

**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
CÂMPUS TOLEDO**

CHALISSA PAWLAK GOMES

**APLICAÇÃO DE EXTRATOS VEGETAIS EM FILMES POLIMÉRICOS PARA
SISTEMA DE EMPACOTAMENTO INTELIGENTE**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**TOLEDO
2023**

CHALISSA PAWLAK GOMES

**APLICAÇÃO DE EXTRATOS VEGETAIS EM FILMES POLIMÉRICOS PARA
SISTEMA DE EMPACOTAMENTO INTELIGENTE**

**Application of plant extracts in polymeric films for intelligent packaging
system**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Processos Químicos e Biotecnológicos da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – Campus Toledo como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Processos Químicos e Biotecnológicos.

Orientador(a): Tatiana Shioji Tiuman

**TOLEDO
2023**



[4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/)

Esta licença permite remixe, adaptação e criação a partir do trabalho, mesmo para fins comerciais, desde que sejam atribuídos créditos ao(s) autor(es) e que licenciem as novas criações sob termos idênticos.

Conteúdos elaborados por terceiros, citados e referenciados nesta obra não são cobertos pela licença.



**Ministério da Educação
Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Campus Toledo**



CHALISSA PAWLAK

**APLICAÇÃO DE EXTRATOS VEGETAIS EM FILMES POLIMÉRICOS PARA SISTEMA DE
EMPACOTAMENTO INTELIGENTE**

Trabalho de pesquisa de mestrado apresentado como requisito para obtenção do título de Mestre Em Processos Químicos E Biotecnológicos da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR). Área de concentração: Processos Químicos E Biotecnológicos.

Data de aprovação: 28 de Fevereiro de 2023

Dra. Tatiana Shioji Tiunan, Doutorado - Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Dr. Ricardo Fiori Zara, Doutorado - Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Dr. Salah Din Mahmud Hasan, Doutorado - Universidade Estadual do Oeste do Paraná (Unioeste)

Documento gerado pelo Sistema Acadêmico da UTFPR a partir dos dados da Ata de Defesa em 28/02/2023.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus por me conduzir e me conceder forças para vencer todos os obstáculos da vida.

À orientadora desta dissertação Prof.^a Dra. Tatiana Shioji Tiuman pela contribuição de seus conhecimentos, pela orientação prestada, pelo seu incentivo, e pela sua disposição em todos os momentos.

À Universidade Tecnológica Federal do Paraná pela oportunidade e apoio a esta pesquisa. Muito obrigada aos membros e colegas do Programa de Pós-graduação em Processos Químicos e Biotecnológicos e agradeço aos membros da banca examinadora, pelo interesse e disponibilidade.

Também agradeço, ao produtor rural e a empresa Baldo S/A pela doação das amostras e com isto colaborar com a execução desse trabalho.

Ao Laboratório Multiusuário - LABCA do Câmpus Toledo da Universidade Tecnológica Federal do Paraná pelas análises realizadas.

À UNIOESTE e a UTFPR/Medianeira pela cessão dos laboratórios da universidade, pelo ambiente amigável e docentes e discentes pelo auxílio sempre que necessário.

Não poderia deixar de agradecer à minha família por todo o apoio e pelo carinho que sempre me prestaram ao longo de toda a minha vida acadêmica. Ao meu marido, pelo incentivo e compreensão em todas as horas.

Quero demonstrar minha profunda gratidão, a todos aqueles que, de um modo ou de outro, tornaram possível a realização da presente dissertação. A todos o meu sincero e profundo Muito Obrigada!

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes”

Marthin Luther King

RESUMO

A erva-mate e o bagaço de uva possuem propriedades antioxidantes naturais, como os compostos fenólicos. Além disso, o bagaço de uva apresenta uma mistura de compostos, as antocianinas, que apresentam variações de cor em diferentes condições de pH. Considerando que a indústria de alimentos possui grande interesse na produção de embalagens ativas e inteligentes, o objetivo deste trabalho foi produzir e caracterizar um filme à base de amido enriquecido com extrato de bagaço de uva e de extrato de erva-mate e aplicar em modelos para avaliar a eficiência. Primeiramente, os extratos foram produzidos em sonificador de ponteira ultrassônico utilizando as amostras de erva-mate e bagaço de uva moídas. Foram realizadas suas caracterizações quanto à atividade antioxidante, compostos fenólicos totais (CFT) e atividade antimicrobiana. Além disso, os extratos de bagaço de uva foram quantificados em relação ao seu teor de antocianinas. Foram obtidos resultados de compostos fenólicos totais de $94,91 \pm 7,28$ mg EAG g amostra⁻¹ para extrato de erva-mate, e de antocianinas de $9,82 \pm 0,35$ mg eq cianidina-3-glicosídeo g⁻¹ amostra para o extrato de bagaço de uva, indicando uma possibilidade para aplicação em embalagens ativas. O extrato de erva-mate foi eficaz em inibir o desenvolvimento de algumas bactérias como a *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, *Salmonella enterica* e *Staphylococcus aureus*. Desta forma, estes extratos foram incorporados em biofilmes de amido. Após a incorporação dos extratos no filme, foram analisados os parâmetros de espessura, solubilidade em água, teor de umidade, permeabilidade ao vapor e índice de intumescimento, de modo que se observou aumento significativo nos dois primeiros de $0,09 \pm 0,00$ para $0,10 \pm 0,00$ mm e de $32,15 \pm 2,02$ a $38,64 \pm 3,26$ %, respectivamente. A adição dos extratos provocou uma redução significativa na tensão máxima de ruptura e no módulo de elasticidade, de $18,35 \pm 0,21$ para $11,66 \pm 2,19$ MPa e de $4,97 \pm 0,01$ a $3,28 \pm 0,29$ MPa, respectivamente. A variação de cor dos filmes foi visivelmente observada em diferentes pH, assim como houve a liberação de compostos fenólicos totais em três simuladores de alimentos, indicando que o filme pode retardar processos oxidativos. O filme também foi avaliado por um teste utilizando-se o leite como amostra e observou-se uma evidente alteração na coloração no período de sete dias. Desta forma, este estudo mostrou o potencial de um biofilme de amido incorporado com extratos naturais como embalagem antioxidante e indicador biológico de pH em alimentos.

Palavras-chave: embalagem inteligente; amido; extrato de erva-mate; extrato de bagaço de uva; indicador de pH.

ABSTRACT

Yerba mate and grape pomace have natural antioxidant properties, such as phenolic compounds. In addition, grape pomace has a blend of compounds, anthocyanins, which change color under different pH conditions. Considering that the food industry has a great interest in the production of active and intelligent packaging, the objective of this work was to produce and characterize a starch-based film enriched with grape pomace extract and yerba mate extract and apply it in models to evaluate efficiency. First, the extracts were made in an ultrasonic tip sonicator using ground yerba mate and grape pomace samples. Their characterizations were carried out regarding antioxidant activity, total phenolic compounds (TPC), and antimicrobial activity. In addition, grape pomace extracts were quantified for their anthocyanin content. Results were obtained for total phenolic compounds of 94.91 ± 7.28 mg EAG g sample⁻¹ for mate extract, as well as for anthocyanins of 9.82 ± 0.35 mg eq cyanidin-3-glycoside g⁻¹ sample for grape pomace extract, showed high levels of anthocyanins (9.82 ± 0.35 mg eq cyanidin-3-glycoside g⁻¹ sample), indicating a possibility for application in active packaging. Yerba mate extract was effective in inhibiting the development of some bacteria, such as *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, *Salmonella enterica*, and *Staphylococcus aureus*. Thus, these extracts were incorporated into starch biofilms. After including the extracts into the film, the parameters of thickness, water solubility, moisture content, vapor permeability, and swelling index were analyzed so that a significant increase was observed in the first two of 0.09 ± 0.00 for 0.10 ± 0.00 mm and from 32.15 ± 2.02 to 38.64 ± 3.26 %, respectively. The addition of extracts caused a significant reduction in the maximum tensile stress and the modulus of elasticity, from 18.35 ± 0.21 to 11.66 ± 2.19 MPa and from 4.97 ± 0.01 to 3.28 ± 0.29 MPa, respectively. The color variation of the films was visibly observed at different pH, as well as the release of total phenolic compounds in three food simulants, indicating that the film can delay oxidative processes. The film was also evaluated by a test using milk as a sample, and an apparent color change was observed within seven days. Thus, this study showed the potential of a starch biofilm incorporated with natural extracts as an antioxidant packaging and a biological pH indicator in foods.

Keywords: smart packaging; starch; yerba mate extract; grape pomace extract; pH indicator.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Mudança estrutural das antocianinas em meio aquoso com mudança de pH.....	27
Figura 2 - Grânulos de amido de (a) batata (tubérculo); (b) mandioca (raiz); e (c) arroz (semente) obtidos por microscopia eletrônica de varredura. A análise dos grânulos sob luz polarizada está mostrada no canto inferior direito.....	28
Figura 3 - Erva-mate antes (A) e após (B) o processo de moagem.	31
Figura 4 - Bagaço de uva seco (A) e bagaço de uva moído (B).....	32
Figura 5 - Equipamento Sonicador de Ponteira Ultrassônico.	32
Figura 6 - Diagrama da fabricação dos filmes a base de amido.....	34
Figura 7 - Extratos aquosos: EM1, EM2, EM3 e EM4. Extratos hidroalcólicos 50% (v/v): EM5, EM6, EM7 e EM8. Extratos hidroalcólicos 70% (v/v): EM9, EM10, EM11 e EM12.	45
Figura 8 - Extratos de bagaço de uva.....	47
Figura 9 - Produção de filmes de amido com 10 % extrato de erva-mate mais 10% de extrato de bagaço de uva (U2 e U4)	49
Figura 10 - Imagem dos filmes de amido sem adição dos extratos (controle) antes da secagem (A) e após secagem (B), filme de amido com extratos antes da secagem (C) e filme de amido com extratos após a secagem (D).	52
Figura 11 - Espectro na região do infravermelho do filme controle e do filme com extratos	56
Figura 12 - Micrografias de seção transversal do filme controle e do filme com extratos.	57
Figura 13 - Variação da cor do filme à base de amido contendo extrato de bagaço de uva e erva-mate submetidos a diferentes condições de pH (2,2, 4,0, 6,0, 8,0 e 13,0).....	59
Figura 14 - Propriedades de barreira à luz ultravioleta e visível (comprimentos de onda na faixa de 200–800 nm em função da transmitância) do filme à base de amido controle e contendo extrato de bagaço de uva e erva-mate.....	61
Figura 15 - Liberação de compostos fenólicos totais presentes no filme em sistemas com os diferentes simuladores.....	63
Figura 16 - Aplicação de filme como indicador de variação de pH no leite.	64

Figura 17 - Diferenças de cor RGB (vermelho, verde e azul) do filme com extratos durante o armazenamento de leite de vaca a 35 °C..... 64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição granulométrica da erva-mate e resíduo do bagaço de uva, expressos em percentual, após processo de moagem e tamisação.	44
Tabela 2 – Resultados de compostos fenólicos totais (CFT) dos extratos da erva-mate obtidos por diferentes condições de extração	46
Tabela 3 - Resultados de compostos fenólicos totais (CFT), atividade antioxidante e antocianinas dos extratos de bagaço de uva obtidos por diferentes condições de extração	48
Tabela 4 - Resultados das médias dos halos de inibição dos extratos de erva-mate e bagaço de uva frente a diferentes microrganismos.	51
Tabela 5 - Resultados da espessura, teor de umidade, solubilidade em água, permeabilidade de vapor de água (PVA) e índice de intumescimento dos filmes.	52
Tabela 6 - Propriedades mecânicas dos filmes	54

