desses plastificantes podem diminuir a mobilidade das moléculas de água, reduzindo o coeficiente de difusão de água nesses filmes. Os autores concluíram que a permeabilidade ao vapor de água é controlada pelo coeficiente de solubilidade de água nos filmes.

GHASEMLOU et al. (2011) estudaram o efeito dos plastificantes sorbitol e glicerol em filmes a base de kefiran e determinaram o glicerol como o plastificante mais adequado, para este tipo de filme, em relação às propriedades físicas, mecânicas, de barreira e térmicas. Os autores concluíram que os plastificantes podem ter um importante papel para adequação dessas propriedades, de acordo com aplicações específicas dos filmes.

O propilenoglicol além de ser utilizado como agente plastificante, também pode agir como solvente de ingredientes ativos, possuindo afinidade com compostos hidrofílicos e hidrofóbicos (DOW, 2010).

### **3.6. Métodos para caracterização dos filmes**

#### **3.6.1. Espessura**

A espessura dos filmes é um parâmetro que influencia suas propriedades, sendo o seu controle muito importante para avaliar a uniformidade desses materiais, a repetibilidade da medida de suas propriedades e a validade das comparações entre filmes. Nos processos de produção de filmes, do tipo *casting* é muito importante controlar o nível do local onde o suporte com a solução filmogênica será mantido durante o processo de secagem, para evitar diferenças na espessura desses filmes (CUQ *et al.*, 1996; GENNADIOS *et al.*, 1993). SOBRAL *et al.*, 2002 observaram que a obtenção de filmes pela metodologia *casting* podem gerar filmes não homogêneos e de diferentes espessuras, podendo dar lugar a respostas diferentes com relação aos testes mecânicos.

OLIVEIRA (1996) definiu a espessura dos filmes como a distância perpendicular entre as duas superfícies principais do material e a gramatura como peso de uma determinada área do material, estando ambas diretamente relacionadas à resistência mecânica dos filmes.

Dependendo do polissacarídeo, os filmes podem apresentar diferentes espessuras para a mesma quantidade e concentração. Os filmes de pectina, por exemplo, tendem a ser mais finos do que os filmes de alginato, pois alcançam um arranjo molecular mais compacto, fato este atribuído à menor massa molecular da pectina em relação ao alginato (SRIAMORNSAK e KENNEDY, 2008).

CUQ *et al.* (1996) em pesquisas de filmes de proteína miofibrilar, registraram uma tensão na ruptura com relação diretamente proporcional à espessura dos filmes. Este comportamento foi relacionado ao aumento das interações intermoleculares nos filmes de maior espessura. Já as propriedades de barreira são afetadas de forma diferente pela espessura. PARK e CHINNAN (1995) verificaram que a permeabilidade ao vapor de água

aumenta linearmente com o aumento de espessura dos filmes devido a tensões internas provocadas pela alteração da estrutura dos filmes. Este comportamento foi observado no estudo de filmes a base amido de milho com alta amilose, ou seja, aumento linear da permeabilidade ao vapor de água com o aumento da espessura filme (BERTUZZI *et al.*, 2007).

### **3.6.2. Permeabilidade ao vapor d'água**

A permeabilidade dos filmes é a medida obtida através da passagem de um material permeante de um lado do filme para o outro quando ambos são expostos a diferentes concentrações desse permeante em um determinado tempo, sendo ainda importante o conhecimento da área do filme exposto e sua espessura (KROCHTA e DE MULDER-JOHNSTON, 1997). O ganho de peso de uma célula utilizada para a determinação da permeabilidade ao vapor de água é registrado a partir da passagem de vapor de água do meio onde a umidade relativa é maior para aquele onde a umidade é menor.

Dentre os fatores que influenciam a permeabilidade ao vapor de água nos biofilmes destacam-se a natureza do material permeante, o plastificante, o grau de reticulação, a polaridade e as interações entre as cadeias poliméricas (KESTER e FENNEMA, 1986). Estudos realizados por GUILBERT *et al.* (1997) demonstraram que o aumento da cristalinidade, da densidade ou massa molecular resultou em diminuição da permeabilidade. A estrutura molecular das matrizes poliméricas também é um parâmetro de grande influência nas propriedades de barreira. Segundo McHUGH e KROCHTA (1994), filmes com baixa permeabilidade são obtidos a partir de matrizes formadas por cadeias poliméricas lineares simples. A presença de cadeias laterais na matriz conduz a um aumento nos espaços livres facilitando a difusão do permeante.

DIAS *et al.* (2010) estudando filmes a base de amido e farinha de arroz, observaram um aumento da permeabilidade ao vapor de água desses filmes, ao se aumentar a concentração de glicerol na formulação e sugeriram que esse comportamento poderia ser explicado pelo aumento da higroscopicidade dos filmes, no caso dos filmes de amido e pela estrutura mais aberta da cadeia dos filmes a base de farinha de arroz.

Ao estudarem o efeito do alginato e lambda-carragena nas propriedades de permeabilidade ao vapor de água de filmes de caseinato de sódio e lipídeos, FABRA *et al* (2010), verificaram que na ausência de plastificante (glicerol) a permeabilidade dos filmes foram menores que em filmes contendo plastificantes e atribuíram esse fato aos plastificantes hidrofílicos que promovem um aumento dos espaços intermoleculares na cadeia polimérica.

KOWALCZYK e BARANIAK (2011) estudaram os efeitos dos plastificantes em filmes a base de proteína isolada de ervilhas e observaram que os filmes preparados com sorbitol apresentaram menor permeabilidade ao vapor de água em relação aos filmes preparados com glicerol e atribuíram essa diferença à menor higroscopicidade do sorbitol.

### **3.6.3. Propriedades mecânicas**

A necessidade de flexibilidade, resistência à tração e alongamento adequados, permitindo a deformação do filme utilizado como cobertura, sem a sua ruptura, se faz devido ao manuseio, transporte ou armazenamento dos produtos recobertos que podem ocasionar a ruptura dessa cobertura, que perde dessa forma o seu caráter protetor. Por esse motivo as medidas desses parâmetros fornecem informações sobre as forças intermoleculares envolvidas na estabilização da matriz polimérica e sobre a energia necessária para que o filme se rompa (ROBERTSON, 1993).

A resistência à tração e alongação são propriedades mecânicas apresentadas por um filme. A resistência à tração é a máxima tensão suportada pelo filme até o momento de sua ruptura. A alongação é a medida de maleabilidade do filme e pode ser considerada como uma característica que define a habilidade do filme em deformar antes de ocorrer sua ruptura. Baixos valores de alongação implicam em filmes quebradiços (MACLEOD *et al.*, 1997). O módulo de elasticidade ou módulo de Young é a relação entre a resistência a tração e porcentagem de alongamento e indica a rigidez do filme, ou seja, quanto maior o valor do módulo de Young mais rígido será o filme (OLIVEIRA, 1996).

As propriedades mecânicas podem ser diretamente afetadas por vários fatores, como a natureza do material filmógeno e a coesão da estrutura da matriz polimérica, que

está relacionada com a distribuição e concentração inter e intramolecular na estrutura filmogênica (CUQ *et al.*, 1996).

MACLEOD *et al.* (1997) estudaram as propriedades mecânicas e de permeabilidade de filmes de pectina e etilcelulose para aplicação em sistemas de liberação de fármacos e observaram uma diminuição da resistência à tração e do alongamento provocada pelo aumento da quantidade de pectina nos filmes.

A influência da adição de plastificantes sobre as características mecânicas dos filmes tem sido evidenciada em diversos trabalhos. COFFIN e FISHMAN (1994), verificaram que filmes a base de pectina e amido adicionados de glicerol sofreram redução na resistência à tração e aumento no alongamento. OLIVAS e BARBOSA-CÁNOVAS (2007) verificaram que diferentes plastificantes (polietilenoglicol 8000, frutose, glicerol, e sorbitol) adicionados em filmes a base de alginato de cálcio, modificaram as propriedades mecânicas dos filmes, diminuindo a tensão dos mesmos, sendo que o efeito foi mais pronunciado com o aumento da umidade relativa.

Para a realização das análises de resistência é muito importante o controle da umidade relativa durante o armazenamento do filme antes das análises. Altas umidades relativas no ambiente promovem um aumento de umidade no filme e conseqüentemente um efeito plastificante, provocado pela água, levando a uma diminuição significativa na força de ruptura devido a mudanças de conformação que ocorrem na estrutura molecular (CUQ *et al.*, 1996).

OLIVAS e BARBOSA-CÁNOVAS (2007) estudaram o efeito do plastificante e da umidade relativa na permeabilidade ao vapor de água e nas propriedades mecânicas de filmes a base de alginato de cálcio. Os autores observaram que o aumento da umidade relativa provocou uma diminuição da tensão dos filmes de alginato, e o aumento do alongamento dos mesmos filmes. O estudo demonstrou que a água agiu como um agente plastificante nos filmes com características hidrofílicas.

#### **3.6.4. Solubilidade em água**

A solubilidade é uma importante propriedade do filme de recobrimento e de acordo com a sua aplicação a solubilidade em água pode ou não ser desejável. Em produtos com elevada atividade de água é importante que o material de recobrimento seja resistente à água, podendo aumentar a integridade do produto em alguns casos (KOWALCZYK e BARANIAK, 2011). A total solubilidade do filme em água antes do consumo do produto também pode ser uma característica desejável, como por exemplo, em alimentos desidratados, que devem ser hidratados previamente ao consumo ou no caso das coberturas de sementes, que requerem hidratação no momento de sua germinação (BATISTA, 2004).

DIAS et al. (2010) observaram que o aumento do teor de glicerol aumentou a permeabilidade ao vapor de água de filmes a base de amido de arroz e associou esse comportamento com o alto coeficiente de solubilidade desses filmes, promovido pelo glicerol. Quando a concentração de glicerol foi aumentada de 20% para 30%, o coeficiente de solubilidade teve um aumento de 40%.

A pectina é um polissacarídeo altamente higroscópico e se desintegra rapidamente em água (SHIH, 1996). A adição de compostos com natureza hidrofóbica, como os ácidos graxos, em filmes a base de pectina é uma alternativa quando a solubilidade se apresenta como fator limitante para o uso destes filmes. Porém, se estes não forem corretamente incorporados à matriz filmogênica, podem causar danos às propriedades óticas e mecânicas dos filmes (BATISTA, 2004).

#### **3.6.5. Propriedades óticas**

Dentre as propriedades óticas de um filme destacam-se a cor e opacidade dos filmes. A opacidade de um material demonstra sua maior ou menor transparência e a cor está relacionada com o tipo de material utilizado para sua elaboração. A transparência de um material é caracterizada pelo bloqueio da passagem de luz. (OLIVEIRA, 1996).

Em algumas aplicações, como por exemplo, embalagens de alimentos, a transparência dos materiais de recobrimento é uma vantagem, pois ele permite que o

consumidor veja o produto antes de sua compra. Por outro lado, as embalagens têm a função de proteger o produto contra possíveis danos causados pela incidência da luz (KOWALCZYK e BARANIAK, 2011).

As características óticas são relevantes para os recobrimentos devido às modificações que podem ocorrer na aparência dos produtos revestidos (FABRA et al., 2010). No entanto, os filmes podem ser caracterizados em relação a sua cor, mas esse não é um parâmetro limitante de uso (OLIVEIRA, 1996).

ZIANI *et al.* (2010) estudaram o recobrimento de sementes de alcachofra com filmes bioativos a base de quitosana e observaram o aumento do brilho das sementes recobertas, sendo que esta característica foi mais intensa quando foi aumentado o número de camadas utilizadas no processo de recobrimento.

### **3.6.6. Análise termogravimétrica**

As análises térmicas são constituídas por métodos que medem variação das propriedades físico-químicas das substâncias, incluindo as mudanças de peso ou de energia em função da temperatura, sendo que as técnicas mais utilizadas são: termogravimetria, análise térmica diferencial (DTA) e calorimetria diferencial exploratória (DSC) (SANTOS, 2008).

Os resultados das análises são expressos como um gráfico de massa em função da temperatura ou do tempo, sendo que essa curva pode ser expressa, também, como a primeira derivada da massa. As regiões horizontais demonstram temperaturas que não ocorrem alterações de massa, enquanto nas partes curvas ocorre perda de peso (SANTOS, 2008).

A termogravimetria determina as temperaturas de decomposição de substâncias orgânicas e inorgânicas. As análises térmicas têm sido muito utilizadas na caracterização de mistura de polímeros/fármacos, comumente para determinação de temperatura e a entalpia de fusão e de recristalização, assim como a temperatura de transição vítrea, que são fatores que ajudam a elucidar as interações ocorridas na formulação e permitem avaliar

a cristalinidade do material (VAN DROOGE *et al.*, 2006; GUPTA *et al.*, 2004; MENON *et al.*, 2002).

A análise térmica é útil na identificação de compostos poliméricos do material analisado, especialmente para detecção de blendas poliméricas. Para fins qualitativos, a análise térmica combinada com técnicas como espectroscopia de infravermelho e microscopia ótica é comumente utilizada na identificação estrutural do material (LEMOS, 2003).

