

Uso de biofilme de amido à base de própolis vermelha para a conservação de folhas de alface (*Lactuca sativa*)

Use of starch biofilm to the base of red propolis for the conservation of lettuce leaves (*Lactuca sativa*)

Y. L. F. M. Araujo¹; C. O. Souza²; J. I. Druzian²; F. F. Padilha³; S. C. Orellana⁴

¹Departamento de Tecnologia de Alimentos, Laboratório de cromatografia e Flavor, Universidade Federal de Sergipe, 49100-000, São-Cristóvão-Se, Brasil

²Departamento de Análises Bromatológicas, Universidade Federal da Bahia, 40171-970, Salvador-Ba, Brasil

³Laboratório de Biomateriais, Instituto de Tecnologia e Pesquisa, 49032-490, Aracaju-Se, Brasil

⁴Centro de Pesquisas René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz, 30190-110, Belo-Horizonte-MG, Brasil

ylmaia@yahoo.com.br

(Recebido em 19 de novembro de 2012; aceito em 10 de dezembro de 2012)

A própolis é uma mistura de substâncias resinosas e balsâmicas que abelhas da espécie *Apis mellifera* L. coletam de várias plantas e levam até a colmeia. Esta resina tem sido amplamente utilizada para aplicações médicas, o que resulta no aumento do interesse por sua composição química, bem como por sua origem botânica e pode ser encontrado em muitas regiões do mundo, apresentando grande variação de composição química e biológica. A contaminação microbiológica em alimentos é uma das preocupações mais relevantes para a saúde pública, considerando os elevados índices de doenças provocadas por microrganismos patogênicos. As hortaliças são parte integrante da dieta da população mundial, sendo a alface uma hortaliça cosmopolita de grande preferência pelos consumidores. Uma alternativa viável de redução microbiana em frutas e hortaliças é a proteção durante o transporte e armazenamento com biofilmes biodegradáveis. Nesse trabalho foi investigado o potencial antimicrobiano de biofilme de amido incorporado com própolis vermelha, utilizado como embalagem protetora de folhas de alface. Foi realizado o teste de sensibilidade antimicrobiana de 10 extratos de própolis frente à *Bacillus cereus*. A contagem de *B.cereus* nas folhas de alface ocorreu após os tempos 0, 48 e 120 horas de armazenamento. O rendimento dos extratos hidroalcoólicos de própolis variou de 9,45% a 74,62%. Os resultados indicaram ação antibacteriana do biofilme incorporado com própolis vermelha frente à *Bacillus cereus* e que a incorporação desse extrato na concentração de 5% foi eficaz contra esta bactéria muito encontrada em água de irrigação de hortaliças.

Palavras-chave: Antibacteriano; alimento; bioproduto

Propolis is a mixture of resinous and balsamic substances and balsamic that bees of the species *Apis mellifera* L. collect from various plants and lead to the hive. This resin has been widely used for medical applications, resulting in an increased interest for its chemical composition, as well as its botanical origin. It can be found in many regions of the world, with wide variation in chemical and biological composition. Microbiological contamination in food is one of the most important concerns for public health, given the high rates of diseases caused by pathogenic microorganisms. Vegetables are an integral part of the diet of the world population, and lettuce is a cosmopolitan vegetable which shows strong preference by its consumers. A good alternative for the reduction of microbial count in fruits and vegetables is their protection during transport and storage in biodegradable films. In this study we investigated the antimicrobial potential of starch biofilm incorporated with propolis, used as protective packaging for lettuce leaves. Was performed to test the antimicrobial sensitivity of 10 propolis extracts samples against *Bacillus cereus*. The count of *B. cereus* in lettuce leaves was carried out after 0, 2 and 5 days of storage. The yield of hydroalcoholic extracts of propolis ranged from 9.45% to 74.62%. The results showed antibacterial action of the biofilm incorporated with the propolis against *Bacillus cereus* and that the incorporation of extract at a concentration of 5% was very effective against this bacteria found in the irrigation water for vegetables.