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
CFT	Compostos fenólicos totais
DPPH	2,2-difenil-1-picrihidrazila
EAG	Equivalente ácido gálico
EM	Erva-mate
FD	Fator de diluição
FRAP	Poder de redução do complexo férrico
FTIR	Análise de infravermelho por transformada de Fourier
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MH	Muller Hinton
MM	Massa molar
PVA	Permeabilidade ao vapor de água
TVA	Taxa de transmissão ao vapor de água
TROLOX	6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilchroman-2-carboxílico
U	Bagaço de uva
UR	Umidade relativa
UV	Ultravioleta

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	OBJETIVOS	18
2.1	Objetivo Geral	18
2.2	Objetivos Específicos	18
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
3.1	Atividades biológicas de compostos oriundos de plantas	19
3.1.1	Atividade antioxidante	19
3.1.2	Atividade antimicrobiana	20
3.2	Fontes naturais de compostos antioxidantes	20
3.2.1	Bagaço de Uva	21
3.2.2	Erva-mate	21
3.3	Métodos de extração	23
3.3.1	Ultrassom	23
3.4	Filmes comestíveis e embalagens ativas	24
3.4.1	Indicador de pH	25
3.5	Matérias primas utilizadas na produção de filmes biodegradáveis	27
3.5.1	Amido	27
4	MATERIAIS E MÉTODOS	31
4.1	Materiais	31
4.2	Preparação das amostras	31
4.2.1	Erva-mate	31
4.2.2	Bagaço de uva	31
4.3	Preparação dos extratos	32
4.4	Preparação das soluções filmogênicas	33
4.5	Adição dos extratos em dispersão filmogênica	33
4.6	Caracterização dos extratos	35
4.6.1	Determinação dos sólidos solúveis e pH	35
4.6.2	Atividade antioxidante	35
4.6.3	Compostos fenólicos totais	36
4.6.4	Teor de antocianinas	36
4.6.5	Atividade antimicrobiana	37
4.7	Caracterização dos filmes	38

4.7.1	Aspecto visual.....	38
4.7.2	Espessura e propriedades mecânicas.....	38
4.7.3	Teor de umidade e solubilidade em água.....	39
4.7.4	Índice de intumescimento.....	39
4.7.5	Permeabilidade ao vapor de água.....	40
4.7.6	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	41
4.7.7	Análise de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR).....	41
4.7.8	Avaliação de cor em diferentes condições de pH.....	41
4.7.9	Atividade antimicrobiana.....	41
4.7.10	Barreira de luz.....	42
4.7.11	Teste de liberação in vitro.....	42
4.7.12	Teste de aplicação do filme como embalagem em alimento.....	43
4.8	Análise estatística.....	43
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	44
5.1	Caracterização das amostras por granulometria.....	44
5.2	Produção e caracterização dos extratos.....	44
5.2.1	Erva-mate.....	45
5.2.2	Bagaço de uva.....	47
5.2.3	Determinação dos sólidos solúveis e pH dos extratos.....	49
5.2.4	Atividade antimicrobiana dos extratos.....	50
5.3	Caracterização dos filmes.....	51
5.3.1	Aspecto visual.....	51
5.3.2	Propriedade físicas.....	52
5.3.3	Propriedade mecânicas.....	54
5.3.4	Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR).....	55
5.3.5	Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	57
5.3.6	Avaliação da cor em diferentes condições de pH.....	58
5.3.7	Atividade antimicrobiana dos filmes.....	60
5.3.8	Barreira de luz.....	60
5.3.9	Teste de liberação in vitro.....	61
5.3.10	Teste de aplicação do filme como indicador de pH em embalagem.....	63
6	CONCLUSÃO.....	65
	REFERÊNCIAS.....	66
	APÊNDICE A - Testes preliminares de extração da erva-mate.....	73

APÊNDICE B - Halo de inibição dos extratos de erva-mate e bagaço de uva pelo método de disco-difusão75

APÊNDICE C - Halos de inibição dos filmes contendo extrato de erva-mate e bagaço de uva pelo método de disco-difusão 77

1 INTRODUÇÃO

Embalagens biodegradáveis feitas de recursos naturais renováveis e com funções aprimoradas estão sendo constantemente estudadas em resposta às demandas dos consumidores. Neste sentido, alguns estudos mostram a combinação de materiais para produção de filmes biodegradáveis com a incorporação de quitosana, carragenina, alginato (AMIN et al., 2022) e amido (CHENG et al., 2022). Os filmes obtidos a partir de amido têm sido desenvolvidos com sucesso (CEBALLOS et al., 2020) podendo ser estudados como matriz para a incorporação de compostos antioxidantes, antimicrobianos e produtos naturais.

A adição destes compostos em filmes poliméricos apresentam potencial para o desenvolvimento de um sistema ativo ou inteligente.

A capacidade da embalagem inteligente de monitorar e indicar a condição dos produtos embalados permite a obtenção de informações precisas para estender a vida útil dos produtos. Para alcançar esse objetivo, diversos sistemas de embalagem inteligente já foram desenvolvidos, como indicadores de tempo-temperatura, pH, frescor, entre outros (PERALTA et al., 2019a). A embalagem ativa é produzida por meio da adição intencional de componentes funcionais, como extratos naturais, aos sistemas de embalagem. Assim, estes componentes podem ser liberados no alimento embalado, auxiliando na manutenção da qualidade e no prolongamento do tempo de prateleira (YONG; LIU, 2020).

Dentre os extratos naturais proveniente de plantas, considera-se a erva-mate, que tem se destacado na produção brasileira e vem mostrando uma reação positiva de ampliação de seu mercado devido ao aumento do seu valor agregado. As propriedades biológicas do extrato de erva-mate, incluindo propriedades antioxidantes e proteção da peroxidação lipídica, são atribuídas à presença de compostos fenólicos (REIS et al., 2015).

Ademais, outro produto natural relevante, mas na forma de resíduo, é o bagaço de uva, pois além de possuir compostos fenólicos, também apresentam antocianinas. Estes últimos compostos são pigmentos hidrossolúveis que apresentam coloração rosa, roxo e vermelho nas plantas e podem transformar sua estrutura e apresentar coloração diferente quando há variação no valor do pH (ZHANG et al., 2021). A casca, polpa e sementes da uva no setor de

produção de vinho são considerados resíduos e subprodutos. Todavia têm sido relatados como ricos em compostos fenólicos, que possuem muitas propriedades fisiológicas associadas à boa saúde, como efeitos antialérgicos, antibacterianos, anticancerígenos, anti-inflamatórios, antioxidantes e cardioprotetores (DEMIRKOL; TARAKCI, 2018).

Portanto, as embalagens ativas enriquecidas com compostos antioxidantes e antimicrobianos são muito promissoras, pois estendem a validade de produtos alimentícios. Somando-se a isto, embalagens indicadoras de pH, são usadas para o controle do tempo de vida útil dos alimentos. Com isso, substâncias biologicamente ativas de fontes naturais provenientes de diferentes partes de plantas e resíduos de produção, estão cada vez sendo mais estudados, com o objetivo de serem incorporados em sistemas de empacotamento inteligente.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Desenvolver um sistema de empacotamento inteligente com filme polimérico acrescido de extratos de bagaço de uva e de erva-mate e avaliar o comportamento de liberação de compostos ativos, assim como seu potencial como indicador de pH.

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar as propriedades antioxidantes e antimicrobianas do extrato de bagaço de uva e do extrato de erva-mate;
- Desenvolver filmes poliméricos à base de amido pelo método *casting*;
- Caracterizar os filmes poliméricos por análises físicas (espessura, teor de umidade, solubilidade em água, índice de intumescimento, permeabilidade ao vapor de água), microscopia eletrônica de varredura, análise de infravermelho por transformada de Fourier, barreira de luz, análise mecânica e atividade antimicrobiana;
- Estimar a liberação de compostos antioxidantes pelo filme;
- Avaliar o potencial de aplicação do filme como indicador de pH, utilizando um alimento como modelo para o estudo.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Atividades biológicas de compostos oriundos de plantas

As pessoas têm buscado novas soluções para enfrentar muitos problemas, como a segurança alimentar e infecções derivadas de organismos resistentes. Considerando os efeitos colaterais das substâncias sintéticas, as plantas e subprodutos de plantas tornaram-se bastante valiosos, especialmente pelo fato de uma planta poder exibir atividades biológicas importantes (KOTILOĞLU; ACET; ÖZCAN, 2020). Dentre as atividades biológicas podemos mencionar as propriedades antioxidantes e atividade antimicrobiana das plantas.

3.1.1 Atividade antioxidante

O estresse oxidativo é o resultado de uma mudança no equilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio, resultado da combustão do oxigênio pelos organismos em seus processos bioquímicos celulares e a defesa antioxidante, contribuindo para muitas doenças (JALLOUL et al., 2022). Assim, a capacidade dos fitoquímicos de inibir ou retardar o processo de oxidação é chamada de antioxidante. Os antioxidantes naturais atuam como sequestradores de radicais livres e previnem estas reações.

A vitamina E (α -tocoferol), vitamina C (ácido ascórbico), β -caroteno e os compostos fenólicos (flavonoides) são exemplos de antioxidantes naturais (SILVA et al., 2021). Os compostos fenólicos de plantas medicinais bloqueiam os efeitos nocivos do estresse oxidativo e tem sido alvo de diversos estudos em substituição aos antioxidantes sintéticos (JALLOUL et al., 2022).

Riachi e De Maria (2017) mostraram que a erva-mate (*Ilex paraguariensis*) tem um efeito benéfico na saúde humana, devido aos seus efeitos fisiológicos (ação antioxidante) que são atribuídos principalmente aos compostos fenólicos, metilxantinas e saponinas.

O extrato do bagaço de uva constitui uma fonte de compostos fenólicos (antocianinas, flavan-3-ols, estilbenos e ácidos fenólicos) que resultam em sua alta atividade antioxidante (GOULA; THYMIATIS; KADERIDES, 2016). No

entanto, a principal desvantagem da utilização do bagaço da uva é devido aos compostos fenólicos apresentarem uma baixa estabilidade no processo de secagem. Neste contexto, é importante enfatizar a importância da utilização deste resíduo, pois, o desperdício de alimentos constitui uma excelente fonte de agentes bioativos naturais que podem ser extraídos e revalorizados (KUREK et al., 2019a).

3.1.2 Atividade antimicrobiana

A busca por compostos com atividade antimicrobiana em plantas é fundamental dado ao crescente surgimento de resistência bacteriana às substâncias já existentes. A composição de metabólitos secundários (compostos polifenólicos) da planta são os responsáveis por esta ação (SILVA et al., 2021).

Silva et al. (2021) relatam que os extratos de *Ilex paraguariensis* vem demonstrando importante efeito antimicrobiano em culturas *in vitro* para microrganismos com elevada patogenicidade, como *Candida albicans*, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* e *Salmonella enteridis*.

O bagaço de uva também possui atividade antimicrobiana contra vários patógenos de origem alimentar (SAURABH; GUPTA; VARIYAR, 2018). As antocianinas contidas nesse extrato possuem essa atividade e, por isso, são consideradas eficazes no desenvolvimento de embalagens ativas. Com isso, é possível manter a qualidade dos produtos alimentícios por um período maior, prolongando sua vida útil (YONG; LIU, 2020).

3.2 Fontes naturais de compostos antioxidantes

Extratos naturais são fontes de antioxidantes, como polifenóis e flavonoides, onde a atividade é bem conhecida nas indústrias farmacêutica, cosmética e alimentícia.

3.2.1 Bagaço de Uva

O bagaço de uva é o resíduo das vinícolas originado durante a produção do mosto através da prensagem de uvas inteiras. É altamente perecível devido ao seu alto teor de umidade e atividade de água e constitui uma fonte de compostos fenólicos, que inclui principalmente as antocianinas. A recuperação destes compostos é de grande importância, devido as propriedades e pela possibilidade de explorar uma grande quantidade de resíduos da indústria vinícola (GOULA; THYMIATIS; KADERIDES, 2016).