GHAFFARI *et al.* (2007) caracterizaram filmes a base de pectina/quitosana/Eudragit e obtiveram análises termogravimétricas de cada um desses compostos puros, sendo que para a pectina, os resultados de degradação ficaram entre 200 e 234 °C, atribuídos a despolimerização da cadeia de pectina.

TRIPATHI *et al.* (2010) em estudos sobre a preparação e avaliação físico-química de filmes ternários a base de quitosana/poli (vinil álcool)/pectina, encontraram, nas análises termogravimétricas, valores para a degradação desses filmes ternários entre 250 e 350 °C e consideraram como satisfatório o resultado obtido para aplicação em embalagens de alimentos.

### **3.7. Filmes ativos antimicrobianos**

Sistemas inovadores de recobrimentos ativos capazes de interagir de forma desejável com o produto recoberto têm sido desenvolvidos nas últimas décadas (ROONEY, 2005). Além de proteger o produto embalado dos mais freqüentes mecanismos de deterioração, esta transformação atende também às crescentes exigências dos consumidores em relação à segurança alimentar (HAN, 2005).

Filme ativo pode ser definido como uma forma de revestimento na qual o filme, o produto e a interação destes com o meio ambiente estendem o tempo de armazenamento e melhoram a qualidade desse produto, através de uma função específica complementar na preservação do mesmo (SUPPAKUL *et al.*, 2003).

Baseado no conhecimento da degradação do produto a ser recoberto e das suas condições de estocagem é possível especificar as propriedades dos filmes ativos de maneira a se controlar o ambiente ao redor desse produto (ROONEY, 2005). O mecanismo de ação destes sistemas visa a transferência do agente ativo incorporado na matriz polimérica para o produto, de maneira a manter uma concentração predeterminada do composto ativo na superfície por um determinado tempo e dessa forma, prevenir ou inibir o crescimento de microrganismos deterioradores ou patogênicos no produto (BUONOCORE *et al.*, 2003).

O recobrimento de sementes com uma camada fina e uniforme de filme polimérico, contendo aditivos (pesticidas, nutrientes, corantes entre outros), forma uma espécie de embalagem ativa que minimiza a perda dos aditivos aplicados, podendo representar uma boa alternativa para a agricultura (DUAN e BURRIS, 1997).

ZIANI *et al.* (2010) avaliaram a aplicação de recobrimentos bioativos baseados em quitosana para a proteção de sementes de alcachofra. Os resultados da primeira parte do estudo utilizando-se filmes a base de quitosana sem a incorporação do fungicida dissulfeto de tetrametiluram (TMTD) demonstraram que o recobrimento não afetou significativamente o processo de germinação das sementes e a ação antifúngica desse filme reduziu o número de *Aspergillus niger*, *Alternaria alternata* e outros fungos (não citados), porém não foi efetiva contra *Rhizopus*. Na segunda parte do estudo, foi verificado que a adição do fungicida TMTD na formulação de recobrimento aumentou significativamente o percentual de germinação em relação ao controle (sem recobrimento) e ao recobrimento sem TMTD. Também foi observada uma maior efetividade da ação antifúngica do filme contendo TMTD, especialmente contra o fungo *Rhizopus*.

PELLISSARI *et al.* (2009) comprovaram o efeito antimicrobiano de filmes de amido de mandioca e quitosana contendo óleo essencial de orégano contra *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis*, e *Staphylococcus aureus*.

SÁNCHEZ-GONZÁLEZ *et al.*, (2011) confirmaram a atividade antimicrobiana de recobrimento a base de quitosana e óleo de bergamota em uva, cultivar Moscatel, contra o crescimento de leveduras no período de pós-colheita, sob condições de refrigeração.

PASTOR *et al.* (2010) estudaram a atividade antifúngica de filmes ativos a base de hidroxipropilmetilcelulose (HPMC) contendo própolis contra *Penicillium italicum* e *Aspergillus niger*. Os filmes apresentaram efetividade na ação antifúngica contra os fungos estudados, sendo mais intensa contra *Penicillium sp.*, demonstrando que as propriedades das substâncias ativas naturais da própolis foram preservadas. Os autores concluíram que esses filmes podem ser utilizados para controlar o ataque de fungos em gêneros alimentícios e sugeriram novas pesquisas para aplicação desses filmes.

### 3.8. Própolis

O número de pesquisas sobre a incorporação de própolis em filmes poliméricos ainda é muito reduzido, sendo que a maioria desse não são para aplicações alimentícias (PASTOR *et al.*, 2010). A aplicação deste tipo de filme foi recomendada por JULIANO *et al.* (2007) para a indústria farmacêutica, agrícola e alimentícia, baseada em resultados obtidos em pesquisa com filmes poliméricos para liberação local de própolis em cavidade oral. BUDIJA *et al.* (2008) investigaram e apresentaram a possibilidade do uso de extratos de própolis para tratamento de madeira.

A própolis é um produto constituído por uma mistura de resinas vegetais coletadas por abelhas em uma grande diversidade de plantas. Esse produto é utilizado, principalmente para proteger a colméia contra a invasão de microorganismos (PARK *et al.*, 2002).

A coloração, a consistência e a sua composição química, depende fortemente da estação do ano e da região visitada pelas abelhas (SFORCIN *et al.*, 2001). As substâncias que constituem a própolis estão diretamente relacionadas com a composição química da resina da planta de origem. Os flavonóides (compostos fenólicos) têm sido considerados como um dos principais constituintes biologicamente ativos da própolis (CABRAL, *et al.* 2009), no entanto, sua composição apresenta ainda outras substâncias: ceras, óleos essenciais, pólen e vários componentes orgânicos como ferro e zinco, vitaminas (B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>3</sub> e B<sub>6</sub>), ácido benzóico, éster, cetonas, lactonas, quinona, esteróides e açúcares e ainda pigmentos naturais como clorofilas e carotenóides (CAVACO *et al.*, 2008; JULIANO *et al.*, 2007; FARRÉ *et al.* 2004)

A própolis brasileira, devido a grande diversidade de sua flora, está classificada em 13 tipos, de acordo com a sua constituição química e também pela avaliação de suas atividades antimicrobianas e antioxidantes. O mais recente tipo de própolis classificado, o 13º tipo, é denominado de “própolis-vermelha”, devido a sua coloração vermelha intensa. A própolis vermelha vem sendo encontrada ao longo do mar e costa de rios no nordeste brasileiro e sua coloração se deve, principalmente, pela coleta das abelhas, do exsudado vermelho da superfície da *Dalbergia ecastophyllum*. A própolis com origem botânica exclusiva de *D. ecastophyllum* apresentou atividade antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus* maior que a própolis com origem de mistura de outras plantas (DAUGSCH *et al.* 2006; CABRAL *et al.* 2009).

Dentre outras atividades biológicas da própolis, as propriedades antimicrobianas têm sido amplamente investigadas e vários autores têm demonstrado essas características (ORSI *et al.*, 2005; SFORCIN *et al.*, 2001; KUJUMGIEV *et al.*, 1999; GRANGE e DAVEY, 1990). KALOGEROPOULOS *et al.* (2009) demonstraram as propriedades antioxidantes e antimicrobianas de extratos de própolis obtidos na Grécia e no Chipre e concluíram que além de seu potencial uso farmacêutico, baixas concentrações dos extratos de própolis estudados poderiam ser utilizados como aditivos antioxidantes e antimicrobianos para proteção se alimentos.

A atividade antimicrobiana dos extratos de própolis é influenciada pelo solvente utilizado para o seu preparo (TOSI *et al.*, 1996). Extratos aquosos de própolis brasileira mostraram um efeito antibiótico contra alguns patógenos de plantas: *Agrobacterium tumefaciens*, *Clavibacter michiganensis* e *Xanthomonas axonopodis*. *Erwinia chrysanthemi* foi em parte inibida, embora *Pseudomonas syringae* não tenha sido inibida (BIANCHINI e BEDENDO, 1998). A atividade antifúngica da própolis em diferentes espécies de *Candida* foi demonstrada por UZEL *et al.*, 2005 e testes *in vitro* contra leveduras identificadas como causadores de onicomicoses também demonstram excelentes atividades fungistática e fungicida (OLIVEIRA *et al.*, 2006; LONGHINI *et al.*, 2007).

A análise dos efeitos da incorporação de extrato hidroalcoólico de própolis vermelha em filmes bioativos a base de colágeno tipo I para reparação cicatricial por segunda intenção, em ratos, foi estudada por ALBUQUERQUE-JUNIOR *et al.* (2009). Os resultados do estudo sugerem que os filmes de colágeno são úteis para melhorar a cicatrização de

lesões cutâneas por segunda intenção e, a adição de 0,1% do extrato hidroalcoólico de própolis vermelha brasileira, aparentemente estimula a fibroplasia cicatricial sem efeitos tóxicos. Os autores concluíram que esses filmes podem ser considerados como curativos promissores para oclusão de ferida e reparação cicatricial.

PASTOR *et. al.* (2010) verificou a ação antifúngica de filmes a base de hidroxipropilmetilcelulose contendo própolis contra *Aspergillus niger* e *Penicillium sp*, sendo que a ação foi mais intensa contra *A. niger*.

Assim, a utilização de recursos naturais, como pectina e própolis, para confecção de biomateriais de recobrimento de sementes é uma tecnologia inovadora para o setor agrícola, especialmente para o mercado de sementes de girassol que tem se destacado devido ao grande potencial de produção no Brasil, ainda pouco explorado. Além disso, recentes discussões sobre as questões ambientais têm aumentado a demanda por produtos naturais a fim de reduzir os impactos causados ao meio ambiente e também à saúde humana.

#### 4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABOISSA, Óleos Vegetais. Girassol, disponível em:

<http://www.aboissa.com.br/girassol/index.html>, consultado em 13/09/2010.

ALBUQUERQUE-JÚNIOR, R. L. C.; BARRETO, A. L. S.; PIRES, J. A.; REIS, F. P.; LIMA, S. O.; RIBEIRO, M. A. G.; CARDOSO, J. C. Effect of Bovine Type-I Collagen-Based Films Containing Red Propolis on Dermal Wound Healing in Rodent Model. *International Journal of Morphology*, 27, p.1105-1110, 2009.

ALVES, V.D.; COSTA, N.; COELHO, I.M. Barrier properties of biodegradable composite films based on kappa-carrageenan/pectin blends and mica flakes. *Carbohydrate Polymers*, 79, p. 269–276, 2010.

BATISTA, J. A.; TANADA-PALMU, P. S.; GROSSO, C. R. F. Efeito da adição de ácidos graxos em filmes à base de pectina. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 25, p. 781-788, 2005.

BATISTA, J.A. **Desenvolvimento, caracterização e aplicações de biofilmes a base de pectina, gelatina e ácidos graxos em bananas e sementes de brócolos**. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, São Paulo, 2004.

BERTUZZI, M.A.; CASTRO VIDAURRE, E.F.; ARMADA, M.; GOTTIFREDI, J.C. Water vapor permeability of edible starch based films. *Journal of Food Engineering*, 80, 972–978, 2007.

BIANCHINI, L.; BEDENDO, I.P. Efeito antibiótico do Própolis sobre bactérias fitopatogênicas. *Scientia Agricola*, 55, p. 1-6, 1998.

BIODIESELBR, disponível em : <http://www.biodieselbr.com/noticias/em-foco/usina-biodiesel-petrobras-candeias-ba-duplicada-010310.htm>, consultado em 21/04/2011.

BRASIL. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. Regras para Análise de Sementes. Brasília: SNDA/DNDV/CLAV, 1992.

BUCHANAN, B.B.; GRUÍSSEM, W, W.; JONES, R.L. (Eds.) **Biochemistry and Molecular Biology of Plants**. Rockville: American Society of Plant Physiologists, 2000.

BUDIJA, F.; KRICEJ, B.; PETRIC, M. Possibilities of use of propolis for wood finishing. *Wood Research*, 53, p. 91–101, 2008.

BUONOCORE, G. G.; DEL NOBILE, M. A.; PANIZZA, A.; CORBO, M. R. A general approach to describe the antimicrobial release from highly swellable films intended for food packaging applications. *Journal of Controlled Release*, 90, p. 97-107, 2003.

CABRAL, I. S. R.; OLDONI, T.L.C.; PRADO A.; BEZERRA R. M. N.; ALENCAR, S.M. Composição fenólica, atividade antibacteriana e antioxidante da própolis vermelha brasileira. *Química Nova*, 32, p. 1523-1527, 2009.

CÂMARA, G. M. S. *O Agronegócio das plantas oleaginosas: algodão, amendoim, girassol e mamona*. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 204 p., 2001.

CASTIGLIONI, V. B. R.; BALLA, A.; CASTRO, C.; SILVEIRA, J. M. *Fases de desenvolvimento da planta do girassol*. Documentos, EMBRAPA-CNPSO. N.58, 24 p., 1994,.

CAVACO, A. M.; CRUZ, C.; FERREIRA, A. L.; GUIA, M. D.; ANTUNES, M. D.; MIGUEL, M. G.. **Pigments, protein and activity of antioxidant enzymes in propolis collected at various sites of Algarve**. In R. Oria, J. Val, & A. Ferrer (Eds.), *Avances en maduración y post-recolección de frutas y hortalizas*.. Acribia, S.A.: Zaragoza, p. 286–293, 2008.