Keywords: Antibacterial; food; bioproduct

1. INTRODUÇÃO

A própolis é uma complexa mistura de substâncias resinosas que abelhas da espécie *Apis mellifera* coletam de várias plantas e levam até a colmeia com o objetivo de proteger as crias e o alimento armazenado [1]. A própolis tem sido amplamente utilizada para aplicações médicas, o que resulta em um aumento do interesse do meio científico, especialmente por apresentar grande variação em sua composição química e biológica [2,3].

Diversas propriedades biológicas têm sido atribuídas à própolis incluindo antimicrobiana e antiinflamatória [4-5], antitumoral [6] como também antioxidante [7]. Os compostos isolados da própolis são principalmente flavonóides e ácidos fenólicos, que são os componentes responsáveis pela atividade biológica contra vários microrganismos patogênicos [8]. A própolis vermelha foi recentemente encontrada ao longo do litoral nordestino e apresenta valiosa atividade antioxidante e antimicrobiana [9].

A contaminação microbiológica em alimentos é uma das preocupações mais relevantes para a saúde pública, considerando os elevados índices de doenças provocadas por microrganismos patogênicos [10]. Segundo Moretti [11] as hortaliças são parte integrante na dieta da população mundial, sendo este, um grupo vulnerável a contaminações durante a etapa de irrigação. A alface (*Lactuca sativa*) é originária da Europa e da Ásia, pertence à família Asteracea e é uma hortaliça consumida no país há mais de cinco décadas [12]. Uma alternativa viável de redução microbiana em frutas e hortaliças é a proteção durante o transporte e armazenamento com biofilmes biodegradáveis [13]. Um agente causador de intoxicação alimentar, podendo ser comumente encontrado nos vegetais é a bactéria *Bacillus cereus* [31].

De acordo com Emiroglu et al [14], existe atualmente grande demanda dos consumidores na área de alimentos por embalagens mais naturais e potencialmente biodegradáveis, além disso tem-se percebido o aumento no cuidado de prevenção do consumidor com a degradação microbiológica desses alimentos. Os polímeros plásticos biodegradáveis a base de amido têm sido considerados de alto potencial para este fim, uma vez que, apresentam baixo custo, alta disponibilidade, renovabilidade e biodegradabilidade [15].

Alguns estudos têm apresentado o potencial uso destes revestimentos incorporados com agentes ativos, contribuindo na manutenção e prolongamento da vida útil de alimentos [16]. Segundo Bodini [17] filmes de gelatina agregados com extratos etanólicos de própolis apresentaram atividade antimicrobiana frente à *Staphylococcus aureus* e mantiveram sua atividade por 177 dias de armazenamento.

Nesse estudo investigamos o potencial antimicrobiano de biofilme de amido incorporado com própolis vermelha utilizado como embalagem protetora de folhas de alface.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Aquisição do material

Foram coletadas dez amostras de própolis vermelha em um apiário localizado no município de Brejo Grande, Estado de Sergipe, situado na região da Foz do rio São Francisco (S 10°28'25" e W 36°26'12"). As amostras foram examinadas em estereomicroscópio para a remoção de impurezas e posteriormente trituradas com grau e pistilo e em seguida acondicionadas sob temperatura de -20°C até a realização dos experimentos.

Obtenção do extrato seco de própolis vermelha

A extração foi realizada segundo a metodologia proposta por Park et al. [18] com algumas modificações. Foi preparada uma solução hidroalcoólica de cada amostra contendo 1,0 g de própolis para 15 mL de etanol 70% em banho ultrassônico por 60 minutos. Os extratos hidroalcoólicos de própolis (EHP) foram colocados em capela de exaustão para a evaporação do solvente e em seguida mantidos em dissecador para a remoção da parte aquosa até obter peso constante.

O rendimento do processo de extração foi estimado pela seguinte equação:

$$\text{Rendimento} = \frac{\text{MSE}}{\text{MP}} \times 100$$

Onde : MSE = massa seca do extrato de própolis (g);
MP = massa inicial de própolis antes da extração (g).