As antocianinas são pigmentos hidrossolúveis que apresentam coloração rosa, laranja brilhante, azul, roxo e vermelho nas plantas e são encontrados em mirtilos, framboesas, uvas e repolho roxo (KUREK et al., 2019b). As antocianinas podem transformar sua estrutura e apresentar coloração diferente quando há variação no valor do pH (ALPASLAN, 2019), cuja característica é interessante para ser utilizada em filmes inteligente sensíveis ao pH.

Nos últimos anos, antocianinas isoladas de algumas plantas como hibisco (*Hibiscus sabdariffa*) (PERALTA et al., 2019b), bagaço de mirtilo (*Vaccinium corymbosum* L.) (KUREK et al., 2019b), bagaço de amora (*Morus nigra* L.) (ZHANG et al., 2021) e casca de uva (MA; WANG, 2016) foram utilizadas para preparar filmes indicadores de pH.

3.2.2 Erva-mate

A *Ilex paraguariensis* St. Hill, conhecida popularmente como erva-mate, é uma planta da família das aquifoliáceas, na qual fazem parte aproximadamente 600 espécies diferentes. Está presente em regiões subtropicais e temperadas da América do Sul, sendo localizada no sul do Brasil, no Paraguai, Argentina e Uruguai. No Brasil, as plantas de ocorrência natural estão situadas nos estados de Minas Gerais, São Paulo e Rio de Janeiro, Mato Grosso do Sul, Rio Grande do Sul, Paraná e no estado de Santa Catarina (SILVA et al., 2021).

O cultivo da erva-mate para consumo é de grande importância socioeconômica, uma vez que é realizado por muitos pequenos produtores da região sul do Brasil, da Argentina e Paraguai, sendo estes três, os únicos países a realizarem sua produção no mundo (SILVA et al., 2021). A área de distribuição

natural da erva-mate abrange cerca de 3% do território da América do Sul (EMBRAPA, 2021). No Brasil, o estado que se destaca nesta produção é o Paraná. Segundo o IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística) (2019), o estado concentrou 87% de toda a produção de erva-mate do país em 2018, produzindo mais de 240 mil toneladas.

Segundo a RDC 22/2005 (ANVISA, 2005), a erva-mate é o produto constituído exclusivamente pelas folhas e ramos de *Ilex paraguariensis*, obtido por processo de secagem e fragmentação e destinado ao preparo de "chimarrão" (bebida quente preparada por infusão) ou "tererê" (preparado com infusão a frio) podendo ser adicionado de açúcar.

Os chás de erva-mate também são muito consumidos e podem ser mistos, aromatizados e/ou gelados. Estes produtos podem ser denominados de chá de erva-mate ou mate verde ou mate tostado. Estas bebidas possuem efeito estimulante do sistema nervoso central devido a presença de metilxantinas como a cafeína e seus derivados (SILVA et al., 2021).

Existem outros produtos no mercado feitos a partir da erva-mate, como os cosméticos, que utilizam seus extratos na composição. Algumas investigações estão expandindo o uso da *Ilex paraguariensis* em novos produtos, devido aos seus efeitos biológicos associados aos antioxidantes naturais. Desta forma, podem representar fontes alimentares interessantes para a nutrição humana relacionada à saúde cardiovascular (LARA; JUNIOR; MORAND, 2016).

Atualmente, a demanda por alimentos que contenham substâncias biologicamente ativas tem aumentado, haja vista que os consumidores buscam esses produtos para uma vida mais saudável. A erva-mate se enquadra neste contexto, devido aos inúmeros benefícios à saúde que proporciona, como a atividade hipocolesterolêmica e hepatoprotetora, estimulação do sistema nervoso central, ação diurética e atividade antioxidante (VALDUGA, 2016).

Estudos mostraram que entre dez espécies de plantas utilizadas como chás, a erva-mate foi a que apresentou a maior capacidade antioxidante (VALDUGA, 2016). Pesquisas recentes têm revelado importantes substâncias químicas na sua composição, possibilitando o seu emprego em novos produtos alimentícios, e assim, incrementar a demanda no mercado (FACCIN; VIEIRA; FREITAS, 2015). Sua ação antioxidante pode ser conferida pelos componentes

bioativos como vitaminas, minerais, polifenóis, xantinas, saponinas, ácidos orgânicos e compostos fenólicos (OLIVEIRA et al., 2020).

3.3 Métodos de extração

A extração de compostos de plantas ocorre tradicionalmente por métodos convencionais, utilizando métodos como maceração, infusão, decocção, agitação ou *Soxhlet*. No entanto, requerem longos períodos de extração, alto consumo de solvente, baixa eficiência e além da possibilidade de degradação de substâncias de interesse (CALDAS et al., 2018).

Considerando essas desvantagens, buscam-se tecnologias mais sustentáveis (extração “verdes”), inovadoras ou não convencionais nos quais o consumo de solvente e o tempo de extração sejam menores e um maior rendimento da extração. Dentre estas novas tecnologias incluem a aplicação de campos elétricos pulsados, extração assistida por micro-ondas e alta pressão e extração assistida por ultrassom (SILVA JÚNIOR et al., 2021).

O processo de ultrassom tem se mostrado um método eficiente e promissor, pois permite a extração completa e com altos rendimentos dos compostos vegetais de interesse em curto espaço de tempo, utilizando baixas temperaturas (RASPE et al., 2021).

3.3.1 Ultrassom

A intensificação do processo de extração por ultrassom tem sido atribuída aos fenômenos de cavitação onde a transferência de massa é aumentada principalmente devido às forças geradas pela implosão das bolhas, que geram um aumento drástico da pressão (na região de formação de bolhas). Neste sistema há um maior rendimento em processos de extração sólido-líquido devido à quebra das paredes celulares e, como resultado, ocorrerá um melhor contato entre o solvente e o material vegetal (KLEIN et al., 2015).

Dentre as propriedades do ultrassom podem ser citados: a melhor transferência de massa, quebra máxima de células vegetais e melhor penetração de solvente (SHARMILA et al., 2016). A frequência do ultrassom, a estrutura da

planta medicinal e o composto alvo são fatores que exercem influência no rendimento da extração (VARDANEGA; SANTOS; DE ALMEIDA, 2014).

Algumas vantagens deste tipo de extração destacam-se: tempo reduzido, baixo gasto de solvente, maior rendimento, boa reprodutibilidade, melhora a qualidade do extrato. Isso permite a possibilidade de usar solventes mais econômicos e seguros para o meio ambiente e para a saúde (SILVA JÚNIOR et al., 2021).

A avaliação dos efeitos da potência ultrassônica (W) e razão massa de folhas de uvaia e volume de solvente (g mL^{-1}) foi estudada por Klein et al. (2015), que demonstrou que ambas as variáveis são significativas no rendimento da extração, ou seja, quanto maior a potência de sonicação ou a razão massa/volume empregada, maior o rendimento obtido. Isso se deve, respectivamente, ao fenômeno de cavitação e ao gradiente de concentração.

Silva Júnior et al. (2021) estudaram a extração por ultrassom na casca de ciriguela (*Spondias purpurea L.*), que é considerada uma fonte de antioxidantes naturais e compostos fenólicos, comprovaram que este método é eficiente na recuperação dos compostos de interesse. Resultados semelhantes foram encontrados por Romanini et al. (2021), no qual os extratos aquosos de casca de uva obtidos por ultrassom apresentaram maiores teores de capacidade antioxidante, antocianinas e fenólicos totais em comparação com a extração convencional.

3.4 Filmes comestíveis e embalagens ativas

A preocupação com o meio ambiente devido ao uso do plástico tem impulsionado o interesse por embalagens biodegradáveis e sustentáveis (ROY; RHIM, 2021). Algumas fontes alternativas para esta substituição são embalagens produzidas a partir de amidos, quitosana, proteínas, que são materiais biodegradáveis (REIS et al., 2015).

Segundo RDC 259 de 2002, embalagem é o recipiente ou o pacote destinado a garantir a conservação e facilitar o transporte e manuseio dos alimentos. Todavia este conceito vem sendo alterado, pois a embalagem, além da função de proteção, pode oferecer soluções inovadoras como estender o

prazo de validade, monitorar a qualidade e a segurança do alimento (GANIARI; CHOULITOU DI; OREOPOULOU, 2017).

Um filme comestível é uma fina camada pré-formada de material comestível que são moldados como folhas sólidas e então aplicado como uma embalagem no alimento (GANIARI; CHOULITOU DI; OREOPOULOU, 2017). Este tipo de material tem como objetivo prolongar a vida útil do alimento, pois nele podem ser incorporados ingredientes ativos, como compostos antimicrobianos e antioxidantes (GANIARI; CHOULITOU DI; OREOPOULOU, 2017).

Quando incorporados compostos antimicrobianos ou antioxidantes nas embalagens elas são definidas como ativa. Esses compostos podem ser liberados na superfície ou absorvidos nos alimentos embalados resultando na extensão do prazo de validade do produto (JAMRÓZ et al., 2019). Logo, por estarem em contato com os alimentos, é desejável que os filmes apresentem propriedades sensoriais neutras, de modo a não alterar a qualidade dos alimentos.

A embalagem ativa permite que ela interaja com os alimentos e o meio ambiente e desempenha um papel dinâmico na preservação (REIS et al., 2015). Segundo Braga e Silva (2017), é definida como um sistema que possui aditivos, que interagem com o produto para estender o prazo de validade, além de manter a qualidade do alimento embalado.

Desta forma, este tipo de embalagem tem a capacidade de melhorar a qualidade, estender a vida útil e aumentar a segurança do alimento, pois consegue detectar, registrar, indicar e monitorar a condição dos produtos embalados (PERALTA et al., 2019a). Isto é, a embalagem pode interagir com o produto, e assim indicar ao consumidor suas reais condições, utilizando alterações cinéticas relacionadas à qualidade (CEBALLOS et al., 2020).

3.4.1 Indicador de pH

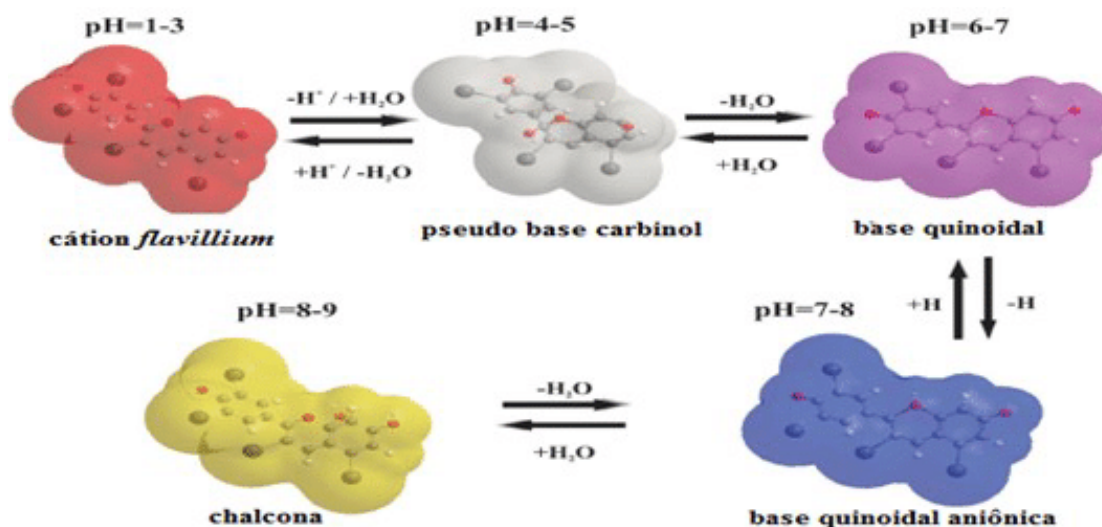
Os filmes inteligentes auxiliam no monitoramento da qualidade e segurança dos alimentos, fornecendo informações como a mudança de frescor. É considerado um método simples e viável, considerando que este tipo de detecção nos alimentos pode ser dar por equipamentos profissionais, tornando

o método oneroso (CHI et al., 2020). O filme inteligente indicador de cor sensível ao pH, pode detectar facilmente mudanças na qualidade dos alimentos em tempo real e a olho nu (ROY; KIM; RHIM, 2021).