CHANDRA, R.; RUSTGI, R. Biodegradable polymers progress. *Polymer Science*, .23, p.1273-1335, 1998.

COFFIN, D. R.; FISHMAN, M. Physical and mechanical properties of highly plasticized pectin/starch films. *Journal of Applied Polymer Science*, v.54, n.9, p.1311-1320, 1994.

CONAB, Companhia Nacional de Abastecimento, disponível em: <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/9819336a8f9c96ab758a0d69e57638d7..pdf>, acesso em 09/04/2011.

CUQ, B.; GONTARD, N.; CUQ, J. L.; GUILBERT, S. Functional properties of myofibrillar protein based biopackaging as affected by film thickness. *Journal of Food Science*, 61,.3, p.580-584, 1996.

CUQ, B., GONTARD, N.; GUILBERT, S. **Edible films and coatings as active layers. Active Food Packaging**, M. Rooney (Ed.), p. 111-142, 1995.

DAUGSCH, A.; MORAES C.S.; FORT P.; PACHECO E.; LIMA I.B.; ABREU J.A.; PARK, Y.K. Própolis Vermelha e sua origem botânica. *Mensagem Doce*, 89, 2006, disponível em <http://www.apacame.org.br/mensagemdoce/89/artigo.htm>, acessada em 21/01/2011.

DAVET, P.; PÉRÈS, A.; REGNAULT, Y.; TOURVIEILLE, D.; PENAUD, A. **Les maladies du tournesol**. Paris: CETIOM, 1991.

DIAS, A. B.; MULLER, C. M.O.; LAROTONDA, F.D.S.; LAURINDO, J. B. Biodegradable films based on rice starch and rice flour. *Journal of Cereal Science*, 51, p. 213–219, 2010.

DOW, disponível em: [http://www.dow.com/PublishedLiterature/dh\\_0034/0901b80380034a21.pdf?filepath=propyleneglycol/pdfs/noreg/117-01144.pdf&fromPage=GetDoc](http://www.dow.com/PublishedLiterature/dh_0034/0901b80380034a21.pdf?filepath=propyleneglycol/pdfs/noreg/117-01144.pdf&fromPage=GetDoc), acessado em 11/08/2010.

DUAN, X.; BURRIS, J.S. Seed physiology, production & technology: film coating impairs leaching of germination inhibitors in sugar beet seed. *Crop Science*, .37, p.515-520, 1997.

EMBRAPA, Girassol, disponível em: [http://www.cnpso.embrapa.br/index.php?op\\_page=54&cod\\_pai=38](http://www.cnpso.embrapa.br/index.php?op_page=54&cod_pai=38), consultado em 13/09/2010.

FABRA, M.J.; TALENS P.; CHIRALT, A. Influence of calcium on tensile, optical and water vapour permeability properties of sodium caseinate edible films. *Journal of Food*

*Engineering*, 96, p. 356-364, 2010.

FALGUERA, V.; QUINTERO, J. P.; JIMENEZ, A.; MUÑOZ, J. A.; IBARZA, A. et al., Edible films and coatings: structures, active functions and trends in their use, *Trends in Food Science & Technology*, 2011, doi:10.1016/j.tifs.2011.02.004.

FARRÉ, R.; FRASQUET I.; SÁNCHEZ, A. (2004). Propolis and human health. *Ars Pharmaceutica*, 45, p. 21–43, 2004.

FARRO, P.C.A. **Desenvolvimento de filmes biodegradáveis a partir de derivados do grão de quinoa (*Chenopodium quinoa Willdenow*) variedade “Real”**. Tese de doutorado, Universidade Estadual de Campinas, 2008.

FREIRE, A. de L.; MENINO, I.B.; FILHO, J.B.; NETO, M.B. Sistema de Produção do Girassol para as Mesorregiões do Agreste Paraibano e da Mata Paraibana. João Pessoa: EMEPA, 17 p., 2007

GENNADIOS, A.; WELLER, C. L.; TESTIN, R. F. Property modification of edible wheat, gluten-based films. *Transactions of the ASAE*, St. Joseph, v. 36, n. 2, p. 465-470, 1993.

GHAFFARI, A.; NAVAEE, K.; OSKOUI, M.; BAYATI, K.; RAFIEE-TEHRANI, M. Preparation and characterization of free mixed-film of pectin/chitosan/Eudragit intended for sigmoidal drug delivery. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 67, p. 175–186, 2007.

GHASEMLOU, M.; KHODAIYAN, F.; OROMIEHIE, A. Physical, mechanical, barrier, and thermal properties of polyol-plasticized biodegradable edible film made from kefiran. *Carbohydrate Polymers*, 84, 477–483, 2011.

GODOY, J.R. de; FERNANDES, N.G. *Alternaria helianthi* (Hansf.) Tubaki & Nishihara em girassol (*Helianthus annuus* L.): influência da idade da planta na suscetibilidade e na infecção das sementes. *Summa Phytopathologica*, 11, p.186-197, 1985.

GOMES, D. P.; LEITE, R. M. V.B.C.; MORAES, M.F. H.; KRONKA, A.Z., TORRES, S.B.

Sanidade de Sementes de Girassol Provenientes de três municípios do estado do Maranhão. *Revista Caatinga*, v.21, n.1, p. 55-63, 2008.

GRANGE, J.M.; DAVEY, R.W. Antibacterial properties of propolis (bee glue). *Journal of the Royal Society of Medicine*, 83, p. 159-160, 1990.

GRISI, P. U.; SANTOS, C. M.; FERNANDES, J. J.; SÁ JÚNIOR, A. A qualidade das sementes de girassol tratadas com inseticidas e fungicidas. *Bioscience Journal Uberlândia*, 25, p. 28-36, 2009.

GUILBERT, S.; CUQ, B.; GONTARD, N. Recent innovations in edible and/or biodegradable packaging materials. *Food Additives and Contaminants*, 14, p. 741-751, 1997.

GUPTA, P.; CHAWLA, G.; BANSAL, A.K. Physical stability and solubility advantage from amorphous celecoxib; The role of thermodynamic quantities and molecular mobility. *Molecular Pharmacology*, 1, p. 406-413, 2004.

HAN, J. H. Antimicrobial packaging systems. Ed. HAN, J. H. In: **Innovations in Food Packaging**. Elsevier Academic Press, p.80-101, 2005.

HENNING, A A. *Patologia e tratamento de sementes: Noções gerais*. Londrina: Embrapa Soja Documentos, 2004, 51 p., 2004.

JULIANO, C.; PALA, C. L.; COSSU, M. Preparation and characterisation of polymeric films containing propolis. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 17, 177–181, 2007.

KAKIDA, J.; GONÇALVES, N. P.; MARCIANI-BENDEZÚ, J.; ARANTES, N. E. *Cultivares de girassol*. Informe Agropecuário, 7(82): 76-78, 1981.

KALOGEROPOULOS, N.; KONTELES, S. J.; TROULLIDOU, E.; MOURTZINOS, I.; KARATHANOS, V. T. Chemical composition, antioxidant activity and antimicrobial properties of propolis extracts from Greece and Cyprus. *Food Chemistry*, 116, p. 452–461, 2009.

KANG, H. J.; JO, C.; LEE, N. Y.; KWON, J. H. & BYUN, M. W. A combination of gamma

irradiation and CaCl<sub>2</sub> immersion for a pectin-based biodegradable film. *Carbohydrate Polymer*, 60, 547–551, 2005.

KAVAK, S.; ESER B. Influence of polymer coatings on water uptake and germination of onion (*Allium cepa* L. cv. Aki) seeds before and after storage. *Scientia Horticulturae*, 121 p. 7–11, 2009.

KESTER, J. J.; FENNEMA, O. R. Edible films and coatings: a review, *Food Technology*, 40, p. 47-59, 1986.

KOWALCZYK, D.; BARANIAK, B. Effects of plasticizers, pH and heating of film-forming solution on the properties of pea protein isolate films. *Journal of Food Engineering*, 105, 295–305, 2011.

KROCHTA, J. M.; DE MULDER-JOHNSTON, C. Edible and biodegradable polymer films: challenges and opportunities. *Food Technology*, 51, p.61-74, 1997.

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

LAZZAROTTO, J. J.; ROESSING, A. C.; MELLO, H. C. *O agronegócio do girassol no mundo e no Brasil*. In: LEITE, R. M.V.B. de C.; BRIGHENTI, A. M.; CASTRO, C. *Girassol no Brasil*. Londrina: Embrapa Soja, p.16-42, 2005.

LEITE, R.M.V.B. de C. *Doenças do girassol*. Londrina: EMBRAPA/CNPSo, Circular Técnica, 19, 68 p., 1997.

LEMOS, A.B. Generalidades da Análise Térmica. Boletim de Tecnologia e Desenvolvimento de Embalagens. CETEA-ITAL, 15, no. 3, 2003.

LONGHINI R.; RAKSA, S.M.; OLIVEIRA, A.C.P., SYIDZINSK, T.I.E.; FRANCO, S.L. Obtenção de extratos de própolis sob diferentes condições e avaliação de sua atividade antifúngica. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 17, p. 388-395, 2007.

LOPES, J. Biodiesel em trator: Qual o consumo? III Simpósio Nacional de Girassol, XV Reunião Nacional de Girassol. Ribeirão Preto. SP. CD- ROM, Outubro de 2003.

MACHADO, J.,C. Padrões de tolerância de patógenos associados às sementes. Revisão anual de Patologia de Plantas, v.2, p.229-262, 1994.

MACLEOD, G. S., FELL, J. T., COLLETT, J. H. Studies on the physical properties of mixed pectin/ethylcellulose films intended for colonic drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, 157, p.53-60, 1997.

MAFTOONAZAD, N.; RAMASWAMY, H.S.; MOALEMIYAN M.; KUSHALAPPA, A.C. Effect of pectin-based edible emulsion coating on changes in quality of avocado exposed to *Lasiodiplodia theobromae* infection. *Carbohydrate Polymers*, 68, p. 341–349, 2007.

MALI, S.; SAKANAKA, L.S.; YAMASHITA, F. & GROSSMANN, M.V.E. Water sorption and mechanical properties of cassava starch films and their relation to plasticizing effect. *Carbohydrate Polymers*, 60, 283-289, 2005.

MAY, C.D. Pectins. In: A. Imeson (Ed.) **Thickening and Gelling Agents for Food**. London: Blackie Academic & Professional, p. 230-261, 1997.

McHUGH, T. H., KROCHTA, J. M. Sorbitol vs glycerol plasticized whey protein edible films: integrated oxygen permeability and tensile property evaluation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42, p.841-845, 1994.

MENON D.; EL-RIES, M., ALEXANDER, K.S.; RIGA, A.; DOLLIMORE, D. A thermal analysis study of the decomposition of hydrochlorothiazide. *Instrumentation Science Technology*, 30, p. 329-340, 2002.

MULLER, C.M.O.; YAMASHITA, F.; LAURINDO, J.B. Evaluation of the effects of glycerol and sorbitol concentration and water activity on the water barrier properties of cassava starch films through a solubility approach. *Carbohydrate Polymers*, 72, p. 82–87, 2008.

OLIVAS, G. I., & BARBOSA-CÁNOVAS, G.V. Alginate–calcium films: Water vapor permeability and mechanical properties as affected by plasticizer and relative humidity. *LWT-Food Science and Technology*, 41, p. 359–366, 2007.

OLIVEIRA, A.C.P.; SHINOBU, C. S.; LONGHINI R.; FRANCO, S.L.; SYIDZINSKI, T.I.E. Antifungal activity of propolis extract against yeasts isolated from onychomycosis lesions. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 101, p. 493-497, 2006.

OLIVEIRA, L. M. *Ensaio para avaliação de embalagens plásticas flexíveis*. Campinas: Centro de Tecnologia de Embalagem, CETEA, p. 219, 1996.

ORSI, R.O., SFORCIN, J.M., FUNARI, S.R.C. e BANKOVA, V. Effects of Brazilian and Bulgarian propolis on bactericidal activity of macrophages against *Salmonella Typhimurium*. *International Immunopharmacology*, 5, p. 359-368, 2005.

PAIVA, E. P.; LIMA, M.S.; PAIXÃO J.A. Propriedades químicas de las Pectinas. *Revista Iberoamericana de Polímero*, p. 196-211, 2009.

PARK, H. J.; CHINNAN, M. S. Gas and water vapor barrier properties of edible films from protein and cellulosic materials. *Journal of Food Engineering*, 25, p. 497-507, 1995.

PARK, Y. K.; ALENCAR, S.M.; AGUIAR, C.L Botanical Origin and Chemical Composition of Brazilian Propolis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, p. 2502-2506, 2002.

PASTOR C., SANCHEZ-GONZALES L., CHAFER M., CHIRALT A., GONZALES-MARTINEZ C. Physical and antifungal properties of hydroxypropylmethylcellulose based films containing propolis as affected by moisture content. *Carbohydrate Polymers*, 82, p. 1174–1183, 2010.

PELISSARI, F. M., GROSSMANN, M. V. E., YAMASHITA, F., PINEDA, E. A. G. Antimicrobial, mechanical, and barrier properties of cassava starch-chitosan films incorporated with oregano essential oil. *Journal of Agricultural Food and Chemistry*, 57, 7499 – 7504, 2009.