Preparo e semeio do inóculo

A cepa de *Bacillus cereus* isolada de alimento foi identificada e cedida pelo Laboratório de Microbiologia de Alimentos da Universidade Federal da Bahia – UFBA.

O inóculo foi preparado de acordo com as exigências do NCCLS [19], onde o microrganismo foi submetido para crescimento em meio Agar soja tripticaseína digerido, meio seletivo para *B. cereus* (preparado com gema de ovo e polimixina B) e incubado por 24 horas à temperatura de 35 °C. Após este procedimento uma alíquota de massa celular foi transferida para tubos de ensaio contendo solução salina a 0,9%. A suspensão celular foi ajustada para a concentração de 10⁸ células/mL de acordo com a escala 0,5 de MacFarland.

Determinação da atividade antibacteriana

A atividade antibacteriana do extrato de própolis vermelha foi realizada em triplicata pela técnica de difusão em poços segundo metodologia de Maia-Araujo et al. [20]. Inicialmente a suspensão de *Bacillus cereus* (10⁸ células/mL) foi semeada em superfície do ágar Mueller Hinton. Os poços foram marcados com pipeta de vidro Pasteur estéril e em seguida foram succionados com o auxílio de um aparelho a vácuo, usando na extremidade uma ponteira estéril, todo o procedimento foi realizado em capela de fluxo laminar.

O extrato seco de cada amostra de própolis foi ressuspendido em etanol a 70% obtendo-se uma solução na concentração de 50 mg/mL. Alíquotas de 15 µL desta solução foram adicionadas nos poços e em seguida as placas foram incubadas à temperatura de 35°C durante 24 h. foi utilizado o cloranfenicol como controle positivo e etanol 70% como controle negativo. A atividade antimicrobiana do extrato foi determinada por meio da mensuração dos halos de inibição formados em torno dos poços utilizando paquímetro digital.

Elaboração de biofilme

O biofilme foi preparado com 0,7% de sacarose, 1,7% de açúcar invertido, 4% de amido, 1% do extrato hidroalcoólico de própolis vermelha que apresentou melhor resultado no teste antimicrobiano, e 100 mL de água destilada, segundo metodologia de Santos [21] com algumas modificações. Esta solução foi aquecida em forno microondas até atingir a temperatura de 70°C. Em seguida a solução foi deixada em temperatura ambiente até esfriar. Foram usados 20 gramas da solução em cada placa de petri 100x20 mm e foram mantidos em estufa à temperatura de 35°C durante 24 horas.

Após a secagem, cada biofilme de própolis vermelha foi cortado em um tamanho de 5X5 cm e deixado em capela de fluxo laminar submetido à radiação ultravioleta durante 40 min (20 min de irradiação em cada lado).

Potencial antimicrobiano do biofilme de EHP

As folhas de alface foram adquiridas em um supermercado de Aracaju provenientes de um lote entregue ao supermercado no mesmo dia da compra. No laboratório foram removidas as folhas danificadas das alfaces e as folhas restantes foram cortadas em pedaços de 3X3 cm (totalizando 1g de amostras), lavadas em água corrente e secas em papel de filtro estéril. Em seguida, as folhas de alface foram submetidas à radiação ultravioleta durante 40 min (20 min de irradiação em cada lado da folha). Após este procedimento, as amostras de alface foram imersas em solução salina 0,9% contendo o microrganismo *Bacillus cereus*, na concentração de 10⁸ UFC/mL conforme metodologia de Santos [21] com modificações. As amostras foram agitadas a 120 g em *shaker* durante 1 min e em seguida, foram deixadas em repouso na capela de fluxo laminar para secar e permitir a adesão das bactérias [22].

As amostras de alface (1 grama) foram então recobertas pela embalagem de biofilme de própolis vermelha como apresentado na Figura 1. As embalagens foram lacradas na extremidade em seladora e armazenadas sob refrigeração em geladeira durante 5 dias. Para avaliar o efeito antimicrobiano da embalagem frente à *Bacillus cereus* a contagem foi realizada nos tempos 0, 48 e 120 horas de armazenamento.