A produção de filmes indicadores de cor requer corantes adequados sensíveis ao pH. Os corantes naturais são considerados mais seguros que os corantes sintéticos e sua demanda no mercado está aumentando (SIGURDSON; TANG; GIUSTI, 2017). Corantes naturais como alizarina, curcumina, betalaína e shikonin têm sido utilizados, porém, apesar da estabilidade das antocianinas ser um pouco baixa, é o pigmento que tem sido mais estudado (ROY; KIM; RHIM, 2021). As antocianinas extraídas de uvas têm sido usadas em alguns filmes sensíveis ao pH com sucesso em carne suína refrigerada (GOLASZ; SILVA; DA SILVA, 2013) e leite (MA; WANG, 2016).

As antocianinas possuem excelentes habilidades antioxidantes, antimicrobianas e devido sua transformação estrutural apresentam cores diferentes em função do pH (YONG; LIU, 2020). As antocianinas são capazes de sofrer rearranjos estruturais em resposta às alterações no pH, podendo apresentar quatro diferentes estruturas: cátion flavílio (vermelho), base anidra quinoidal (azul), pseudobase de carbinol (incolor), e chalcona (amarela) (KAMILOGLU et al., 2015). Quando expostas a um meio ácido, as antocianinas tendem a se apresentar predominantemente na forma catiônica, à medida que o pH do meio aumenta, ocorre uma rápida desprotonação dessas substâncias, o que leva à formação da base quinoidal. Em soluções aquosas neutras, o cátion flavílio sofre hidratação, gerando um equilíbrio entre as formas carbinol e chalcona (ARRUDA et al., 2019). A Figura 1 ilustra como ocorrem essas diferentes estruturas em meio aquoso, de acordo com o pH da solução.

Figura 1 - Alteração estrutural das antocianinas em meio aquoso de acordo com a mudança de pH.



Fonte: ARRUDA et al., 2019

3.5 Matérias primas utilizadas na produção de filmes biodegradáveis

Materiais biodegradáveis são aqueles que se decompõem quando em contato com o meio ambiente, ou seja, podem ser degradados pela ação enzimática de organismos vivos, como bactérias, leveduras, fungos e a sua decomposição é mais rápida comparada aos produtos tradicionais (JARAMILLO et al., 2016). Embora as embalagens não biodegradáveis sejam amplamente utilizadas, as embalagens biodegradáveis feitas a partir de fontes renováveis como amido, celulose e proteínas são uma alternativa promissora e potencialmente substituta (MIGLIORANZA et al., 2021). O amido tem atraído atenção especial por suas características e versatilidade, visto que é um carboidrato polimérico obtido de fontes renováveis capaz de formar filmes transparentes, insípidos, inodoros e não tóxicos (LUCHESE; PAVONI; TESSARO, 2021).

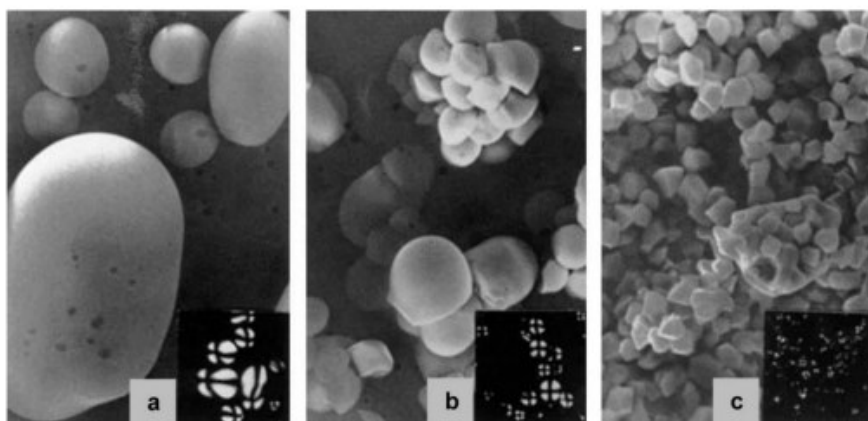
3.5.1 Amido

Os amidos apresentam diferentes propriedades nutricionais, tecnológicas, funcionais e sensoriais e são utilizados na indústria de alimentos em diferentes aplicações (ARAÚJO, 1995). Pode ser encontrado de várias fontes de raízes,

sementes e tubérculos, tais como mandioca, arroz, milho, trigo e batata. O amido fornece de 70 a 80% das calorias consumidas pelos seres humanos no mundo todo e ele e os seus hidrolisados constituem a maior parte dos carboidratos digeríveis da dieta humana (FENNEMA, 1996).

O que distingue o amido dos demais carboidratos são os seus grânulos (partículas parcialmente cristalinas e insolúveis) (FENNEMA, 1996). Quando uma suspensão de grânulos é cozida, há aumento de viscosidade (espessamento) do amido e a sua estrutura é alterada irreversivelmente (FENNEMA, 1996). Em baixas temperaturas não ocorre a solubilização do amido, nem alterações na sua morfologia (JOYE, 2018). Muitos dos grânulos de amido de tubérculos e raízes tendem a ser maiores que os de amidos de sementes (Figura 2) e, em geral, são menos densos e mais fáceis de cozinhar (FENNEMA, 1996).

Figura 2 - Grânulos de amido de (a) batata (tubérculo); (b) mandioca (raiz); e (c) arroz (semente) obtidos por microscopia eletrônica de varredura. A análise dos grânulos sob luz polarizada está mostrada no canto inferior direito.



Fonte: SOYKEABKAEW; THANOMSILP; SUWANTONG (2015).

Qualquer aplicação de amido depende de suas propriedades funcionais, entre as quais a gelatinização e recristalização ou retrogradação são importantes (YAMAMOTO et al., 2020). A gelatinização é a transformação irreversível do amido granular em um material viscoelástico, que acontece na presença de excesso de água e leva à destruição da cristalinidade e da ordem molecular do grânulo, através do rompimento das ligações de hidrogênio. Após a gelatinização, ocorre a recristalização ou retrogradação, na qual as moléculas de amido podem começar a se religar através de ligações de hidrogênio,

favorecendo a formação de uma disposição mais organizada (MALI; GROSSMANN; YAMASHITA, 2010).

Na técnica do tipo *casting* (formação de uma solução filmogênica que, em seguida, é seca para evaporação do solvente), após a gelatinização térmica dos grânulos (amilose e amilopectina), em excesso de água, estes se dispersam na solução aquosa e, durante a secagem, se reorganizam, formando uma matriz que dá origem aos filmes (MALI; GROSSMANN; YAMASHITA, 2010).

3.5.1.1 Mandioca como fonte de amido

O Brasil lidera a exportação de fécula de mandioca, que é utilizada em várias indústrias, incluindo alimentação humana, têxtil, siderúrgica, farmacêutica, calçadista, de tintas e madeira (ROCHA; FARIAS, 2014). Há um interesse crescente em agregar valor ao beneficiamento da mandioca, que é uma fonte abundante, renovável e de baixo custo (ROCHA; FARIAS, 2014). Pesquisas recentes estão em desenvolvimento para explorar seu potencial em aplicações como embalagens.

O amido é uma matéria-prima muito utilizada para a produção de filmes biodegradáveis e com características comestíveis devido ao seu baixo custo e ser um material amplamente disponível (VERSINO et al., 2016). O tempo de degradação de produtos à base de amido é menor do que outros materiais poliméricos. No que diz respeito aos cuidados com o meio ambiente, uma degradação mais rápida do material indica que o volume de resíduos também é reduzido, trazendo um benefício considerável (JARAMILLO et al., 2016).

O amido de mandioca tem se tornado um biopolímero base no desenvolvimento de muitos filmes, como por exemplo: filmes indicadores de pH com adição de argila e antocianina por *casting* (ARENAS, 2012); filmes indicadores de pH por *casting* com adição de bagaço de mirtilo (LUCHESE et al., 2017); e filmes com adição de polpa de manga e acerola para avaliação da atividade antioxidante em matrizes a base de amido de mandioca (SOUZA et al., 2011).

Filmes ativos de amido de mandioca contendo extrato de erva-mate já foram desenvolvidos e testados como embalagens. Reis et al. (2015)

incorporaram polpa de manga e extrato de erva-mate como aditivos e eles foram eficazes na preservação do óleo de palma embalado contra a oxidação. Além das características antioxidantes do extrato de erva-mate, Jaramillo et al. (2016) comprovaram seu efeito plastificante e contribuição para uma biodegradabilidade mais rápida, bem como a maior estabilidade dos filmes de amido.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Materiais

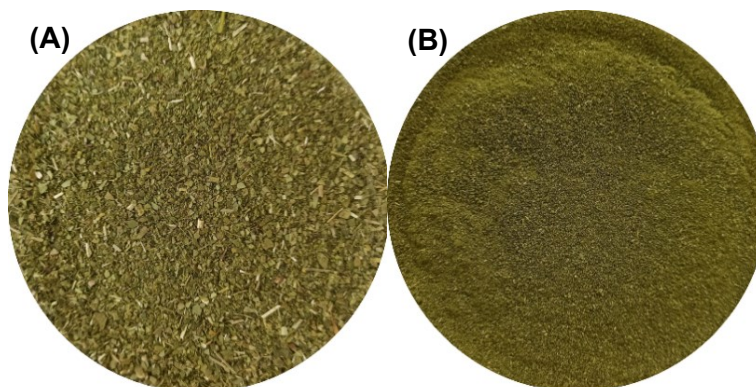
Foram usados no presente estudo, bagaço de uva da variedade Bordô, espécie *Vitis labrusca*, talos e folhas de erva-mate (*Ilex paraguariensis*), amido de mandioca (Horizonte) e sorbitol (BIOATIVA).

4.2 Preparação das amostras

4.2.1 Erva-mate

A amostra de erva-mate, que foi gentilmente cedida pela empresa Baldo S/A, localizada em São Mateus do Sul/PR era constituída por talos e folhas de *Ilex paraguariensis*. Inicialmente foi triturada em moinho de facas SL-30 (Figura 3) e posteriormente a amostra foi armazenada em sacos de polietileno em geladeira até a realização das análises.

Figura 3 – Amostra de erva-mate antes (A) e após (B) o processo de moagem.

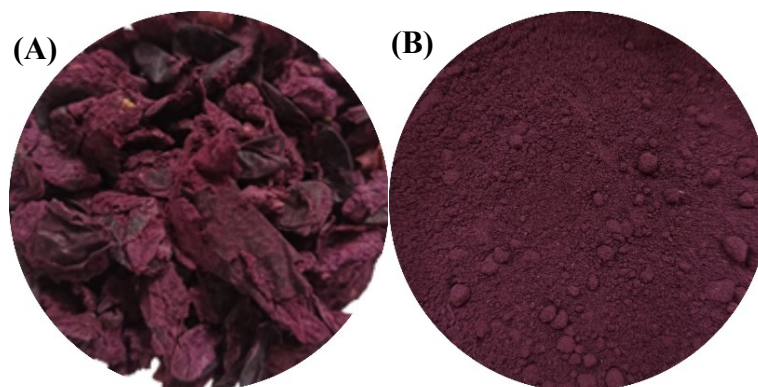


Fonte: Autora, 2022.