PEREYRA, V.; ESCANDE, A.R. **Enfermedades del girasol en la Argentina: manual de**

**reconocimiento.** Balcarce: INTA, 113p., 1994.

ROBERTSON, G. L. Optical and mechanical properties of thermoplastic polymers. In Food Packaging: **Principles and Practice**, New York: Marcel Dekker, p.63-107, 1993.

ROONEY, M. L. **Introduction to active food packaging technologies.** Ed. HAN, J. H. In: Innovations in Food Packaging. Elsevier, 2005.

SALUSTIANO, M.E.; MACHADO, J.C.; PITTIS, J.E.. Patogenicidade de *Alternaria helianthi* (HANSF.) e *Alternaria zinniae* (PAPE) ao girassol a partir de sementes. *Revista Brasileira de Sementes*, 27, p. 138-143, 2005.

SÁNCHEZ-GONZÁLEZ L., PASTOR, C., VARGAS, M., CHIRALT, A., GONZÁLEZ-MARTÍNEZ, C., CHÁFER, M. Effect of hydroxypropylmethylcellulose and chitosan coatings with and without bergamot essential oil on quality and safety of cold-stored grapes. *Postharvest Biology and Technology*, 60, 57–63, 2011.

SANTOS, A.S. **Avaliação das propriedades de estado sólido de dispersões de hidroclorotiazida em polivinilpirrolidona.** Tese de Doutorado, USP, Ribeirão Preto, 2008.

SFORCIN, J.M.; FERNANDES, A., JR.; LOPES, C.A.M.; FUNARI, S.R.C.;BANKOVA, V. Seasonal effect of Brazilian propolis on *Candida albicans* and *Candida tropicalis*. *Journal of Venomous Animals and Toxins*, p. 139-144, 2001.

SHIH, F. F. Edible films from rice protein concentrate and pullulan. *Cereal Chemistry*, 73, p.406-409. 1996.

SILVA, M.A.; BIERHALZ, A.C.K.; KIECKBUSCH, T. G. Alginate and pectin composite films crosslinked with Ca<sup>2+</sup> ions: Effect of the plasticizer concentration. *Carbohydrate Polymers*, 77, 736–742, 2009.

SOBRAL, P.J.A.; MONTERREY-QUINTERO, E.S.; HABITANTE, A.M.Q.B. Glass transition of Nile tilapia myofibrillar protein films plasticized by glycerin and water. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 67, n.2, p.499-504, 2002.

SOUTO-MAIOR, J. F. A. ; REIS , A. V.; PEDREIRO, L. N. ; CAVALCANTI, O. A. Avaliação da pectina fosfatada aplicada na formação de filmes isolados. Material candidato a novos sistemas para liberação modificada de fármacos. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences, Brasil*, 44, p. 203-213, 2008.

SRIAMORNSAK, P., KENNEDY, R. A. Swelling and diffusion studies of calcium polysaccharide gels intended for film coating. *International Journal of Pharmaceutics*, 358, p.205-213, 2008.

SUPPAKUL, P., MILTZ, J., SONNEVELD, K., BIGGER, S. W., Active packaging technologies with emphasis on antimicrobial packaging and its application. *Journal of Food Science*, 68, p. 408-420, 2003.

THAKUR, B. R.; SINGH, R. K.; HANDA, A. K. Chemistry and uses of pectin – A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 37, p. 47 – 73, 1997.

THARANATHAN, R.N. Biodegradable films and composite coatings: past, present and future. *Food Science & Technology*, 14, 71–78, 2003.

TOSI, B., DONINI, A., ROMAGNOLI, C.; BRUNI, A. Antimicrobial activity of some commercial extracts of propolis prepared with different solvents. *Phytotherapy research: PTR*, v. 1014, p. 335-336, 1996.

TRIPATHI S., MEHROTRA, G.K; DUTTA, P.K. Preparation and physicochemical evaluation of chitosan/poly(vinyl alcohol)/pectin ternary film for food-packaging applications. *Carbohydrate Polymers*, 79, p.711–716, 2010.

UZEL, A., SORKUN, K., ÖNCAG, Ö., COGULU, D., GENÇAY, Ö. e SALIH, B. Chemical compositions and antimicrobial activities of four different Anatolian propolis samples. *Microbiological Research*, 160, p. 189-195, 2005.

VAN DROOGE D.J.; HINRICHS, W.L.J.; VISSER, M.R.H.W.; FRIJLINK, H.W. Characterization of the molecular distribution of drugs in glassy solid dispersion at nanometer

scale, using differential scanning calorimetry and gravimetric water vapour sorption techniques. *International Journal of Pharmacology*, 310, p. 220-229, 2006.

VIEIRA, M.G.A., SILVA, M. A., SANTOS, L. O., BEPPU, M. M. Natural-based plasticizers and biopolymer films: A review. *European Polymer Journal*, 47, 254–263, 2011.

ZIANI, K.; URSÚA, B., MATÉ, J. Application of bioactive coatings based on chitosan for artichoke seed protection. *Crop Protection*, 29, p.853-859, 2010.

ZIMMER, D.E.; HOES, J.A. Diseases. In: CARTER, J.F. ed. **Sunflower science and technology**. Madison: American Society of Agronomy, p. 225-262, 1978.

## 5. CAPÍTULO 2

### THE USE OF PECTIN-BASED FILMS CONTAINING RED PROPOLIS EXTRACT FOR SUNFLOWER SEED PROTECTION

The use of pectin-based films containing red propolis extract  
for sunflower seed protection

Sueli José Pereira Corrêa<sup>a</sup>, Andrielle Barbosa Mendonça<sup>a</sup>, Luiz Pereira da Costa<sup>b</sup>,  
Luzia Nilda Tabosa Andrade<sup>c</sup>, Neusa Rosani Stahlschmidt Lima<sup>c</sup>, Daniel Razzo<sup>b</sup>,  
Alessandra Silva Rabelo<sup>a</sup>, Renan Tavares Figueiredo<sup>a,d</sup>, Francine Ferreira  
Padilha<sup>a,d</sup>, Juliana Cordeiro Cardoso<sup>a,d</sup>

<sup>a</sup> Universidade Tiradentes – Av. Murilo Dantas, 300, B. Farolândia, CEP 49032-490  
– Aracaju/SE, Brasil

<sup>b</sup> Universidade Estadual de Campinas - Avenida Albert Einstein 1251, CEP 13084-  
971 Campinas/ SP, Brasil

<sup>c</sup> Empresa de Desenvolvimento Agropecuário de Sergipe Av. Carlos Rodrigues da  
Cruz - Centro Administrativo Augusto Franco – Bairro Capucho, CEP 49080-190 –  
Aracaju/SE, Brasil

<sup>d</sup> Instituto de Tecnologia e Pesquisa - Av. Murilo Dantas, 300, B. Farolândia, CEP  
49032-490 – Aracaju/SE, Brasil

Corresponding author:

Profa. Dra. Juliana Cordeiro Cardoso

Laboratório de Biomateriais – Instituto de Tecnologia e Pesquisa

Av. Murilo Dantas, 300, B. Farolândia, CEP 49032-490 – Aracaju/SE, Brasil

Tel/fax: 00 55 79 32182190

e-mail: [juaracaju@yahoo.com.br](mailto:juaracaju@yahoo.com.br)

## **Abstract**

The aim of this study was to develop a pectin-based film containing hydroalcoholic red propolis extract (HPE) for protectively coating seeds against *Alternaria alternata* contamination. The propylene glycol-plasticized films were developed experimentally, and the best-performing formulation (2% pectin and 0.6% propylene glycol) was selected for HPE incorporation. The film with 5% HPE had antifungal activity against the phytopathogen and was used to coat the sunflower seeds. The incorporation of HPE improved the mechanical properties of the film and did not change other film characteristics. Photomicrographs were obtained of the films and coated seeds, showing their morphological characteristics. Germination tests of coated seeds did not show an influence of HPE, indicating that this material may be used for seed protection.

Keywords: pectin; film coating; *Alternaria alternata*; sunflower seed; propolis.

## 1. Introduction

The sunflower seeds production is among the main cultures of agricultural sector in the world and this product is used as raw material for production of sunflower oil and food product. Sunflower shows excellent combustion properties and can be used as a source of energy. Annually, 30 million tons of sunflower seeds are produced in some countries of Eastern Europe, the Americas and Asia (Arromdee, Kuprianov, Kaewklum and Sirisomboon, 2010). The most important factor in terms of culture consolidation for grain processing is the quality of the raw material. However, the sunflower shows high susceptibility from contamination with different of *Alternaria* species fungi (Pozzi, Braghini, Arcaro, Zorzete, Israel, Pozar, Denucci and Corrêa, 2005).

Active films were developed to protect different materials, including seeds. Biodegradable films from carbohydrates promote a reduction of the use of synthetic materials and play an important role in coating technology, with the opportunity for the utilization of renewable materials (Dias, Muller, Larotonda & Laurindo, 2010; Batista, Tanada-Palmu & Grosso, 2005). The incorporation of active substances into the film can establish an antimicrobial and antioxidant activity of the membrane, increasing seed protection (Pastor, Sánchez-González, Cháfer, Chiralt & González-Martínez, 2010).

Pectin is a polysaccharide composed by  $\alpha(1\rightarrow4)$ -linked D-galacturonic acid residues. This polymer is frequently used in matrix tablets, gel beads and film-coated dosage forms (Tripathi, Mehrotra & Dutta, 2010). This material is non-toxic and has relatively low production costs (Lui, Fishman & Hicks, 2007; Sungthongjeen, Sriamornsak, Pitaksuteepong, Somsiri, Puttipipatkachorn, 2004). The pectin dispersion gel is a suitable film for coating slippery surfaces, such as those on seeds and grains.

In the film formulation, plasticizers may also be used to improve mechanical properties. Plasticizers intersperse between polymer chains, moving them apart, reducing the rigidity of structures and consequently increasing film flexibility (Guilbert, Gontard & Gorris, 1996). The polymer/plasticizer combination must be studied because the concentration of both components can modify film permeability and mechanical properties (Olivas & Barbosa-Cánovas, 2007; Bifani, Ramírez, Ihl, Rubilar, García & Zaritzky, 2007). The concentration of these compounds and their interactions can affect film properties

differently. Thus, the best concentration of polymer/plasticizer may be verified experimentally.

The introduction of active substances can also change film properties. Red propolis is a resin that presents antibacterial, antioxidant and antifungal activities; it has been incorporated in medicines, cosmetics and food (Pastor, Sánchez-González, Cháfer, Chiralt & González-Martínez, 2010). A limited number of published papers on propolis incorporation into films are available (Kechichian, Ditchfield, Veiga-Santos & Tadini, 2010; Pastor, Sánchez-González, Cháfer, Chiralt & González-Martínez, 2010).

The aim of this study was to develop and characterize a pectin-based film with red propolis extract and to study its antifungal action against *Alternaria alternata*. The germination behavior of coated seeds was also evaluated.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Materials

High methoxyl pectin (PEC) was supplied by CPKelco Brasil S/A (Genu<sup>®</sup> Pectin Food Grade), and propylene glycol (PG) was from VETEC. The samples of red propolis were collected in Sergipe, Brazil (S 10°28'25" e W 36°26'12"), in September 2010. Sunflower seeds (Embrapa 122) and the *Alternaria alternata* strain were obtained from Embrapa Tabuleiros Costeiros, Brazil.

### 2.2. Methods

#### 2.2.1 Preparation and characterization of Hydroalcoholic Propolis Extracts HPE

Propolis samples (1 g) were extracted with 70% ethanol (12.5 mL) at room temperature for 1 hour using an ultrasound bath. After the extraction, the mixture was centrifuged, filtered and the solvent was eliminated.

The chemical profile of HPE was determined using a reversed phase column (XP-ODS 50 x 3 mm; particle size, 2.2 micrometers) and diode array detector (Shimadzu Co.) according to Alencar, Oldoni, Castro, Cabral, Costa-Neto, Cury, Rosalen & Ikegaid, 2007. The HPE 1% (w/v) solution was prepared in methanol and injected into the UFLC system. A linear gradient of water (solvent A) and methanol (solvent B) was performed. At first, 40% of B was used until 22.5 min, followed of 60% of B (37.3 min), 90% of B (42.3 min), and finally 30% of B (42.3 min). The solvent flow rate was 0.4 mL/min. The detection was carried out at 260 nm, and the chromatogram was processed using the specific software LC Solution. Authentic standards of flavonoids and phenolic acids (formononetin, quercetin, kaempferol, pinocembrin, 3-hydroxy-7-methoxyflavone, catechin, epicatechin, rutin, propyl gallate, ferulic acid and p-coumaric acid) were used for identification and quantification of red propolis compounds.

### 2.2.2 Development of film formulation

An experimental design ( $2^2$ ) was carried out using two variables: polysaccharide (PEC) and plasticizer (PG) concentrations, with triplicates on central points (Table1). Polysaccharide and plasticizer concentrations were established based on previous experiments.