Figura 1: Biofilme de própolis vermelha embalando folhas de alface.

Contagem de *Bacillus cereus* impregnada nas folhas de alface

A contagem de *Bacillus cereus* nas amostras de alface foi realizada conforme a metodologia de Santos [21]. Cada amostra de alface (1 g) obtida dos tempos 0, 48 e 120 horas de armazenamento foram colocadas em Erlenmeyer contendo 9 mL de água peptonada 0,1%. Os erlenmeyer foram homogeneizados por 5 minutos a uma rotação de 120 g. A partir desta solução, foram realizadas as diluições decimais das amostras e do controle (10^{-1} a 10^{-5}) e então se procedeu à semeadura de 0,1 mL, em duplicata, na superfície de Agar soja tripticaseína digerido seletivo para *B. cereus* (preparado com gema de ovo e polimixina B).

As placas foram incubadas invertidas à temperatura de 33°C durante 48 h. Após este período foram consideradas as placas que continham entre 15 e 150 colônias.

Análise estatística

A média dos halos de inibição de extrato de própolis foi realizada com auxílio do programa *Assistat 7.5 beta*, aplicando a análise de variância (ANOVA), sendo a existência de diferenças significativas determinada pelo teste de Tukey ao nível de 1% de significância ($p < 0,01$) [23].

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Obtenção do rendimento e atividade antimicrobiana dos extratos hidroalcoólicos de própolis vermelha (EHP)

Os extratos hidroalcoólicos de própolis vermelha apresentaram rendimento que variou de 9,45% a 74,62% (m/m), sendo que, apenas duas amostras demonstraram rendimento abaixo do valor determinado pelo Ministério da Agricultura, que é de no mínimo 11%. Os dez EHP apresentaram atividade antibacteriana frente à *Bacillus cereus* apresentando halos de inibição entre 14,0 a 18,0 mm (Figura 2).

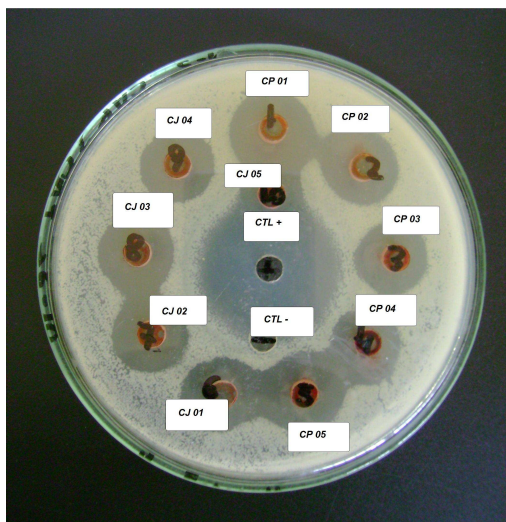


Figura 2: Atividade antibacteriana dos extratos de própolis vermelha frente a *B. cereus*.

A ação da própolis frente aos microrganismos neste estudo foi comprovada em trabalhos anteriores, como no de Marcucci et al. [24] que verificaram atividade antimicrobiana *in vitro* da própolis contra linhagens de bactérias Gram-positivas: *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus faecalis*. Estudo realizado por Menezes et al. [25] também observaram que extratos etanólicos de própolis em preparações comerciais como tabletes, cápsulas e pós contendo própolis têm ação frente a *S. aureus*, *Bacillus subtilis* e *Bacillus cereus*.

Potencial antimicrobiano do biofilme de própolis vermelha

De acordo com a RDC nº 12/2001, que determina os padrões microbiológicos sanitários para alimentos, os produtos analisados são considerados impróprios para consumo humano quando apresentarem contagem de *Bacillus cereus* superiores a 10^3 UFC.g⁻¹.