4.2.2 Bagaço de uva

A amostra de bagaço de uva foi obtida após 90 dias de vinificação em Serranópolis do Iguaçu/PR, safra 2020/2021. Após foi armazenada sob refrigeração de -20 °C e em seguida foi liofilizada (liofilizador modelo L101, Liobras) e moída em moinho de facas SL-30 (Figura 4). Em seguida foi armazenada em sacos de polietileno em freezer até a realização das análises.

Figura 4 - Amostra de bagaço de uva seco (A) e bagaço de uva moído (B).



Fonte: Autora, 2022.

4.3 Preparação dos extratos

Os extratos foram preparados a partir de resíduos de bagaço de uva, como fonte de antocianinas, e de erva-mate, como fonte de antioxidantes e clorofila. As matérias-primas foram dispersas em 100 mL de solvente, sendo utilizados nos testes água, etanol 50% e etanol 70% para a erva-mate e etanol 70% para o bagaço de uva. Logo após, foram dispostas em um Sonicador de Ponteira Ultrassônico com gabinete acústico (Eco-Sonics) (Figura 5) com temperatura controlada de 25 °C. A potência (25, 50, 75 e 90%) e o tempo (10 e 30 minutos) foram ajustados de acordo com cada teste realizado. Posteriormente, foram filtrados em papel filtro quantitativo (Quanty) de 25 µm e, em seguida, os extratos foram conservados em geladeira em frascos âmbar.

Figura 5 - Equipamento sonicador de ponteira ultrassônico com gabinete acústico (Eco-Sonics).



Fonte: Autora, 2022

4.4 Preparação das soluções filmogênicas

Os filmes foram produzidos por técnica de *casting* baseada na metodologia proposta por Peralta et al. (2019b), com algumas modificações. A concentração de amido de mandioca foi de 2 g e de sorbitol foi de 50 g para cada 100 g de solução filmogênica.

O amido foi primeiramente disperso em água destilada sob agitação magnética contínua à temperatura ambiente durante 30 minutos. Após, a dispersão filmogênica foi mantida a 90 °C durante 10 minutos em banho termostático com agitação manual. Ao final, o sorbitol adicionado à dispersão sob agitação magnética por 2 minutos.

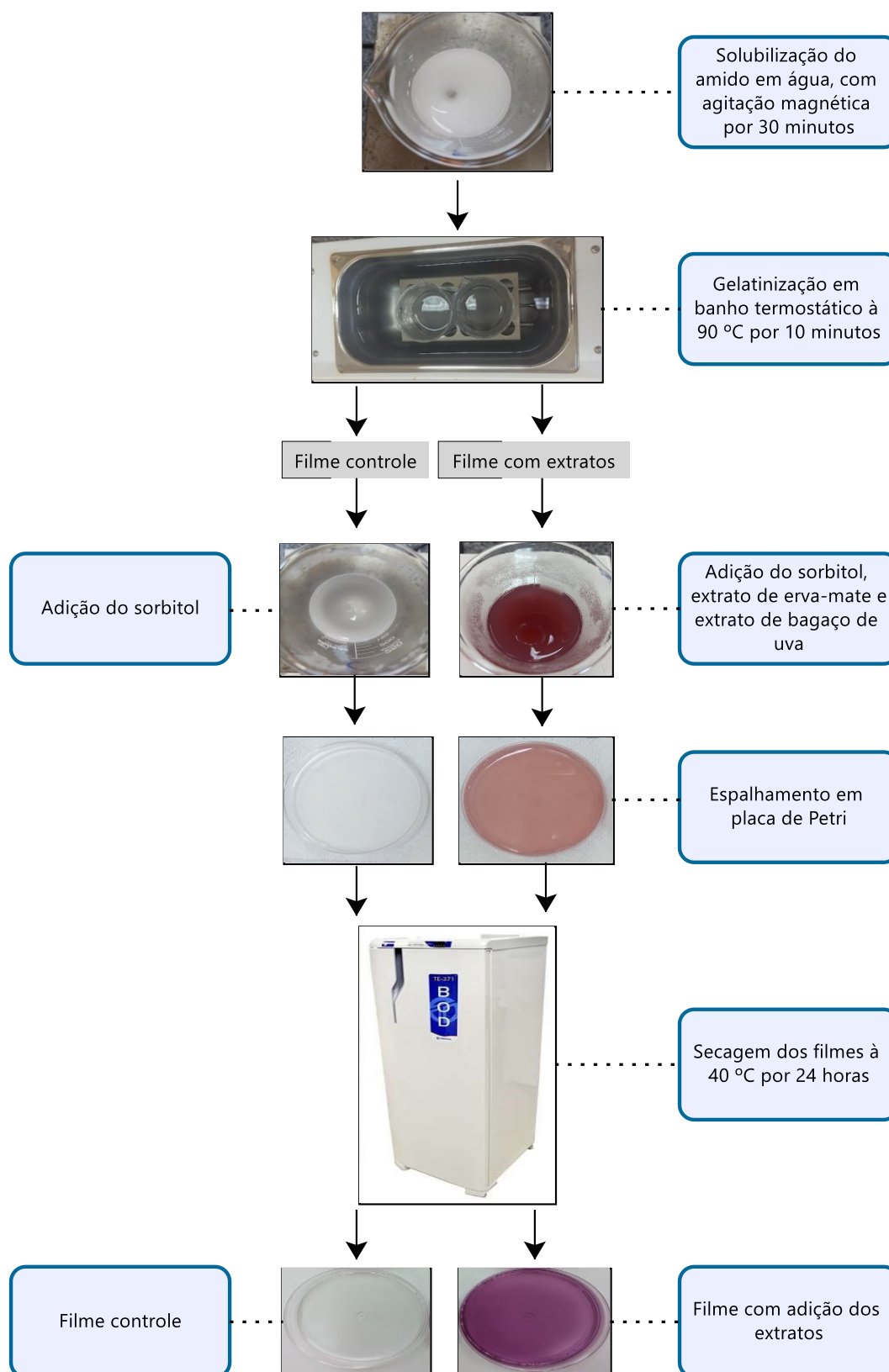
4.5 Adição dos extratos em dispersão filmogênica

Após testes preliminares, definiu-se a concentração de 10 % (m/m) de extrato de erva-mate mais 10 % (m/m) de extrato de bagaço de uva para serem incorporados ao filme. A dispersão filmogênica com os extratos foi adicionada em placas de Petri 90x15 mm descartável de poliestireno (PS). A espessura do filme foi controlada pela massa de 30 gramas da dispersão filmogênica colocada na placa. O filme foi seco em BOD (TECNAL, modelo TE-371) a 40 °C por 24 horas.

Ensaio preliminares para preparação dos filmes foram realizados, para definição da formulação citada acima. A cor do filme foi o critério utilizado para a seleção da formulação filmogênica.

A formação do filme de amido, com adição dos extratos, pela técnica de *casting* está esquematizada na Figura 6.

Figura 6 - Diagrama da fabricação dos filmes a base de amido sem e com adição de extratos de erva-mate e bagaço de uva.



Fonte: Autora, 2022.

4.6 Caracterização dos extratos

Os extratos foram caracterizados quanto à sólidos solúveis (° Brix), pH, atividade antioxidante, compostos fenólicos totais, teor de antocianinas e atividade antimicrobiana. Todos os testes foram realizados em triplicata.

4.6.1 Determinação dos sólidos solúveis e pH

As análises do teor de sólidos totais (° Brix) foram realizadas por refratometria utilizando-se um refratômetro manual (modelo RHB-32/ATC, Megabrix). As medidas de pH foram realizadas por medição direta em pHmetro digital previamente calibrado (modelo LUCA-210, MS Tecnopon). As determinações foram feitas de acordo com as normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz (IAL, 2008).

4.6.2 Atividade antioxidante

A atividade antioxidante foi avaliada pelos métodos de captura do radical livre 2,2-difenil-1-picrihidrazila (DPPH) e de poder de redução do complexo férrico (FRAP) baseados na metodologia descrito por Boroski et al. (2015).

Para avaliação do método DPPH a construção da curva de calibração empregada foi utilizando uma solução padrão Trolox ($\text{MM } 250,29 \text{ g mol}^{-1}$) em metanol nas concentrações de 0 a $2000 \mu\text{mol L}^{-1}$. Uma alíquota de solução do extrato foi adicionada a 3,0 mL de solução metanólica do radical DPPH e mantida no escuro por 30 minutos. Após este período, a absorbância foi lida a 517 nm em um espectrofotômetro UV/VIS (T80+, Reino Unido) contra o branco (metanol). Para cada absorbância obtida, foi calculada a concentração de extrato em μmol equivalente Trolox por grama de amostra ($\mu\text{mol ET g}^{-1}$ amostra).

Para o ensaio FRAP foi realizada uma curva de calibração (concentrações entre 0 e $2000 \mu\text{mol L}^{-1}$) utilizando-se sulfato ferroso como padrão. O teste consistiu na adição de 100 μL de solução contendo os extratos e 300 μL de água destilada em 3,0 mL da solução do reagente FRAP (branco). A solução resultante foi homogeneizada e mantida em banho de aquecimento por 30 minutos a 37 °C. Posteriormente, a absorbância foi lida a 593 nm em um espectrofotômetro UV/VIS (T80+, Reino Unido). Para cada absorbância obtida,

calcularam-se os resultados em μmol equivalente sulfato ferroso por grama de amostra (μmol de Fe (II) g^{-1} amostra).

4.6.3 Compostos fenólicos totais

Foram quantificados os compostos fenólicos totais pelo método de Folin-Ciocalteu, baseado na metodologia descrito por Boroski et al. (2015). Uma alíquota de 250 μL da solução extrato foi adicionado a 250 μL do reagente de Folin-Ciocalteu (diluído 1:1 em água destilada), 500 μL de solução saturada de carbonato de sódio (35%, diluído em água destilada) e 4,0 mL de água destilada. Após 25 minutos sob proteção da luz a solução foi centrifugado, e a absorbância foi determinada a 725 nm em um espectrofotômetro (T80+, Reino Unido). Uma curva padrão de ácido gálico foi preparada, e o resultado foi expresso como mg equivalente de ácido gálico por g de amostra (mg EAG g^{-1} amostra).

4.6.4 Teor de antocianinas

O teor de antocianinas foi determinado pelo método do pH diferencial descrito por Wrolstad (1976). As absorbâncias foram medidas utilizando-se espectrofotômetro UV/VIS (T80+, Reino Unido).

4.6.4.1 Antocianinas Monoméricas

Na análise das antocianinas monoméricas (AM), as amostras foram diluídas em solução tampão cloreto de potássio (pH 1,0) e acetato de sódio (pH 4,5) com um fator de diluição pré-determinado. As leituras das absorbâncias foram feitas nos comprimentos de onda 520 e 700 nm. O valor de absorbância final e a concentração total das antocianinas monoméricas foram calculados de acordo com as Equações (1) e (2), respectivamente. A concentração total das antocianinas monoméricas foi expressa em mg equivalente de cianidina-3-glucosídeo por g de amostra.

$$A = (A_{520} - A_{700})_{\text{pH } 1,0} - (A_{520} - A_{700})_{\text{pH } 4,5} \quad (1)$$

$$AM = \frac{A \times MM \times FD \times 100}{\epsilon \times L} \quad (2)$$

Onde: A é a absorvância calculada pela Equação 1, MM é a massa molar da cianidina-3-glucosídeo (449,2 g mol⁻¹), FD é o fator de diluição, ϵ é o coeficiente de extinção molar (26900 L mol⁻¹ cm⁻¹) e L é o caminho óptico da cubeta (1 cm).