**Table 1.** Experimental design: codes and real values of pectin and propylene glycol

Treatments	Code values		Real values *	
	PEC	PG	PEC	PG
1	-1	-1	2.0	0.2
2	+1	-1	3.0	0.2
3	-1	+1	2.0	0.6
4	+1	+1	3.0	0.6
5	0	0	2.5	0.4
6	0	0	2.5	0.4
7	0	0	2.5	0.4

(\*) PEC - % pectin (w/V), PG – % propylene glycol (w/V)

PEC and PG were dispersed in distilled water at 60°C for 30 min according to experimental design concentrations. This filmogenic dispersion was poured (30 mL) into plastic Petri plates (d = 8.5 cm) and dried at 37°C for 24 h. Dry films were peeled off from casting surfaces and kept in desiccators containing an oversaturated NaBr solution (58% RH) at 25°C for 48 hours before the characterization step.

After the selection of formulation of experimental design (treatment 3), the red propolis filmogenic dispersion was obtained. HPE was dissolved in PG (24 h/25°C) and incorporated into pectin dispersion on different concentrations: control without HPE ( $F_0$ ), 1% ( $F_1$ ), 2.5% ( $F_{2.5}$ ), 5% ( $F_5$ ) and 7.5% ( $F_{7.5}$ ).

Film thickness was measured using a digital micrometer ( $\pm 0.001$  mm, Pantec) and the mean value was used in calculations of the mechanical properties and water vapor permeability.

### 2.2.3. Film characterization

#### 2.2.3.1. Water Solubility ( $S_w$ )

Water solubility of films was measured as proposed by Gontard, Duchez, Cuq. & Guilbert, 1994). Film disks ( $d=2$  cm) were dried at  $105^{\circ}\text{C}$  for 24 hours and weighted ( $m_o$ ). The samples were immersed in 50 mL of distilled water and maintained under mild agitation (175 rpm) at  $25^{\circ}\text{C}$  for 24 hours using a shaker (Marconi N1100). After this period, the final dry matter of the sample ( $m_f$ ) was determined using the weight of the dry material ( $105^{\circ}\text{C}/24$  h). Solubilized material ( $S_w$ ) was calculated using Eq.1.

$$S_w = (m_o - m_f) \cdot 100 / m_o \quad (1)$$

#### 2.2.3.2. Optical properties - Colorimetry

The color co-ordinates CIE  $L^*$   $a^*$   $b^*$  were obtained using a CR-10 Color Reader (Konica Minolta). A white surface was used as the standard and the total color differences ( $\Delta E$ ) were calculated using Eq. 2.

$$(\Delta E) = (\Delta L^2 + \Delta a^2 + \Delta b^2)^{0.5} \quad (2)$$

$$\Delta L = L_{\text{standard}} - L_{\text{sample}}, \Delta a = a_{\text{standard}} - a_{\text{sample}} \text{ and } \Delta b = b_{\text{standard}} - b_{\text{sample}}$$

#### 2.2.3.3. Mechanical properties

Mechanical tests were carried out using a texture analyzer (TAXT - Stable Micro System). Tensile strength (TS), elongation at break (E) percentage and Young's modulus (YM) were determined from eight replicates (25 mm x 10 mm) for each film formulation in accordance with ASTM D882 (ASTM, 1995). Samples were fixed between grips; the force and deformation were recorded during extension at 1.00 mm/s, with a 10 mm initial distance between the grips. Tensile strength was calculated using the maximum force at break divided by the initial cross-sectional area of the film strip. The elongation at break was expressed as original length percentage, and Young's modulus was expressed as tensile strength divided by elongation percentage.

#### 2.2.3.4. *Water vapor permeability (WVP)*

Film water vapor permeability (WVP) was determined according to Sprockel, Sen, Shivanand & Prapaitrakul (1997). Cups containing oversaturated ZnSO<sub>4</sub>.7 H<sub>2</sub>O solution (RH 90%) were closed with film and kept in desiccators containing silica gel (RH 0%) at 25°C. The cup was weighed after 48 hours. The WVP was calculated using Eq.3.

$$WVP = W.\delta / [t.S.(vp1 - vp2)] \quad (3)$$

In Eq. 3, W is the amount of the water vapor that crossed through the film after 48 hours (g),  $\delta$  is the average film thickness (mm), t indicates time (hours), S shows the film permeation area (m<sup>2</sup>), vp1 is the water vapor pressure of ZnSO<sub>4</sub>.7 H<sub>2</sub>O (RH 90%) and vp2 is the water vapor pressure of silica gel (RH 0%).

#### 2.2.3.5. *Scanning electron microscopy*

Microstructure analysis of surface and cross-sections of the films was carried out using a JEOL JSM-6360-LV scanning electron microscope. The samples were gold coated and observed using a 20 kV accelerating voltage.

#### 2.2.3.6. *Fourier transformed infra red (FTIR)*

The FTIR spectra of the films were obtained using an FTIR spectrophotometer (IR ILLUMAT II) in the range of 650 and 4000 cm<sup>-1</sup>, with a resolution of 4 cm<sup>-1</sup>. Each spectrum represents an average of 64 consecutive readings.

#### 2.2.3.7. *Thermal Characterization*

Thermogravimetry analysis of F<sub>0</sub> and F<sub>5</sub> was obtained in a thermobalance model TGA-50 (Shimadzu) in a temperature range from 25 to 600°C, using platinum crucibles with 3 mg of samples, under a dynamic nitrogen atmosphere (50 mL min<sup>-1</sup>) and a heating rate of 5°C.min<sup>-1</sup>. The thermogravimetric system was calibrated using a CaC<sub>2</sub>O<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O standard substance in conformity with the ASTM pattern.

#### 2.2.3.8. *Evaluation of antifungal activity of the films*

Disks of colonies of *A. alternata* were placed in Petri plates containing PDA medium for mycelial growth. These disks were deposited on disks of films containing HPE with the same diameter. The plates were incubated at  $25\pm 1^\circ\text{C}$  (Pastor, Sanchez-Gonzalez, Chafer, & González-Martínez Chiralt, 2010), and the diameter of the mycelium was measured after 15 days. The test was conducted with six repetitions for each HPE film concentration, and a control group was used without the presence of the film.

### 2.3. *Seed Coating*

Sunflower seeds were dipped into a coating dispersion for 30 seconds at  $25^\circ\text{C}$  and then dried at  $37^\circ\text{C}$ . This procedure was repeated after 30 min and once more after 24 hours. The groups used in this process were seeds coated with filmogenic dispersion without HPE ( $\text{SC}_0$ ), seeds coated with filmogenic dispersion with HPE 5% ( $\text{SC}_5$ ) and uncoated seeds (S).

#### 2.3.1. *Characterization of coated seeds*

##### 2.3.3.1. *Scanning electron microscopy*

Microstructural analyses of coated sunflower seed cross-sections were carried out using a JEOL JSM-6360-LV scanning electron microscope. The sample was gold coated and observed using an accelerating voltage of 20 kV.

##### 2.3.3.2. *Germination Tests*

Laboratory germination tests were performed with uncoated seeds (S), coated seeds without HPE ( $\text{SC}_0$ ) and coated seeds with HPE 5% ( $\text{SC}_5$ ). For the germination tests, 8 repetitions of 25 sunflower seeds were performed for each group. These seeds were distributed on two germitest paper germination sheets, moistened with distilled water (up to 2.5 times the weight of the paper) and kept in an incubator (Mangelsdorf) at  $20^\circ\text{C}$ . The data were recorded as counts of seeds that presented development of primary roots at four days and at the final of germination after ten days, according to the requirement of the Rules for

Testing Seeds. The effect of coating with or without HPE was calculated as the percentage of germinated seeds (BRASIL, 2009).

Greenhouse germination tests were performed with uncoated seeds (S), coated seeds without HPE (SC<sub>0</sub>) and coated seeds with HPE 5% (SC<sub>5</sub>). For the germination tests, 200 seeds of each group were distributed on germination box containing coconut substrate moistened daily with distilled water and kept at 25°C. The data were recorded as counts of seeds that presented development of primary roots at four days and at the final of germination after eight days. The effect of coating with or without HPE was calculated as the percentage of germinated seeds (BRASIL, 2009).

#### 2.4. *Statistical analysis*

For the analysis of experimental design data, experiments in the center of the design were performed to make the estimation of pure error possible. All of the experiments were carried out at random to minimize the effect of unexplained variability in the observed responses due to systematic errors. All calculations and graphical designs were performed using Statistic 9.0 software (Statsoft, OK, USA). The means of the characterization test data were compared by Student's t-tests employing Statistic software 9.0 at the 5% of significance level. The antifungal evaluation of films (F<sub>0</sub>, F<sub>1</sub>, F<sub>2.5</sub>, F<sub>5</sub>, and F<sub>7.5</sub>) and the germination percentage of sunflower seeds (S, SC<sub>0</sub>, SC<sub>5</sub>) were performed by applying analysis of variance (ANOVA) and Tukey tests with a significance level of 0.05.

### 3. **Results and discussion**

UFLC analysis was used to determine the chemical profile of HPE. The compounds were identified on the basis of their UV spectrum and the chromatographic behavior compared to external standards. Four compounds were identified: propyl gallate, catechin, epicatechin and formononetin. The formononetin and the epicatechin have not been quantified due to they were co-eluted with other compounds. The sample presented was 11.52 and 20.93 mg.g<sup>-1</sup> of propyl gallate and catechin, respectively.

According to our experimental design, the samples showed 100% solubility in distilled water (as expected). Pectin is a hydrophilic material with high solubility in water

(Souto-Maior, Reis, Pedreiro & Cavalcanti, 2008); films based on this polysaccharide disintegrate quickly and easily in seeds, allowing complete germination (Batista, Tanada-Palmu, Passos, Trani & Grosso, 2005). The addition of propylene glycol to the film formulations did not affect the films' water solubility.

The incorporation of HPE in the formulation was possible using propylene glycol as a co-solvent because the components present in HPE are not soluble in water. The addition of HPE in the formulation did not change the solubility of the film, showing that the water-insoluble substances of HPE interacted with propylene glycol, which was able to solubilize them.

Color may be regarded as an important parameter to characterize films because of its impact on the appearance of the coated product (Fabra, Talens & Chiralt, 2010). The values for color difference ( $\Delta E$ ) were influenced only by increases of the concentration of polymer. The values for  $\Delta E$  ranged between 6.21 and 8.54 units (not shown data).

The color difference may be related to the change in opacity of the films, which mainly modifies the brightness in color attributes (Fabra, Talens & Chiralt, 2010). The high concentration of pectin increased the color of films. According to specifications contained in the product data sheet provided by the manufacturer, pectin used in this work has color attributes related to light tan color cream.

The results in figure 1a show the interaction between pectin and propylene glycol concentrations based on TS responses. The lowest values of TS were presented when these concentrations were increased. The results of the experimental design for TS also varied between 36.98 and 65.82 MPa. Plasticizer and polymer seem to have no influence on the tension in concentrations below 0.25% and 2.4%, respectively. However, when concentrations of both are increased, there is a reduction of tension, indicating the influence of the plasticizer and polymer on this property. This behavior can be explained by structural modifications of the polymer chain. When the plasticizer was incorporated into the film at higher concentrations, the reduction of intermolecular forces of the polymer chain was promoted (Kester & Fennema, 1986). Propylene glycol is a small molecule that can interact with the pectin chain, promoting a greater molecular mobility of the film matrix (Dias, Muller, Larotonda & Laurindo, 2010; Mali, Sakanaka, Yamashita & Grossmann, 2005; Parris, Coffin,

Joubran & Pessen, 1995; Gontard, Guilbert & Cuq, 1993). Furthermore, the hygroscopic characteristics of pectin increase the water content of the polymer matrix, producing films with lower tension (Mali, Sakanaka, Yamashita & Grossmann, 2005); this could explain the decrease in tension with increasing concentrations of pectin because the polymer is highly hygroscopic.

These two events could also explain the results obtained for YM, which indicates the rigidity of the films (Fabra, Chiralt & Talens, 2010). The higher the value of YM is, the higher the stiffness of the films (Mali, Sakanaka, Yamashita & Grossmann, 2005). The values obtained for YM ranged between 303.98 and 992.62 MPa.

The greatest rigidity of the films in this experiment was observed in the lowest concentration of plasticizer and polymer (Fig 1c), which coincide with the concentrations that resulted in films with higher TS values. However, the lowest stiffness corresponded with the highest concentrations of both variables at levels that resulted in films with lower stress values.

Macleod, Fell & Collet (1997) analyzed the mechanical properties and permeability of pectin and ethyl cellulose films and observed a decrease in tensile strength and elongation caused by the increased amount of pectin in the films. The results suggested that there is a specific level of pectin concentration that can be used to obtain a film with satisfactory mechanical strength.