Nesse estudo, o biofilme elaborado com adição de extratos de própolis vermelha apresentou resultado de acordo com o padrão sanitário. No tempo de “0” horas as colônias crescidas tanto no biofilme com própolis como no biofilme sem própolis, utilizado como controle negativo, apresentaram grande número de colônias (incontável). Entretanto, houve significativa diminuição da carga microbiana para o biofilme com própolis no tempo entre 0 e 48 horas e uma estabilização no crescimento entre as 48 a 120 horas, como apresentado na Tabela 1. Esse fator demonstra que o extrato de própolis apresenta função bacteriostática frente a esta cepa.

Tabela 1: Crescimento bacteriano em folhas de alface embaladas com biofilme contendo própolis vermelha e biofilme sem própolis.

Tempo (horas)	<i>Bacillus cereus</i> UFC/g	
	Biofilme com própolis	Biofilme sem própolis
0	CI	CI
48	9×10^{-3a}	CI
120	9×10^{-3a}	CI

CI – Colônias incontáveis.

Letras iguais na mesma coluna representam valores estatisticamente iguais para o teste de Tukey ($p < 0,01$).

Os resultados obtidos do teste da eficácia do biofilme frente a colônias inoculadas de *Bacillus cereus* se mostraram satisfatórios, pois houve redução da carga microbiana, comprovando ação antibacteriana do filme de própolis vermelha. Filmes elaborados com 40 e 200 g de extratos etanólicos de própolis coletadas no Estado de São Paulo apresentaram atividade contra *S. aureus*, além de manterem a atividade antimicrobiana por 177 dias de armazenamento [17].

Segundo Chen et al [16], uma vantagem no uso dessas embalagens é que além de serem biodegradáveis, estes filmes podem servir como suporte para os aditivos antimicrobianos, e podem permitir que estes compostos ativos sejam liberados na superfície do alimento promovendo segurança alimentar melhorada para os consumidores, além do prazo de validade que pode ser prolongado. Em outro estudo realizado por Pranoto et al. [28], filmes contendo óleo de alho mostrou ação inibitória contra *S. aureus*, apresentando halo de inibição de 17 mm, resultado semelhante ao obtido no teste de sensibilidade antimicrobiana no presente estudo com extratos de própolis vermelha.

Biofilmes elaborados a base de soro de leite com orégano e óleo essencial de alho também apresentaram inibição frente a *S. aureus* [29], assim como os filmes preparados a base de quitosana com adição de óleo de tomilho, que mesmo em concentração mais baixa foi capaz de inibir esta mesma bactéria [30].

Uma observação feita durante o experimento, mesmo não realizando testes organolépticos, foi que a coloração verde da alface permaneceu ativa, sendo possível perceber que não houve escurecimento ou mudança na coloração nas folhas de alface durante os cinco dias do experimento. Esse fato pode ser devido à ação antioxidante da própolis vermelha, comprovada por diversos autores [4,5,9].

Outro fator que pode estar relacionado à preservação das folhas de alface é o fato do biofilme ter sido elaborado á base de amido. De acordo com Ciacco e Cruz [26] a maioria dos amidos possui em sua composição 20-30% de amilose e 70-80% amilopectina, razão que varia com a fonte botânica, dessa forma, o arranjo estrutural dessas macromoléculas permite a formação de áreas cristalinas. Essas áreas cristalinas permitem manter a estrutura dos grânulos além de controlar o seu comportamento na água e os tornam relativamente resistentes às ações enzimática e química [27]. Estes resultados demonstram que o efeito inibitório do composto bioativo pode também estar associado com a macromolécula utilizada na fabricação do biofilme.

4. CONCLUSÃO

Considerando os resultados aqui apresentados, é possível concluir que os extratos hidroalcoólicos de própolis vermelha possuem ação antibacteriana frente à *Bacillus cereus* demonstrando uma ação bacteriostática e que a incorporação desse extrato na concentração de 5% foi eficaz contra esta bactéria muito encontrada em água de irrigação de hortaliças. Além disso, foi observado também que a coloração das folhas de alface permanece ativa durante o período de armazenamento, não apresentando mudança de coloração ou escurecimento. Os resultados obtidos para o filme bioativo de própolis vermelha produzido neste estudo foram promissores e podem ser utilizados como base para futuros estudos aplicada na área de elaboração de biofilmes, como embalagens protetoras na preservação de alimentos ou como suporte de compostos bioativos.