4.6.4.2 Cor polimérica e densidade de cor

Para a determinação da cor polimérica e densidade de cor, as absorvâncias foram medidas nos comprimentos de onda de 420, 520 e 700 nm. As amostras foram diluídas em água destilada para a determinação da densidade de cor e para determinação da cor polimérica adicionou-se 0,1 mL de uma solução de 20 % de metabissulfito de potássio (K₂S₂O₅) nas amostras diluídas. A cor polimérica é calculada de acordo com a Equação (3) e a densidade de cor é calculada conforme Equação (4).

$$\text{Cor polimérica} = (A_{520} - A_{700}) + (A_{420} - A_{700}) \times FD \quad (3)$$

$$\text{Densidade de cor} = (A_{520} - A_{700}) + (A_{420} - A_{700}) \times FD \quad (4)$$

4.6.5 Atividade antimicrobiana

A atividade antimicrobiana dos extratos foi testada utilizando a metodologia do teste de disco-difusão conforme CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (2005). Foram utilizadas cepas padrão de *Staphylococcus aureus* (ATCC14458), *Escherichia coli* (ATCC10536), *Salmonella enterica sorovar Typhi* (ATCC06539), *Bacillus cereus* (ATCC 14579), *Candida albicans* (ATCC 26790) e *Candida tropicalis* (ATCC 28707).

O experimento foi realizado após as cepas serem ativadas e padronizadas pela escala 0,5 de Mcfarland. Para o controle bacteriano foi utilizado disco somente com antibiótico ampicilina e para controle fúngico foi utilizado antibiótico nistatina.

Aplicou-se a suspensão bacteriana sobre a superfície do ágar Muller Hinton (MH) e a suspensão fúngica sobre a superfície do ágar Sabouraud com swab de algodão. Impregnou-se os discos estéreis de papel filtro (6,3 mm de diâmetro) com 10 µL dos extratos (secos em nitrogênio e diluídos em solução salina com concentração final de 150 mg mL⁻¹) e o controle e com auxílio de uma pinça esterilizada aplicá-los sobre o ágar. Após as placas foram incubadas com os discos em estufa bacteriológica a 35 °C durante 24 horas. A medição dos diâmetros dos halos de inibição de crescimento ao redor de cada disco foi expressa em milímetros.

4.7 Caracterização dos filmes

Antes da caracterização, os filmes foram armazenados separadamente sob proteção da luz e acondicionados em refrigeração até o momento das análises.

4.7.1 Aspecto visual

As análises visuais dos filmes foram realizadas com base na homogeneidade (ausência de partículas insolúveis e uniformidade de cor) e manuseio (facilidade de remoção dos filmes das placas de Petri).

4.7.2 Espessura e propriedades mecânicas

A espessura total de cada filme foi obtida medindo-se cinco pontos aleatórios da superfície do filme com paquímetro (MTX) de precisão de 0,02 mm e calculada a média dos valores.

As propriedades mecânicas foram estudadas usando uma máquina universal de ensaios (Biopdi). Foram avaliados a tensão máxima de ruptura (MPa), alongamento na ruptura (%) e o módulo de elasticidade (MPa). A velocidade de deslocamento foi de 5 mm min⁻¹, a célula de carga foi de 10 kgf e a distância inicial entre as garras foi de 25 mm. Três amostras de cada formulação foram analisadas.

4.7.3 Teor de umidade e solubilidade em água

O teor de umidade e a solubilidade em água do filme foram determinados usando metodologia adaptada de acordo com Peralta et al. (2019b). Amostras de filme de 2 cm de diâmetro foram primeiramente pesadas (M_0) e então colocadas em estufa (SOLAB, modelo SL-100) a 105 °C durante 24 horas. Após, os filmes foram pesados (M_1) novamente. O teor de umidade foi determinado em triplicata como a porcentagem do peso perdido durante a secagem de acordo com a Equação (5).

$$\text{Teor de umidade} = \frac{M_0 - M_1}{M_0} \times 100 \quad (5)$$

Para o teste de solubilidade em água, os filmes (2 cm de diâmetro) secos em estufa a 105 °C foram imersos em erlenmeyers contendo 50 mL de água destilada e colocados em incubadora refrigerada com agitação orbital (THOTH, modelo 6430) a 68 rpm e 25 ± 2 °C durante 24 horas. Após os filmes foram retirados da solução e secos em estufa (SOLAB, modelo SL-100) a 105 °C durante 24 horas. A massa inicial foi avaliada considerando o peso informado de M_1 . A solubilidade em água foi determinada em triplicata de acordo com a Equação (6).

$$\text{Solubilidade em água} = \frac{M_1 - M_2}{M_1} \times 100 \quad (6)$$

Onde, a matéria solúvel é dada em porcentagem (%); M_1 é a massa inicial a seco da amostra (g); e M_2 é a massa seca final da amostra (g).

4.7.4 Índice de intumescimento

Para a medição do índice de intumescimento de acordo com Kumar, Ghoshal e Goyal (2021a) foram cortadas amostras de 2 cm × 2 cm dos filmes e secas a 105 °C por 24 horas e após foram pesadas (W_1). Os filmes secos foram imersos por 2 minutos em 10 mL de água destilada. Posteriormente, os filmes intumescidos foram retirados da água e o excesso de líquido foi retirado com

papel de filtro e pesado (W_2). A quantidade de água absorvida foi calculada usando a Equação (7).

$$\text{Índice de Intumescimento (\%)} = \frac{W_2 - W_1}{W_1} \times 100 \quad (7)$$

Onde W_1 (g) e W_2 (g) são o peso das amostras secas e intumescidas, respectivamente.

4.7.5 Permeabilidade ao vapor de água

A permeabilidade ao vapor de água foi realizada de acordo com o método E96/E96M com algumas modificações. Desta forma, em placas de Petri de 7,3 cm de diâmetro, foram adicionadas 10 g sílica gel dessecante (previamente seca) e lacradas com os filmes. Esse sistema foi colocado dentro de um dessecador contendo solução de cloreto de cálcio 10 % (m/v) (umidade relativa de 75 %). O dessecador foi mantido em uma incubadora BOD (TECNAL, modelo TE-371) a temperatura de 25 °C. Durante 24 horas foram realizadas 8 pesagens. Utilizou-se a Equação (8) para calcular a transmissão de vapor de água (TVA) e a Equação (9) para calcular a permeabilidade ao vapor de água (ASTM, 2010).

$$\text{TVA} = \frac{m}{t \times A} \quad (8)$$

$$\text{PVA} = \frac{(\text{TVA} \times e)}{p_s \times (\text{UR}_1 - \text{UR}_2)} \quad (9)$$

Onde, PVA = Permeabilidade ao vapor de água ($\text{g mm dia}^{-1} \text{ m}^{-2} \text{ kPa}^{-1}$); e = Espessura média do corpo de prova (m); p_s = Pressão de saturação de vapor a temperatura do ensaio (Pa); UR_1 = Umidade relativa dentro do dessecador (75 %); UR_2 = Umidade relativa dentro da placa (0 %); TVA = Taxa de transmissão ao vapor de água ($\text{g dia}^{-1} \text{ m}^{-2}$); m = Ganho de massa de água (g); t = tempo (h) e A = Área de permeação (m^2).

4.7.6 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A análise de microestrutura dos filmes desenvolvidos foi realizada em Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV) (marca TESCAN, modelo Vega 3, República Tcheca). Primeiramente, as amostras foram mantidas em dessecador contendo sílica gel e em seguida foram fraturadas. Na sequência, foram metalizadas (metalizadora Quorum SC7620) com Au/Pd com tempo de duração do plasma de 160s.

4.7.7 Análise de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)

A análise FTIR do filme foi feita usando o espectrofotômetro FTIR Perkin Elmer Frontier, usando o modo de reflectância total atenuada (cristal ATR – ZnSe). Os espectros foram obtidos na faixa de comprimento de onda de 4000–650 cm^{-1} resolução de 4 pontos por cm^{-1} e 4 espectros acumulações por segundo, usando diretamente a amostra de filme sólido e aquisição de dados com o software *spectrum*. Os espectros obtidos foram usados para determinar as interações da matriz do filme.

4.7.8 Avaliação de cor em diferentes condições de pH

Filmes com diâmetro de 35 mm foram inseridos em placas para cultura de células de 6 poços. Após foram adicionados 2 mL de solução tampão (pH 2,0 – 13,0) durante 40 minutos. As soluções tampão foram do tipo McIlvaine (acetato de sódio / ácido cítrico) com diferentes valores de pH (2,2, 4,0, 6,0 e 8,0) e solução de hidróxido de sódio 1 mol L^{-1} (NaOH) pH 13,0. Essa metodologia foi realizada de acordo com Peralta et al. (2019b).

4.7.9 Atividade antimicrobiana

A atividade antimicrobiana dos filmes foi avaliada de acordo com a metodologia descrita no item 4.6.5.

Os filmes foram cortados em formato de disco (diâmetro de 6,3 mm). Após serem cortados, foram esterilizados por radiação ultravioleta em capela de fluxo laminar vertical por 30 minutos (15 minutos cada lado). Posteriormente os discos

foram depositados nas placas contendo ágar Muller Hinton (bactérias) e ágar Sabouraud (fungos) com auxílio de uma pinça esterilizada em triplicata. Finalmente, as placas foram incubadas a 35 °C por 24 horas e observou-se a formação de halo de inibição.

4.7.10 Barreira de luz

A barreira à luz da região UV/Vis foi avaliada de acordo com Bajić et al. (2019) . As amostras de filmes foram cortadas em tiras retangulares e colocadas em uma cubeta. Nessas condições, foi medida a absorvância em comprimentos de onda entre 200 e 800 nm. As medições foram realizadas em triplicata, à temperatura ambiente e os resultados expressos em porcentagem de transmitância (% T) de acordo com a Equação (10), onde A = absorvância. Uma cubeta vazia foi usada como referência.

$$\% T = 10^{-A} \times 100 \quad (10)$$

4.7.11 Teste de liberação in vitro

Os ensaios de liberação in vitro foram realizados usando quatro simuladores de alimentos em condições aceleradas: água destilada, etanol 10% (v / v), ácido acético 3% e o isooctano PA.

Um método de Farias et al. (2021) foi utilizado para realização do teste. Amostras de 12 cm² de filme foram imersas em 20 mL de cada simulador e mantidos por 48 horas em uma incubadora BOD (TECNAL, modelo TE-371) a 40 °C. Os testes com isooctano foram realizados a 20 °C devido à sua volatilidade. Foi utilizado como controle uma amostra sem filme para cada simulador. Os ensaios foram realizados em triplicata.

Após 1, 2, 6, 12, 24 e 48 horas, 1 mL de cada ensaio de liberação foi coletado e inserido em um microtubo de centrifugação. Em seguida foram armazenados em freezer para posterior quantificação do teor de compostos fenólicos totais de acordo com a metodologia descrita no item 4.6.3.

4.7.12 Teste de aplicação do filme como embalagem em alimento

Para realizar o teste de monitoramento da sensibilidade do filme com as mudanças de pH no alimento foi utilizado o leite como modelo. O leite foi colocado em copo béquer de 100 mL e sua abertura foi coberta com o filme de amido incorporado com extrato de erva-mate e de bagaço de uva. O experimento foi realizado em BOD (TECNAL, modelo TE-371), onde foi instalada uma câmera e com o auxílio de um *software* controlou-se a aquisição de imagens em intervalos de 30 minutos. O ensaio teve uma temperatura programada de 35 °C e acompanhado por 7 dias.

Após a aquisição das imagens realizou-se o processamento de cada uma, utilizando da programação em linguagem *python*. Com a imagem em formato BMP foi realizado um processamento em escalas diferentes, como RGB e cinza, e posteriormente, as informações foram compiladas no Excel, para relacionar a variação de cor com o tempo. Com isso, foi comparado as mudanças de cor do filme com o objetivo de verificar a sua eficácia.