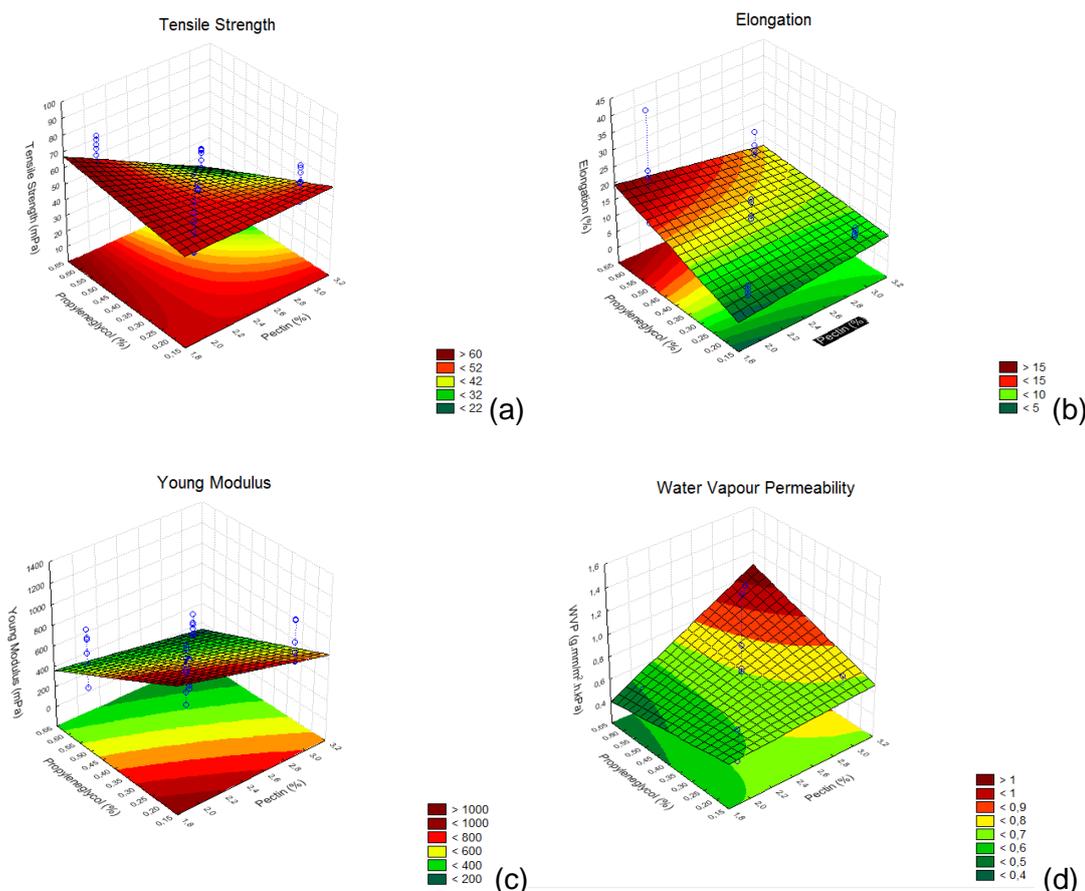
Batista, Tanada-Palmu & Grosso (2005) studied the addition of fatty acids in pectin films based on low-methoxy and observed values of TS between 46.62 and 75.89 MPa, similar to those found in this study. According to Silva, Bierhalz & Kieckbusch (2009), the concentration of glycerol added to films from pectin and alginate crosslinked with calcium caused a reduction in the TS of the films. The values of TS ranged from 39.7 to 61.5 MPa for films with low calcium (0.2 g/g polymer) and from 41.6 to 75.7 MPa for crosslinked films with a high content of calcium.

As can be seen in Fig.1b, the increase of plasticizer concentration had a positive effect on the result of elongation of the film when it was incorporated in films with the same polymeric concentration. However, the increase in polymer concentration caused a decrease in the elongation percentage of the film. The values of elongation varied between 6.5% and

17.5%. According to Galiotta, Gioia, Guilbert and Cuq (1998), the increase of plasticizer causes changes in the three-dimensional organization of the film; this causes changes in the characteristics of the mechanical properties, such as increase of elongation percentage. The increase in polymer concentration seems to contribute to the reduction of elongation, possibly due to the increase of intermolecular forces in the polymer chain. This behavior was more intense than the changes promoted by the plasticizer. Dias, Muller, Larotonda & Laurindo (2010) observed an increase of elongation of films based on rice starch and rice flour with increased concentrations of plasticizer but without variation of polymer concentration. In studies of composite films based on crosslinked alginate and pectin with calcium, Silva, Bierhalz & Kieckbusch (2009) obtained E values ranging from 1.5% to 19.8%. The films obtained with pectin reported by Kang, Jo, Lee, Kwon & Byun (2005) had a value of 2.6%.

The results of the WVP showed an increased permeability of the films when the concentration of plasticizer and polymer were higher than 0.35% and 2.6%, respectively (Fig. 1d). This behavior is consistent with the results obtained for higher values of TS, i.e., a greater permeability was observed in the films that showed greater mobility of their intermolecular polymer chains. Other studies showed similar results, indicating that the increase of WVP can occur when there is an increase of plasticizer (Dias, Muller, Larotonda & Laurindo, 2010; Bertuzzi, Vidaurre, Armada & Gottifredi, 2007; Gontard, Guilbert & Cuq, 1993). Already at low concentrations of polymer and plasticizer (2.5% and 0.4%, respectively), neither seem to interfere with the results of permeability while maintaining low values for this property. The WVP values obtained in this study ranged between 0.4664 and 0.9139 g.mm/m<sup>2</sup>.h.Kpa.

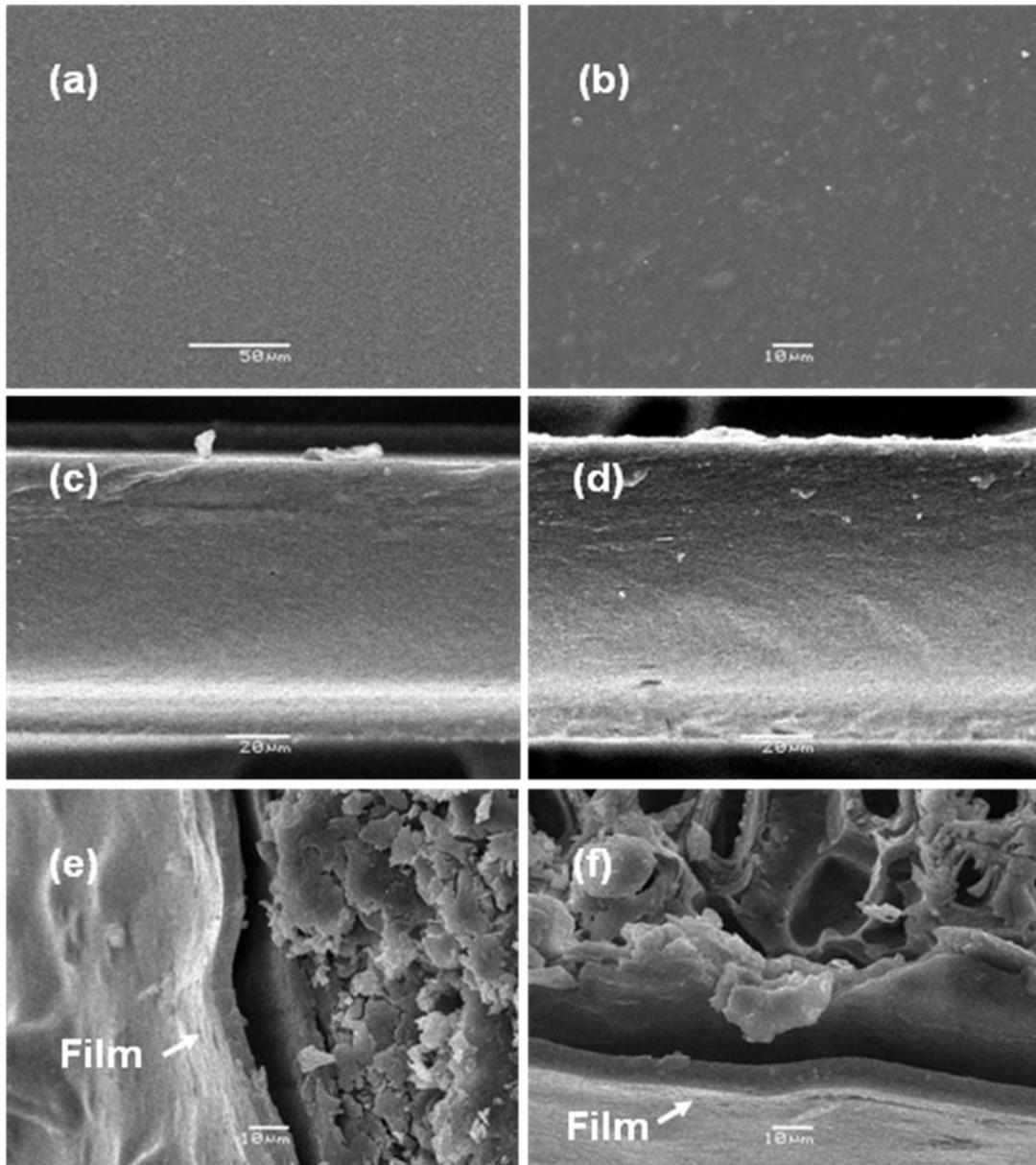
This behavior can be attributed to the increased intermolecular spaces in the polymer chain promoted by the highest concentrations of plasticizer (Fabra, Chiralt & Talens, 2008). Furthermore, the characteristics of the hydrophilic polymer due to the presence of polar groups (-OH) can increase the interaction of the film with water molecules, resulting in an increased permeability of even higher concentrations of polymer (Souto-Maior, Kings, Mason & Cavalcanti, 2008; Cheng, Karim, Norziah & Seow, 2002).



**Fig. 1.** Surface response plot of effect of PEC and PG concentration on: (a) tensile strength, (b) tensile elongation at break and (c) Young's modulus and (d) water vapor permeability of experimental design films equilibrated to 58% RH.

The experimental design samples did not show differences on the micrographs of the surfaces and cross section of the films. A continuous and homogeneous structure was observed for all pectin films in the experiment. The composition of these films was the same, and the changes in the concentrations of polymer/plasticizer did not show differences in film microstructure. Fig. 2 (a, b) presents the photomicrography of the film surface ( $F_0$  and  $F_5$ ). The effect of HPE incorporation on the microstructure could be observed, and the internal morphology did not change when HPE was added to the polymeric matrix. Fracture micrographs (Fig. 2 c, d) showed homogeneity of  $F_0$  and  $F_5$  films. The final structure of the film depends on the interactions between the components of the formulation and their arrangement during the drying step and film formation (Pastor, Sánchez-González, Cháfer, Chiralt & González-Martínez, 2010). The presence of insoluble particles was observed for  $F_5$  films. The surfaces of  $F_5$  films were more irregular than  $F_0$ . The irregularities in the surface of

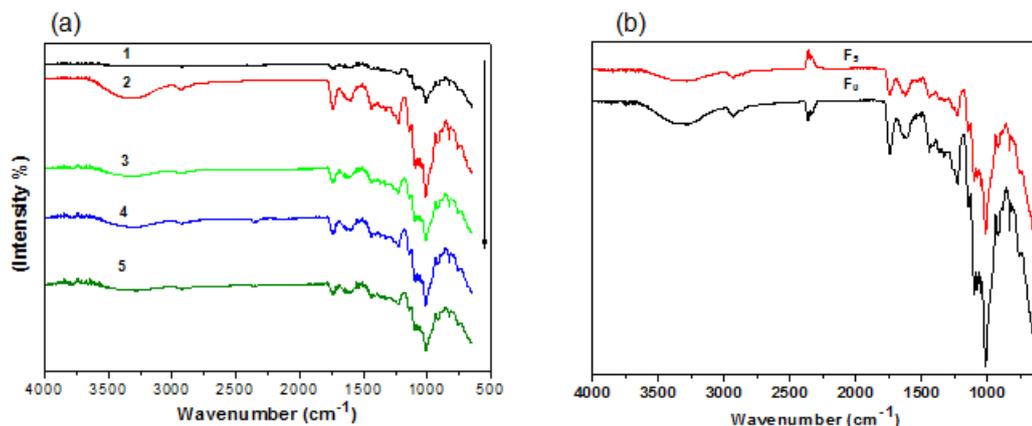
F<sub>5</sub> films may be related to the presence of crystalline HPE particles. According to Pastor, Sánchez-González, Cháfer, Chiralt & González-Martínez (2010), the crystal structure pattern of an alcohol solution of propolis components is similar when the components interact chemically with other substances. In this study, the increase of concentrations of HPE in the HPMC films changed the microstructure of the films.



**Fig. 2.** Micrographs of films and coated seeds: (a) surface of film without HPE (F<sub>0</sub>); (b) surface of film with HPE 5% (F<sub>5</sub>); (c) cross-section of F<sub>0</sub>; (d) cross-section of F<sub>5</sub>; (e) seed coated with pectin film without HPE (SC<sub>0</sub>); (f) seed coated with pectin film containing HPE 5% (SC<sub>5</sub>).

The efficiency of the coating process was confirmed using cross-section micrographs of coated seeds (Fig. 2 e, f). It was observed that the filmogenic dispersion formed a continuous and homogeneous layer for both types of coating ( $SC_0$  and  $SC_5$ ), but the coating thickness recorded for  $SC_5$  was greater than the coating for  $SC_0$  ( $7.38 \pm 0.32 \mu$  and  $5.12 \pm 0.01 \mu$ , respectively). This increased thickness could be explained by the greater amount of material that was incorporated into the film solution when the HPE was added to the film. Some studies have reported that film thickness is related to the composition of the polymer and/or the incorporation of additives in the composition of the film (Imran, El-Fahmy, Revol-Junelles & Desobry, 2010; Mali, Grossmann, Garcia, Martino & Zaritzky, 2004). Imran, El-Fahmy, Revol-Junelles & Desobry (2010) observed a significant increase in the thickness of the film when the cellulose-based additive nisin was incorporated into the film.