5. AGRADECIMENTOS

Aos apicultores da ABECA que gentilmente cederam as amostras de própolis e ao CNPq pela bolsa concedida durante a elaboração desse trabalho.

-
1. Longhini, R.; Raksa, S.M.; Oliveira, A.C.P.; Svidzinski, T.I.E.; Franco, S.L. Obtenção de extratos de própolis sob diferentes condições e avaliação de sua atividade antifúngica. *Rev. Bras.Farmac.* 2007 jul-set; 17(3):388-395.
 2. Lotti, C., Fernandez, M.C., Piccinelli, A.L., Cuesta-Rubio, O. Hernandez, I.M. Rastrelli,L. Chemical constituents of red Mexican própolis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 2010; 58: 2209-2213.

3. Iio, A., Ohguchi, K., Inoue, H., Maruyama, H., Tazawa, S., Araki, Y., Ichihara, K., Nozawa, Y., ITO, M. Ethanolic extracts of Brazilian red propolis increase ABCA1 expression and promote cholesterol efflux from THP-1 macrophages. *J Nat Prod.* 2012 March; 19(5):383-388.
4. Marcucci, M.C.; Ferreres, F.; Viguera, G.C.; Bankova, S.; Castro, S.L.; Dantas, A.P.; Valente, P.H.M.; Paulino, N. Phenolic compounds from Brazilian propolis with pharmacological activities. *Journal of Ethnopharm.* 2001, 74: 105-112.
5. Park, Y. K., Alencar, S.M., SCAMPARINI, A.R.P., AGUIAR, C.L. Própolis produzida no sul do Brasil, Argentina e Uruguai: Evidências fitoquímicas de sua origem vegetal. *Ciênc Rur.* 2002, 32(6), 997-1003.
6. Sulaiman, G.M., Ad'hiah, A.H., Al-Sammarræ, K.W., Bagnati, R., Frapolli, R., Bello, E., Uboldi, S., Romano, M., Panini, N., Scanziani, E., Pezzolato, M., Erba, E., D'incalci, M.. Assessing the anti-tumour properties of Iraqi propolis in vitro and in vivo. *F Chem Toxic.* 2012 May; 50(5):1632-1641.
7. Daleprane, J.B., Freitas, V.S., Pacheco, A., Rudnicki, M., Faine, L. A., Dörr, F.A., Ikegaki, M., Salazar, L.A., Ong, T.P., Abdalla, D.S.P. Anti-atherogenic and anti-angiogenic activities of polyphenols from propolis. *The J Nut Biochem.* 2012 June; 23(6):557-566.
8. Albuquerque Junior, 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. *Int J Morphol.* 2009; 27:1105-1110.
9. Oldoni, T. L.C.; Cabral, I.C.R.; D'arcea, M.A.B.R.; Rosalen, P.L.; Ikegaki, M.; Nascimento, A.M.; Alencar, S.M. Isolation and analysis of bioactive isoflavonoids and chalcone from a new type of Brazilian propolis. *Sep Pur Techn.* 2011; 77: 208–213.
10. Organização Mundial De Saúde (OMS). Reunião interamericana, a nível ministerial, sobre saúde e agricultura, proposta de plano de ação do instituto pan-americano de proteção dos alimentos e zoonoses (INPPAZ), 13. Washington, Dc, 24 de Abril de 2003.
11. Moretti, C.L. Boas práticas agrícolas para a produção de hortaliças. *H Bras.* 2003 jul; 21(2).
12. Steindorf, R.H. Contribuição da extensão rural para o desenvolvimento da olericultura no Brasil. *H Bras.* 1997; 15: 227-229.
13. Debeaufort, F.; Quezada-Gallo, J.A.; Voilley, A. Edible films and coatings: tomorrows packaings: a review. *Crit Rev Food Science.* 1998, 38(4):299-313.
14. Emiroglu, Z. K., Yemis, G. P., Cos, kun, B. K., & Cando_gan, K. Antimicrobial activity of soy edible films incorporated with thyme and orégano essential oils on fresh ground beef patties. *Meat Science.* 2010, 86:283-288.