4.8 Análise estatística

Para a análise estatística utilizou-se o programa BioEstat 5.3, no qual foi realizada a análise de variância (ANOVA) e o teste de *Tukey* para comparação de médias, com nível de significância de 5%. Também foi aplicado o teste de *Dunnet*, que compara os valores obtidos das amostras com a média do controle do experimento, considerando o nível de significância de 5%.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização das amostras por granulometria

Após o processo de moagem, as amostras foram tamisadas para se obter as suas composições granulométricas (Tabela 1).

Tabela 1 - Composição granulométrica da erva-mate e resíduo do bagaço de uva, expressos em percentual, após processo de moagem e tamisação.

	Erva-mate	Bagaço de uva
Fundo	31 %	23 %
Retidos na peneira ABNT 50 (300 µm)	42 %	23 %
Retidos na peneira ABNT 40 (425 µm)	27 %	36 %
Retidos na peneira ABNT 30 (600 µm)	0 %	17 %
Retidos na peneira ABNT 20 (850 µm)	0 %	0 %

Fonte: Autora, 2022.

Os dados de granulometria obtidos apontaram que não houve presença de produto grosseiro (retido na peneira ABNT 20) após a moagem. As sementes da uva que não foram possíveis de moer representaram a quantidade de 17 % do bagaço de uva que ficaram retidos na peneira 30.

A maior quantidade de material foi constituída de pó fino, de modo que para a erva-mate, 42 % foram retidos na peneira ABNT 50 e 31 % no fundo. Para o bagaço de uva, 23 % ficaram retidos na peneira ABNT 50 e 23 % no fundo.

Desta forma, foi possível constatar que as partículas de erva-mate e bagaço de uva encontravam-se menores do que 425 µm e 600 µm, respectivamente. A redução da granulometria é interessante no processo de produção de extratos, pois resulta numa maior área de superfície do material, a qual fornece maior interação com o solvente podendo possibilitar uma maior extração de seus compostos (MAKANJUOLA, 2017).

5.2 Produção e caracterização dos extratos

As extrações foram realizadas com as amostras de erva-mate e bagaço de uva moídas em sonicador de ponteira ultrassônico.

5.2.1 Erva-mate

Ensaio preliminares para elaboração do extrato foram realizados, para definição do tempo, amplitude e equipamento a ser utilizado (sonicador de ponteira ultrassônico ou banho ultrassônico). As variáveis testadas estão apresentadas no APÊNDICE A.

Com o objetivo de selecionar as variáveis de extração com melhor potencial de compostos fenólicos, utilizando o sonicador de ponteira ultrassônico, foram realizados testes variando o tipo de solvente (água destilada, etanol/água 50 % (v/v) e etanol/água 70 % (v/v) e a razão erva-mate/solvente (2,0, 4,0, 6,0 e 8,0 g de erva-mate para cada 100 mL de solvente). O tempo de extração foi mantido em 10 minutos, a temperatura em 25 °C e a amplitude em 90 %. A Figura 7 apresenta as imagens dos extratos de erva-mate obtidos neste processo.

Figura 7 - Extratos aquosos de erva-mate (EM): EM1, EM2, EM3 e EM4; hidroalcoólicos 50% (v/v): EM5, EM6, EM7 e EM8 e hidroalcoólicos 70% (v/v): EM9, EM10, EM11 e EM12 obtidos por meio de sonicador de ponteira ultrassônico com tempo de 10 minutos, temperatura de 25 °C e amplitude em 90 %.



Fonte: Autora, 2022.

Os resultados para análise dos compostos fenólicos totais destes extratos são apresentados na Tabela 2 e mostram as variações nas amostras com base na variação da razão amostra/solvente e do tipo de solvente.

Tabela 2 – Resultados de compostos fenólicos totais (CFT) dos extratos da erva-mate (EM) obtidos por diferentes condições de extração.

	Razão amostra-solvente (g 100 mL⁻¹)	Solvente	CFT (mg EAG g⁻¹ amostra)
EM1	2,0	Água destilada	65,08 ± 2,17 ^d
EM2	4,0	Água destilada	55,08 ± 1,64 ^{ef}
EM3	6,0	Água destilada	66,14 ± 0,16 ^d
EM4	8,0	Água destilada	62,99 ± 0,74 ^d
EM5	2,0	Etanol 50%	88,90 ± 3,69 ^a
EM6	4,0	Etanol 50%	73,26 ± 3,77 ^{bc}
EM7	6,0	Etanol 50%	87,07 ± 3,25 ^a
EM8	8,0	Etanol 50%	61,49 ± 1,97 ^{de}
EM9	2,0	Etanol 70%	68,14 ± 3,31 ^{cd}
EM10	4,0	Etanol 70%	79,20 ± 1,89 ^b
EM11	6,0	Etanol 70%	63,60 ± 0,48 ^d
EM12	8,0	Etanol 70%	53,51 ± 0,94 ^f

Os resultados são expressos como média ± erro padrão da média; médias seguidas de letras iguais na mesma coluna não diferem ao nível de significância de 5% ($p \geq 0,05$) do teste de *Tukey*.

Fonte: Autora, 2022.

Observou-se que os extratos hidroalcolócos EM5 e EM7 apresentaram as maiores concentrações de CFT, $88,90 \pm 3,69$ e $87,07 \pm 3,25$, respectivamente, sem diferença significativa entre estas amostras ($p \geq 0,05$). Tendo em vista o exposto, a amostra EM5 foi escolhida para ser incorporada nos filmes, devido à menor razão amostra/solvente quando comparada a amostra EM7.

Após a definição das variáveis uma nova extração foi realizada para análise de CFT e atividade antioxidante pelo método FRAP e DPPH. Assim sendo, foi obtido o teor de CFT de $94,91 \pm 7,28$ mg EAG g amostra⁻¹, o qual foi maior em comparação com o estudo realizado por Bisognin et al. (2019), que obtiveram o valor de $16,60 \pm 1,74$ mg EAG g⁻¹. Bisognin et al. (2019) estudaram diferentes solventes (água destilada e soluções aquosas de etanol, acetona e metanol, acidificados ou não com ácido clorídrico) e tempos de extração em banho ultrassônico (15, 30 e 45 minutos) e concluíram que diferenças de solvente, tipo de extração, tempo utilizados durante a extração, assim como

aspectos intrínsecos ao cultivo e processamento de plantas podem causar diferenças na quantificação da atividade antioxidante.

O extrato de erva-mate apresentou FRAP de $2077,08 \pm 53,20 \mu\text{mol de Fe (II) g}^{-1}$ e o DPPH medido foi de $1052,22 \pm 27,40 \mu\text{mol ET g}^{-1}$. Bisognin et al. (2019) também realizaram análise em folhas de erva-mate utilizando etanol 70%, porém em banho ultrassônico, e encontraram valores de $0,46 \pm 0,08 \mu\text{mol L}^{-1}$ Trolox g^{-1} e $111,7 \pm 1,70 \mu\text{mol L}^{-1}$ Trolox g^{-1} de DPPH e FRAP, respectivamente, e concluíram que o tipo de solvente e o tempo utilizado na extração influenciaram nos resultados da atividade antioxidante.

Os resultados sugerem que o uso do extrato de erva-mate é uma possibilidade para a produção de embalagens ativas com atividade antioxidante.

5.2.2 Bagaço de uva

Os extratos utilizando bagaço de uva foram preparados com etanol 70%, no tempo padronizado de 10 minutos, amplitude de 77 % e 25 °C, conforme estudos anteriores. Foram utilizados para os testes uma razão bagaço de uva-água de 2 g 100 mL⁻¹ (U2) e 4 g 100 mL⁻¹ (U4). As imagens dos extratos estão apresentadas na Figura 8.

Figura 8 – Extratos de bagaço de uva preparados a 2 % (U2) e 4 % (U4) em etanol 70% (m/v) em sonificador de ponteira ultrassônico por 10 minutos, amplitude de 77 % e 25 °C.



Fonte: Autora, 2022.

Os resultados para análise dos compostos fenólicos totais, atividade antioxidante e antocianinas dos extratos de bagaço de uva são mostrados na Tabela 3.

Tabela 3 - Resultados de compostos fenólicos totais (CFT), atividade antioxidante e antocianinas dos extratos de bagaço de uva obtidos por diferentes quantidades de amostra (U2: 2 % e U4: 4 %) utilizadas na extração.

Variáveis	U2	U4
Razão amostra-solvente (g 100 mL⁻¹)	2,0	4,0
FRAP (μmol Eq Fe (II) g⁻¹ amostra)	579,33 ± 20,23 ^b	421,00 ± 1,00 ^a
DPPH (μmol ET g⁻¹ amostra)	243,75 ± 5,20 ^b	218,47 ± 3,15 ^a
CFT (mg EAG g⁻¹ amostra)	33,31 ± 2,07 ^b	27,44 ± 0,76 ^a
Antocianinas monoméricas (mg eq		
Cianidina-3-glicosídeo g⁻¹ amostra)	10,84 ± 0,13 ^b	9,82 ± 0,35 ^a
Densidade de Cor	3,11 ± 0,09 ^a	7,19 ± 0,22 ^b
Cor polimérica	2,69 ± 0,14 ^a	4,22 ± 0,16 ^b

Os resultados são expressos como média ± erro padrão da média; médias seguidas de letras iguais na mesma linha não diferem ao nível de significância de 5% ($p \geq 0,05$) do teste de *Tukey*.

Fonte: Autora, 2022.

Os valores de CFT foram de 27,44 ± 0,76 (extrato U4) e 33,31 ± 2,07 (extrato U2) mg EAG g amostra⁻¹, conforme Tabela 3. Estes resultados se assemelham aos encontrados por Demirkol e Tarakci (2018), no qual o bagaço de uva liofilizado apresentou um teor de compostos fenólicos totais de 34,959 mg EAG g⁻¹ e por Rockenbach et al. (2011) que apresentou um teor de 32,62 mg EAG g⁻¹ no extrato de bagaço de uva da variedade Isabel.

A atividade antioxidante dos diferentes extratos avaliada por FRAP foi expressa μmol de Fe (II) por grama de amostra. O maior valor foi de 579,33 μmol de Fe (II) g⁻¹ para a amostra U2 (Tabela 3). A atividade antioxidante medida pelo método DDPH foi de 243,75 e 218,47 μmol ET g amostra⁻¹ para U2 e U4, respectivamente (Tabela 3), com diferença significativa entre estas amostras. Em comparação, Rockenbach et al. (2011) relataram valores de atividade antioxidante superiores aos encontrados neste estudo. No entanto, o bagaço de uva pode apresentar variação na quantidade de metabólitos dependendo do cultivar, das condições de cultivo, clima e do estágio de maturação (MONTEIRO et al., 2021).

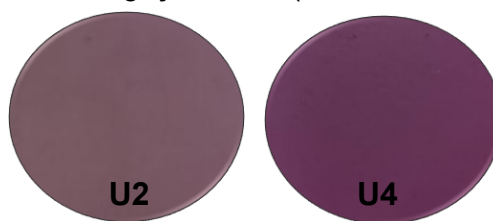
A Tabela 3 também fornece os teores totais de antocianinas monoméricas dos extratos avaliados pelo método diferencial de pH. Diferenças significativas foram observadas entre os extratos. Considerando o bagaço de uva como fonte

de extração de corantes naturais como as antocianinas, todos os extratos de uva avaliados neste estudo têm potencial corante.

Vale destacar que o método diferencial quantifica as antocianinas monoméricas e que os valores podem não estar relacionados com a intensidade de cor das amostras (WROLSTAD, 1976). Os pigmentos poliméricos vermelhos contribuem para a absorvância máxima das antocianinas. Para a determinação da cor foram utilizados os valores da densidade de cor e da cor polimérica.

Os resultados mostrados na Tabela 3 estão de acordo com as imagens de filmes a base de amido com 10% de extrato de erva-mate + 10% de extrato de bagaço de uva U2 e U4 respectivamente (Figura 9). Em função da cor, o extrato U4 foi utilizado para a produção dos filmes.