The FTIR spectra of films (4000 – 500  $cm^{-1}$  region) showed a similar chemistry for all films of experimental design (Fig. 3a), possibly due to the composition of the samples. The formulations did not vary in components, only in concentrations, justifying the difference of the intensity between the bands. The absorption bands of pectin are characteristic and can be observed with higher intensity from 1760 – 1730  $cm^{-1}$  (carboxyl group esterified) and 1630 – 1600  $cm^{-1}$  (carboxyl group free) (Singthong, Ningsanonds, Cui & Goff, 2005; Manrique & Lajolo, 2002; Chatjicakis, Pappas, Kalantzi, Rodis & Polissiou, 1998) and these appeared discretely on the film spectra. The alcohol hydroxyl group (O – H) bands appeared more intensely (from 1200 to 1000  $cm^{-1}$ ) and were related to the pectin and propylene glycol hydroxyl groups.



**Fig.3.** Spectra of experimental design films 1-5 (a), film without HPE ( $F_0$ ) and film with 5% HPE ( $F_5$ ).

The inclusion of HPE in the formulation did not change the FTIR spectrum profile (Fig. 3b). The spectra of the  $F_0$  and  $F_5$  films showed similarities, suggesting a low interference of the substances contained in propolis, as can also be confirmed by the results of mechanical properties WVP and solubility. As described above, the prior solubilization of the extract of propolis in PG may have contributed to its improved interaction with the polymer chain. Furthermore, the low concentration of HPE (5% w/w) incorporated into the film could also explain its similarity to the same movie without HPE.

The mechanical data (Table 2) show the stiffness of the material (YM), the film resistance to elongation till fracture (TS) and the film capacity for stretching (E). The Young modulus and elongation data did not show any significant difference between the samples ( $p=0.3169$  and  $p=0.1766$ , respectively). According to Kechichian, Ditchfield, Santos-Veiga & Tadini (2010), the concentration of antimicrobial ingredients may promote greater effectiveness of the biodegradable films against microorganisms, without reducing the percentage of elongation of the same. Nevertheless, the tensile strength (TS) of  $F_5$  films was higher than that of  $F_0$  ( $p=0.0001$ ). The mechanical profile of films is affected by the spatial distribution of the substances, their physical state and the interactions established between this substances. The incorporation of new components can promote alterations in the parameters of films (Pastor, Sánchez-González, Cháfer, Chiralt & González-Martínez, 2010). The introduction of HPE produced a stronger effect in the matrix, as an increase in the TS was observed in the  $F_5$  film. HPE is present in the composition of resins, balsams with polar compounds such as flavonoids, phenolic acid and esters (Burdock, 1998). The increase of TS could be due to the interactions of these polar compounds with the backbone of the pectin molecule. These interactions can result in stronger interfacial adhesion between these and the HPE substances, and this leads to an increase in TS. Nevertheless, these interactions did not change the stiffness or the elongation of the film.

The permeability to water vapor (Table 2) showed no significant difference between the results reported for films  $F_0$  and  $F_5$  ( $p = 0.5394$ ). The use of PG as a plasticizer and cosolvent for the HPE causes a molecular interaction between the components of propolis extract and the dispersion in making films, thus minimizing the interference of these compounds on the property of WVP and the solubility of the film.

Regarding the color of the films after incorporation of HPE, there was an increase in color difference when comparing the films  $F_0$  and  $F_5$  (Table 3). HPE has a deep red color (Cabral, Oldoni, Prado, Alencar & Bezerra, 2009), and when incorporated into the film, even at low concentration, it produced a film with an increase in chromaticity parameters ( $a^*$  and  $b^*$ ). The parameter  $a^*$  range from green (-) to red (+) and  $b^*$  from blue (-) to yellow (+) (Sobral, Garcia, Monterrey-Quintero & Inhabitant, 2004).

Table 2. Analysis results of tensile strength (TS), elongation at break (E), Young's modulus (YM), water vapor permeability (WVP), water solubility ( $S_w$ ) and color difference ( $\Delta E$ ) of pectin film ( $F_0$ ) and pectin film with 5% HPE ( $F_5$ )

Analysis	$F_0$	$F_5$	p value (*)
TS (mPa)	27.16 $\pm$ 5.20	40.11 $\pm$ 3.12	0.0001
E (%)	11.00 $\pm$ 0.36	13.25 $\pm$ 0.26	0.1766
YM (mPa)	267.62 $\pm$ 102.23	314.07 $\pm$ 73.28	0.3169
WVP (g.mm/m <sup>2</sup> .h.Kpa)	0.81 $\pm$ 0.01	0.86 $\pm$ 0.12	0.5394
$S_w$ (%)	100	100	-
$\Delta E$	9.77 $\pm$ 3.36	29.66 $\pm$ 2.86	0.0007

(\*) Student's t-test (p<0.05)

The DTA curves exhibited similar profiles of thermal degradation (Fig. 4a). A thermogravimetric analysis curve (TGA) is shown in Fig. 4b. The thermal gravimetric curves of all films presented discrete weight loss until 100°C (dehydration step), with  $F_0$  showing the highest humidity index (2.75%). It was observed that the humidity decreased with increasing HPE concentrations.  $F_1$  and  $F_5$  presented 2.10 and 1.94% humidity, respectively. According Ghaffari, Navaee, Oskoui, Bayati & Rafiee-Tehrani (2007), the pure pectin showed the first thermal event with weight loss up to 10% in the range of 50–100°C, which was related to the evaporation of water in the sample. This result suggests that films with HPE present a smaller amount of carboxyl groups available to interact with water molecules as these groups

can interact with compounds present in HPE (Souto-Maior, Reis, Pedreiro & Cavalcanti, 2008).

The films presented another step between 156 and 198°C (4.8 and 5.9% of weight loss, respectively). Around 240°C, the weight loss of samples was approximately 28%. The second thermal event was related to the depolymerization of pectin chains (Ghaffari, Navaee, Oskoui, Bayati & Rafiee-Tehrani, 2007).

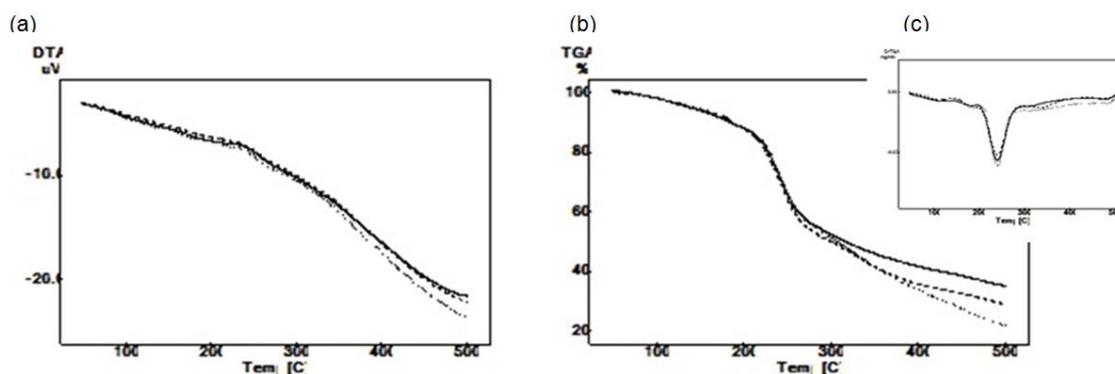


Fig. 4. Curves of DTA (a), TG (b) and DrTGA (c) F<sub>0</sub> (—), F<sub>1</sub> (- - -), F<sub>5</sub> (.....) films obtained in heating rate of 10°C.min<sup>-1</sup> under a dynamic nitrogen atmosphere (50 mL.min<sup>-1</sup>).

The inhibitory effect of HPE films on the mycelium growth of *Alternaria alternata* is presented in Table 3. At 5% and 7.5% of HPE in the film, the mycelial growth present significant difference when compared to control F<sub>0</sub> ( $p = 0.000856$ ). The both concentrations (5% and 7.5% of HPE) showed similar performance concerning to inhibition of mycelial growth ( $p = 0.339015$ ).

The control of fungi in seeds has been performed, especially with the use of synthetic fungicides such as thiram, iprodione, captan and benomyl (Reis, Satelis, Pereira & Nascimento, 2006). However, the growing concern for environmental and health risks associated with the use of such substances has directed researchers to use new products from natural sources for the management of plant diseases; this includes the protection of seeds, which are important sources of the spread of pathogens (Basim, Basim & Ozcan, 2006).

Several studies have demonstrated the antifungal effect of propolis from different sources (Pastor, Sanchez-Gonzalez, Chafer, & González-Martínez Chiralt, 2010; Kalogeropoulos, Konteles, Troullidou, Mourtzinis & Karathanos, 2009; Longhini, Raksa, Oliveira, Svidzinski & Franco, 2007). The antimicrobial properties of propolis have been mainly attributed to flavonoids pinocembrin, galangin and pinobanksin (Basim, Basim & Ozcan, 2006). Flavonoids are substances synthesized by plants in response to environmental stress and microbial infection (Kalogeropoulos, Konteles, Troullidou, Mourtzinis & Karathanos, 2009)

Table 3. Inhibitory effect of HPE on mycelial growth of *Alternaria alternata*

Treatments	Mycelial growth (mm)	p value (related to control)
F <sub>0</sub> (control)	83.58 ± 2.94	-
F <sub>1</sub>	81.42 ± 5.12	0.9989
F <sub>2.5</sub>	71.50 ± 1.73	0.3098
F <sub>5</sub>	56.75 ± 9.63	0.0009
F <sub>7.5</sub>	47.58 ± 14.38	0.0001

These results suggest that the films preserved antifungal properties of the compounds present in HPE and that they can be used for seed coating. The formulation F<sub>5</sub> was the film selected to cover the sunflower seeds due to its effectiveness in inhibiting the mycelial growth of *A. alternata* significant differences with the higher concentrations used in this study were not seen.

Pastor, Sanchez-Gonzalez, Chafer, & González-Martínez Chiralt (2010) reported the antifungal activity against *Aspergillus niger* and *Penicillium* sp when propolis was incorporated in hydroxypropylmethylcellulose films.

Laboratory germination tests (Table 4) showed no differences in the results for coated seeds (SC<sub>0</sub> and SC<sub>5</sub>), suggesting no influence of the incorporation of the film HPE

( $p= 0.0639$ ). The results, compared to control (uncoated seeds (S)), showed that the coating process did not significantly affect the germination percentage.

This same behavior was observed in germination tests performed in the greenhouse (Table 4). The germination rates observed in laboratory testing, for S, SC<sub>0</sub> and SC<sub>5</sub> were 78%, 81.5% and 72.5%, respectively, after 4 days from the beginning of the test. For the tests in the greenhouse (Table 4), the values for S, SC<sub>0</sub> and SC<sub>5</sub> were 75%, 78.5% and 71% at 4 days and 93.5%, 86.5% and 83.5% at 8 days, respectively.

Some studies have reported that coating generally does not influence the process of seed germination (Ziani, Ursu & Maté, 2010; Oliveira, Soldi, Rabbit, Miqueloto & Coimbra, 2009; Batista, Tanada-Palmu, Trani & Grosso, 2005). Under the condition of water stress (water shortage), coating can contribute to enhanced absorption of water, which is favorable for seed germination (Oliveira, Soldi, Rabbit, Miqueloto & Coimbra, 2009).

According to the marketing standards for sunflowers, the minimum germination percentage in Brazil should be 70% (APPS, 2005). Machado (2000) defined the efficiency of chemical treatment as being related to the type of seed, the physical and physiological condition of the batch type, the variability of the pathogen, the level of infection / contamination and the active ingredient and dosage of the product.

Table 4. Percent germination of sunflower seeds in the laboratory and greenhouse analyses

Treatment	Germination (%)		
	Laboratory	Greenhouse	
	4 <sup>o</sup> day	4 <sup>o</sup> day	8 <sup>o</sup> Day
S	78.0	75.0	93.5
SC <sub>0</sub>	81.5	78.5	86.5
SC <sub>5</sub>	72.5	71.0	83.5

#### 4. Conclusions

The results of the experimental design pointed to 2% pectin (w/V) and 0.6% propylene glycol (w/V) as being superior for coating experiments due to its showing better a mechanical performance and permeability index. The 5% of HPE concentrations in the film formulation were able to inhibit *Alternaria alternata*. The incorporation of 5% HPE in the films interfered only with mechanical properties, but positively, and the coating application was viable. The coating process did not interfere with the germination of the seeds, suggesting that sunflower seeds can be coated with pectin/HPE, improving the protection against phytopathogens such as *A. alternata*.

#### 5. Acknowledgments

The authors thank the Brazilian Northeast Bank (BNB) for the award of scholarship and financial support, CPKelco by supplying of pectin, Embrapa Tabuleiros Costeiros by the providing of sunflower seed and strains.