15. Teixeira, E.M. Utilização de amido de amndioca na preparação de novos materiais termoplásticos. [Tese]. São Carlos: Universidade de São Paulo; 2007.
16. Chen, C.-P., Wang, Be-J., & Weng, Y.-M. Physicochemical and antimicrobial properties of edible aloe/gelatin composite films. *Int J Food Sci & Tech.* 2010, 45:1050-1055.
17. Bodini, R.B., Sobral P.J.A., Favaro-Trindade, C.S., Carvalho, R.A. Properties of gelatin-based films with added ethanolepropolis extract. *LWT – F Sci Tech.* 2012, 1-7.
18. Park, Y.K.; Alencar, S.M.; Aguiar, C.L. Botanical origin and chemical composition of Brazilian propolis. *J Agric Food Chem.* 2002, 50:2502–2506.
19. NCCLS - National Committee for Clinical Laboratory Standards Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests. Approved Standard—Eighth. NCCLS document M2-A8, Pennsylvania, USA: Edition Wayne, 2003.
20. Maia-Araújo, Y. L. F.; Mendonça, L. S.; Orellana, S. C., Araujo, E. D. Comparação entre duas técnicas utilizadas no teste de sensibilidade antibacteriana do extrato hidroalcoólico de própolis vermelha. *Scientia Plena.* 2011, 7(4): 1-4.
21. Santos, Y.T.O. Qualidade sanitária de hortaliças cultivadas em um distrito sanitário de Salvador-BA e eficiência de soluções antimicrobianas sobre linhagens de *Escherichia coli*. [Dissertação]. Salvador: Universidade Federal da Bahia; 2007.
22. Sengun IY, Karapinar M. Effectiveness of household natural sanitizers in the elimination of *Salmonella typhimurium* on rocket (*Eruca sativa* Miller) and spring onion (*Allium cepa* L.). *Int J Food Microb.* 2005, 98:319-323.
23. Zar, J.H. Biostatistical Analysis. New Jersey, USA: Prentice Hall, 1999.
24. Marcucci, M. C. Propriedades biológicas e terapêuticas dos constituintes químicos da própolis. *Q Nova.* 1996, 19:529-535.
25. Menezes, H., Junior, M. B., Oliveira, S. D. E Pagnocca, F. C. Antibacterial properties of propolis and products containing propolis from Brazil. *Apidologie.* 1997, 28(2):71-76.
26. Ciacco, C.F.; Cruz R. Fabricação de amido e sua utilização. São Paulo: Secretaria da Indústria, Comércio, Ciência e Tecnologia. 1982, 152p. (Serie Tecnologia Industrial, v.7).

27. Billiaderis, C.G. The structure and interactions of starch with food. *Canadian Journal of Phys Pharmac.* 1991, 69:60-78.
28. Pranoto, Y., Salokhe, V. M., & Rakshit, S. K. Physical and antibacterial properties of alginate-based edible film incorporated with garlic oil. *F Res Intern.* 2005, 38:267-272.
29. Seydim, A. C., & Sarikus, G. Antimicrobial activity of whey protein based edible films incorporated with oregano, rosemary and garlic essential oils. *FRes Intern.* 2006, 39:639-644.
30. Altioek, D., Altioek, E., & Tihminlioglu, F. Physical, antibacterial and antioxidant properties of chitosan films incorporated with thyme oil for potential wound healing applications. *J Mat Sci: Materials in Medicine.* 2010, 21:2227-2236.
31. American Public Health Association. *Control of Communicable Diseases Manual.* Abram S. Benenson, Ed., 16 th Edition, 1995, 188:189.