#### 6. References

- Alencar, S.M.; Oldoni, T.L.C.; Castro, M.L.; Cabral, I.S.R.; Costa-Neto, C.M.; Cury, J.A.; Rosalen, P.L.; Ikegakid, M. (2007). Chemical composition and biological activity of a new type of Brazilian propolis: red propolis. *Journal of Ethnopharmacology*. 113, 278-283.
- APPS. Associação Paulista dos Produtores de Sementes e Mudas (2005). Legislação. Produção e comércio. I. N. nº 25-16/12/2005- Estabelecidos os padrões nacionais de sementes. *Instrução Normativa*, 25. Anexos VI-Girassol.
- Arromdee, P.; Kuprianov, V. I., Kaewklum, R. & Sirisomboon, K. (2010). Experimental study on combustion of sunflower shells in a pilot swirling fluidized-bed combustor. *Energy Fuels*, 24, 3850–3859.
- ASTM. (1995). Standard test method for tensile properties of thin plastic sheeting. D 882. In: *Annual Book of ASTM Standards*. American Society for Testing and materials.

- Batista, J. A.; Tanada-Palmu, P. S. & Grosso, C. R. F. (2005). Efeito da adição de ácidos graxos em filmes à base de pectina. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 25, 781-788.
- Batista, J.A.; Tanada\_Palmu, P.S.; Passos, F.A.; Trani, P.E.; Grosso, C.R.F. (2005). Vigor de sementes de brócolos submetidas a coberturas biodegradáveis e micronutrientes. *Horticultura Brasileira*, 23, 841-845.
- Batista, J.A.; Tanada\_Palmu, P.S.; Passos, F.A.; Trani, P.E.; Grosso, C.R.F. (2005). Vigor de sementes de brócolos submetidas a coberturas biodegradáveis e micronutrientes. *Horticultura Brasileira*, 23, 841-845.
- Bertuzzi, M.A.; Castro Vidaurre E.F.; Armada, M. & Gottifredi, J.C. (2007). Water vapor permeability of edible starch based films. *Journal of Food Engineering*, 80, 972–978.
- Bifani, V., Ramirez, C., Ihl, M., Rubilar M., Garcia, A. & Zaritzky, N. (2007). Effects of murta (*Ugni molinae* Turcz) extract on gas and water vapor permeability of carboxymethylcellulose-based edible films. *LWT - Food Science and Technology*, 40, 1473–1481.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. (2009). Regras para análise de sementes Secretaria de Defesa Agropecuária. – Brasília : Mapa/ACS, 2009.
- Burdock, G. A. (1998). Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (propolis). *Food Chemistry and Toxicology*, 36, 347–363.
- Cabral, I. S. R.; Oldoni T. L. C.; Prado A.; Bezerra, R. M. N. & Alencar, S. M. (2009). Composição fenólica, atividade antibacteriana e antioxidante da própolis vermelha brasileira. *Química Nova*, 32, 1523-1527.
- Chatjicakis, A. K.; Pappas, C.; Kalantzi, N.; Rodis, P. & Polissiou M. (1998). FT-IR spectroscopic determination of the degree of esterification of cell wall pectins from stored peaches and correlation to textural changes. *Carbohydrate Polymers*, 37, 395-408.
- Cheng, L. H., Karim, A., Norziah, M. H., & Seow, C. C. (2002). Modification of the

microstructural and physical properties of konjac glucomannan-based films by alkali and sodium carboxymethylcellulose. *Food Research International*, 35, 829–836.

Dias, A. B., Muller, C. M.O., Larotonda, F.D.S. & Laurindo, J. B. (2010). Biodegradable films based on rice starch and rice flour. *Journal of Cereal Science*, 51, 213–219.

Fabra, M.J.; Talens P. & Chiralt A.(2008). Effect of alginate and k-carrageenan on tensile properties and water vapour permeability of sodium caseinate–lipid based films. *Carbohydrate Polymers*, 74, 419-426.

Fabra, M.J.; Talens P. & Chiralt, A. (2010). Influence of calcium on tensile, optical and water vapour permeability properties of sodium caseinate edible films. *Journal of Food Engineering*, 96, 356-364.

Galietta, G.; Di Gioia, L.; Guilbert, S. & Cuq, B.(1998). Mechanical and thermomechanical properties of films based on whey proteins as affected by plasticizer and crosslinking agents. *Journal of Dairy Science*, 8, 3123-3130.

Ghaffari, A., Navaee, K., Oskoui, M., Bayati, K. & Rafiee-Tehrani, M. (2007) Preparation and characterization of free mixed-film of pectin/chitosan/Eudragit\_ RS intended for sigmoidal drug delivery. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 67, 175–186.

Gontard, N.; Duchez, C.; Cuq, J. L. & Guilbert, S. (1994) Edible composite films of wheat gluten and lipids: water vapor permeability and other physical properties. *International Journal of Food Science Technology*, 29, 39-50.

Gontard, N.; Guilbert, S. & Cuq, J. L. (1993). Water and Glycerol as Plasticizers Affect Mechanical and Water Vapor Barrier Properties of an Edible Wheat Gluten Film. *Journal of Food Science*, 58, 206-211.

Guilbert, S., Gontard, N. & Gorris, L.G.M. (1996) Prolongation of the shelf-life of perishable food products using biodegradable films and coatings. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie*, 29, 10-17.

Imran M.; El-Fahmy, S.; Revol-Junelles A.; Desobry, S. (2010). Cellulose derivative based active coatings: Effects of nisin and plasticizer on physico-chemical and

- antimicrobial properties of hydroxypropyl methylcellulose films. *Carbohydrate Polymers*, 81, 219–225.
- Kalogeropoulos, N., Konteles, S. J., Troullidou, E., Mourtzinou, I., Vaios T. & Karathanos, V.T. (2009). Chemical composition, antioxidant activity and antimicrobial properties of propolis extracts from Greece and Cyprus. *Food Chemistry*, 116, 452–461.
- Kang, H. J., Jo, C., Lee, N. Y., Kwon, J. H., & Byun, M. W. (2005). A combination of gamma irradiation and CaCl<sub>2</sub> immersion for a pectin-based biodegradable film. *Carbohydrate Polymers*, 60, 547–551.
- Kechichian V., Ditchfield C., Veiga-Santos P. & Tadini, C.C. (2010) Natural antimicrobial ingredients incorporated in biodegradable films based on cassava starch). *LWT - Food Science and Technology*, 43, 1088-1094.
- Kester, J. J. & Fennema, O. R. (1986). Edible films and coatings: a review. *Food Technology*, 40, 47-59.
- Longhini, R.; Raksa, S.M.; Oliveira, A.C.P.; Sydzinsk, T.I.E. & FRANCO, S.L. (2007). Obtenção de extratos de própolis sob diferentes condições e avaliação de sua atividade antifúngica. *Revista Brasileira Farmacognosia*, 17, 388-395.
- Lui, L., Fishman, M.L. & Hicks, K.B. (2007). Pectin in controlled drug delivery a review. *Cellulose*, 14, 15 – 24.
- Machado, J. C. (2000) Tratamento de sementes no controle de doenças. Lavras: *LAPS/UFLA/FAEPE*, 138 p.
- Macleod, G. S., Fell, J. T., Collett, J. H. (1997). Studies on the physical properties of mixed pectin/ethylcellulose films intended for colonic drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, 157, 53-60.
- Mali, S., Grossmann, M. V. E., Garcia, M. A., Martino, M. N., & Zaritzky, N. E. (2004). Barrier, mechanical and optical properties of plasticized yam starch films. *Carbohydrate Polymers*, 56, 129–135.
- Mali, S.; Sakanaka, L.S.; Yamashita, F. & Grossmann, M.V.E. (2005). Water sorption and mechanical properties of cassava starch films and their relation to plasticizing

effect. *Carbohydrate Polymers*, 60, 283-289.

Manrique, G. D. & Lajolo, F. M. (2002). FT-IR spectroscopy as a tool for measuring degree of methyl esterification in pectins isolated from ripening papaya fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 25, 99-107.

Olivas, G. I., & Barbosa-Cánovas, G.V. (2007). Alginate–calcium films: Water vapor permeability and mechanical properties as affected by plasticizer and relative humidity. *LWT - Food Science and Technology*, 41, 359–366.

Oliveira, A.F., Soldi, V., Coelho, C.M.M., Miqueloto, A. & Coimbra, J. L.M. (2009). Preparação, caracterização e propriedades de filmes poliméricos com potencial aplicação no recobrimento de sementes. *Química Nova*, 32, 1845-1849.

Parris, N.; Coffin, D.R.; Joubran, R.F. & Pessen, H. (1995). Composition factors affecting the water vapor permeability and tensile properties of hydrophilic films. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43, 1432–1435

Pastor C.; Sánchez-González L.; Cháfer M.; Chiralt M.; González-Martínez S. Physical and antifungal properties of hydroxypropylmethylcellulose based films containing propolis as affected by moisture content. *Carbohydrate Polymers*, 2010, 82, 1174–1183.

Pozzi, C.R.; Braghini, R.; Arcaro, J. R. P.; Zorzete, P.; Israel. A. L. M.; Pozar, I. O.; Denucci, S. & Corrêa, B. (2005). Mycoflora and occurrence of alternariol and alternariol monomethyl ether in Brazilian sunflower from sowing to harvest. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 5824-5828.

Reis A.; Satelis J.F.; Pereira, R.S.; Nascimento, W.M. (2006). Associação de *Alternaria dauci* e *A. alternata* com sementes de coentro e eficiência do tratamento químico. *Horticultura Brasileira*, 24, 107-111.

Silva, M.A.; Bierhalz, A.C.K. & Kieckbusch T. G. (2009). Alginate and pectin composite films crosslinked with Ca<sup>2+</sup> ions: Effect of the plasticizer concentration. *Carbohydrate Polymers*, 77, 736–742.

Singthong J.; Ningsanonds, S.; Cui, S.W. & Goff, H.D. (2005). Extraction and physicochemical characterization of Krueo Ma Noy pectin. *Food Hydrocolloids*, 19,

793-801.

- Sobral, P.J.A.; Garcia, F.T.; Habitante, A.M.Q.B.; & Monterrey-Quintero, E.S. (2004). Propriedades de filmes comestíveis produzidos com diferentes concentrações de plastificantes e de proteínas do músculo de Tilápia-do-Nilo. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 39, 255-262.
- Souto-Maior, J. F. A.; Reis, A. V.; Pedreiro, L. N. & Cavalcanti, O. A. (2008). Avaliação da pectina fosfatada aplicada na formação de filmes isolados. Material candidato a novos sistemas para liberação modificada de fármacos. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 44, 203-213.
- Sprockel, O.L.; Sen M.; Shivanand, P. & Prapaitrakul, W. (1997). A melt extrusion process for manufacturing matrix drug delivery system. *International Journal Pharmaceutics*, 155, 191-199.
- Sungthongjeen S., Sriamornsak P., Pitaksuteepong T., Somsiri A. & Puttipipatkachorn S. (2004). Effect of degree of esterification of pectin and calcium amount on drug release from pectin-based matrix tablets. *AAPS PharmSciTech*, 5, 1 – 9.
- Tripathi S.; Mehrotra, G.K. & Dutta, P.K. (2010). Preparation and physicochemical evaluation of chitosan/poly(vinyl alcohol)/pectin ternary film for food-packaging applications. *Carbohydrate Polymers*, 79, 711–716.
- Ziani, K.; Ursúa B.; Maté, J. Application of bioactive coatings based on chitosan for artichoke seed protection. *Crop Protection*, 2010, 29, 853-859.

## ANEXO

### A – Submissão do artigo

Em **seg, 2/5/11, Carbohydrate Polymers** <[esubmissionsupport@elsevier.com](mailto:esubmissionsupport@elsevier.com)> escreveu:

De: Carbohydrate Polymers <[esubmissionsupport@elsevier.com](mailto:esubmissionsupport@elsevier.com)>

Assunto: Submission Confirmation

Para: [juaracaju@yahoo.com.br](mailto:juaracaju@yahoo.com.br), [juaracaju@hotmail.com](mailto:juaracaju@hotmail.com)

Data: Segunda-feira, 2 de Maio de 2011, 18:00

Dear Juliana,

Your submission entitled "The use of pectin-based films containing red propolis extract for sunflower seed protection" has been received by Carbohydrate Polymers

Your manuscript will be considered by the editor you have selected, and will be assigned a reference number in due course. We will contact you again with this information.

You may check on the progress of your paper by logging on to the Elsevier Editorial System as an author. The URL is <http://ees.elsevier.com/carbpol/>.

Your username is: [juaracaju@yahoo.com.br](mailto:juaracaju@yahoo.com.br)

If you need to retrieve password details, please go to:

[http://ees.elsevier.com/carbpol/automail\\_query.asp](http://ees.elsevier.com/carbpol/automail_query.asp)

Thank you for submitting your work to this journal.

For further assistance, please visit our customer support site at <http://support.elsevier.com>. Here you can search for solutions on a range of topics, find answers to frequently asked questions and learn more about EES via interactive tutorials. You will also find our 24/7 support contact details should you need any further assistance from one of our customer support representatives.

Kind regards,

Elsevier Editorial System  
Carbohydrate Polymers