Figura 9 - Produção de filmes de amido com 10 % extrato de erva-mate mais 10% de extrato de bagaço de uva (U2: 2% e U4: 4 %).



Fonte: Autora, 2022.

5.2.3 Determinação dos sólidos solúveis e pH dos extratos

Após a definição das melhores condições de extração, realizou-se a determinação dos sólidos totais ($^{\circ}$ Brix) e pH dos extratos. Para o extrato de erva-mate o valor para os sólidos solúveis foi de $17,60 \pm 0,17$ $^{\circ}$ Brix e para o extrato do bagaço da uva a média foi de $20,50 \pm 0,20$ $^{\circ}$ Brix.

O pH do extrato de erva-mate foi de $6,00 \pm 0,06$. Já o extrato de bagaço de uva apresentou pH $4,61 \pm 0,01$ e verificou-se que o resultado foi próximo ao obtido por Romanini et al. (2021), que analisaram a composição do extrato de bagaço da casca de uva por ultrassom e o pH apresentado foi de 4,38. Esses valores mostram uma característica mais ácida para o extrato do bagaço de uva.

5.2.4 Atividade antimicrobiana dos extratos

Os resultados do teste de difusão em disco para avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos são mostrados na Tabela 4. Foi possível verificar o aparecimento de halo de inibição contra algumas das bactérias testadas para o extrato de erva-mate, enquanto o extrato de bagaço de uva não apresentou atividade. No caso dos fungos, os extratos não apresentaram atividade frente a *C. albicans* e *C. tropicalis* nas concentrações testadas. Isto é, os resultados mostraram que o extrato de bagaço de uva não demonstrou atividade antibacteriana e antifúngica. Todos os microrganismos foram sensíveis aos antibióticos padrão utilizados.

Nas análises realizadas com *B. cereus* e *E. coli*, os microrganismos apresentaram baixa sensibilidade frente ao extrato de erva-mate, com um pequeno halo de inibição ao redor do disco ($6,00 \pm 0,0$ mm). Costa, Racanicci e Santana (2017) analisaram a atividade antimicrobiana frente a cepas de *E. coli* e *Proteus mirabilis*, previamente isoladas da carne de frango, pelo teste de difusão em disco e concluíram que para se obter uma boa inibição frente aos patógenos analisados, devem ser utilizados cerca de 400 mg mL^{-1} de extrato de *Ilex paraguariensis*, sendo a concentração utilizada neste estudo (150 mg mL^{-1}), menor que a sugerida.

Para a *S. enterica* verificou-se que o extrato de erva-mate apresentou um pequeno halo ao redor do disco, de aproximadamente $7,3 \pm 0,15$ mm. Quanto ao *S. aureus*, exibiu halo de inibição de $17,87 \pm 1,17$ mm. Da mesma forma, De Biasi, Grazziotin e Hofmann Jr (2009) realizaram avaliação da atividade antimicrobiana de extratos hidroalcoólicos de erva-mate em concentrações menores (50 e 100 mg mL^{-1}), utilizando método de difusão do disco, no qual os extratos também mostraram atividade frente *S. aureus*.

Tabela 4 - Resultados das médias dos halos de inibição dos extratos de erva-mate e bagaço de uva frente a diferentes microrganismos.

Microrganismo	Formação do halo de inibição (mm)		
	Extrato de erva-mate	Extrato de bagaço de uva	Antibiótico
<i>E. coli</i>	6,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	18,33 ± 0,70
<i>B. cereus</i>	6,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	9,70 ± 0,89
<i>S. enterica</i>	7,03 ± 0,15	0,00 ± 0,00	26,97 ± 0,85
<i>S. aureus</i>	17,87 ± 1,17	0,00 ± 0,00	34,37 ± 0,57
<i>C. albicans</i>	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	18,23 ± 0,68
<i>C. tropicalis</i>	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	18,93 ± 0,50

Fonte: Autora, 2022.

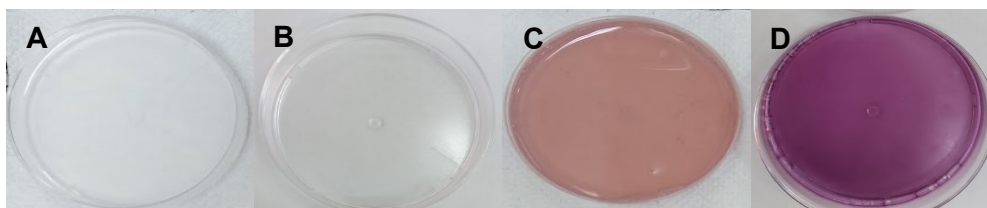
O extrato de erva-mate foi caracterizado com notáveis propriedades antimicrobianas, mostrando atividade contra algumas bactérias. Isto possibilita novas perspectivas para a utilização desse produto na área de alimentos. Com base nessas informações, que buscam incorporar extratos em filmes comestíveis, este estudo incentiva sua aplicação em embalagens de alimentos, visando inibir o crescimento microbiano, e, assim, garantir a qualidade, frescor e segurança dos alimentos (CHI et al., 2020).

5.3 Caracterização dos filmes

5.3.1 Aspecto visual

Pôde-se constatar observando a Figura 10 onde são apresentados os filmes à base de amido, sem e com adição do extrato de bagaço de uva mais o extrato de erva-mate, antes e após secagem, que o filme controle é incolor e a incorporação dos extratos proporcionou uma coloração em tom de roxo, resultante das antocianinas encontradas no extrato de bagaço de uva. Macroscopicamente os filmes apresentam características homogêneas, sem bolhas, são fáceis de manusear, não possuem partículas insolúveis e puderam ser retirados das placas sem rompê-los.

Figura 10 - Imagem dos filmes de amido sem adição dos extratos (controle) antes da secagem (A) e após secagem (B), filme de amido com extratos antes da secagem (C) e filme de amido com extratos após a secagem (D).



Fonte: Autora, 2022.

5.3.2 Propriedade físicas

Na Tabela 5 estão apresentados os resultados de espessura, teor de umidade, solubilidade em água, permeabilidade de vapor de água (PVA) e índice de intumescimento obtidos para os filmes elaborados.

Tabela 5 - Resultados da espessura, teor de umidade, solubilidade em água, permeabilidade de vapor de água (PVA) e índice de intumescimento dos filmes de amido incorporados ou não com extratos de erva-mate e bagaço de uva.

Parâmetros	Controle	Filme com extratos
Espessura (mm)	0,09 ± 0,003 ^a	0,10 ± 0,003 ^b
Teor de umidade (%)	7,88 ± 0,532 ^a	8,65 ± 0,319 ^a
Solubilidade em água (%)	32,15 ± 2,019 ^a	38,64 ± 3,258 ^b
PVA (g mm h⁻¹ m⁻² kPa⁻¹)	5,27x10 ⁻⁴ ± 3,85x10 ^{-5a}	7,19x10 ⁻⁴ ± 1,47x10 ^{-4a}
Índice de intumescimento (%)	239,41 ± 8,483 ^a	262,77 ± 13,038 ^a

Os resultados são expressos como média ± erro padrão da média; médias seguidas de letras iguais na mesma linha não diferem ao nível de significância de 5% ($p \geq 0,05$) do teste de *Dunnett*.

Fonte: Autora, 2022.

É importante conhecer e controlar a espessura do filme, pois influencia diretamente nas propriedades mecânicas e na transmitância de luz. Sua espessura interfere diretamente na penetração de oxigênio em alimentos embalados e pode acelerar a sua deterioração (KUREK et al., 2019c). Quando incorporado os extratos, a espessura do filme foi aumentada de 0,09 para 0,10 mm (Tabela 5). Possivelmente, a incorporação dos extratos alterou levemente os arranjos internos das cadeias de amido, resultando no aumento da

espessura do filme. Da mesma forma, Kumar, Ghoshal e Goyal (2021) com o desenvolvimento de filmes a partir de amido de feijão-traça modificado e extrato de folhas de manjericão (*Ocimum basilicum*) e Yun et al. (2019) com filme à base de amido de mandioca com a adição de extrato de bayberry (*Myrica rubra Sieb. et Zucc.*) relataram maiores espessuras dos filmes ativos, determinadas por micrômetro digital.

A espessura também tem interferência direta na determinação da permeabilidade ao vapor de água (PVA). Os resultados de PVA ficaram $5,42 \times 10^{-4}$ e $7,08 \times 10^{-4}$ g mm h⁻¹ m⁻² kPa⁻¹ para o filme controle e filme com extrato, respectivamente, sem diferença estatística entre os resultados. Segundo Ren et al. (2017) este parâmetro é importante para a verificação da barreira dos materiais que estão relacionados com a troca de umidade de dentro e fora das embalagens de alimentos. Os valores de PVA não foram influenciados pela incorporação dos extratos, todavia o aumento do valor da permeabilidade pode ser atribuído ao efeito dos extratos sobre as forças de coesão das moléculas de amido. Filmes que apresentam valor PVA entre 0,4 e 4,2 g mm m⁻² h⁻¹ kPa⁻¹ são considerados ruins, enquanto são considerados bons aqueles abaixo de 4×10^{-3} g mm m⁻² h⁻¹ kPa⁻¹. Neste trabalho, os filmes de amido são classificados como tendo uma boa barreira ao vapor de água.

O teor de umidade está associado à capacidade dos filmes em absorver a umidade do ambiente, sendo assim, um parâmetro essencial para embalagens de alimentos. A partir dos resultados obtidos (Tabela 5), observou-se que o teor de umidade do filme ($8,65 \pm 0,32$ %) e do controle ($7,88 \pm 0,53$ %) apresentaram valores semelhantes, ou seja, a adição dos extratos não afetou significativamente a higroscopicidade dos filmes. Assim como o teor de umidade, a solubilidade em água também é uma característica muito importante quando se trata de filmes para embalagens.

A solubilidade exhibe a capacidade de resistência à água do filme. Materiais com uma alta solubilidade não são adequados para embalagem de alimentos (KUMAR; GHOSHAL; GOYAL, 2021a). Considerando a Tabela 5 é possível constatar que houve um aumento de 16,8 % neste parâmetro em função da adição dos extratos, com diferença significativa com o controle. O aumento da solubilidade de filmes foi relatado anteriormente na literatura por Prietto et al. (2017) que atribuíram esta elevação à interação entre o amido e as antocianinas,

causando um aumento nas zonas hidrofílicas disponíveis para absorção de água, assim como ocorre no índice de intumescimento.

O índice de intumescimento está relacionado ao grau de hidratação dos biofilmes, o que é um desafio fundamental para substituir os plásticos tradicionais por materiais biodegradáveis para aplicações de embalagens. Considerando este aspecto, houve elevação no índice de intumescimento do filme com a adição dos extratos (Tabela 5 - Resultados da espessura, teor de umidade, solubilidade em água, permeabilidade de vapor de água (PVA) e índice de intumescimento dos filmes de amido incorporados ou não com extratos de erva-mate e bagaço de uva.), porém esse aumento não foi significativo. Utilizando o mesmo procedimento, Cheng et al. (2022) utilizaram o tempo de 30 minutos e também relataram altos valores em filmes de amido de mandioca. Este fato pode ser justificado, pois o amido de mandioca possui um alto índice de intumescimento e é capaz de absorver até 120 % de água a 100 °C (WANG et al., 2022).

5.3.3 Propriedade mecânicas

As propriedades mecânicas desempenham um papel essencial na aplicabilidade do filme. Logo, os resultados da tensão máxima de ruptura (MPa), alongamento na ruptura (%) e módulo de elasticidade (MPa) podem ser vistos na Tabela 6.

Tabela 6 - Propriedades mecânicas dos filmes de amido incorporados ou não com extratos de erva-mate e bagaço de uva.

Parâmetros	Controle	Filme com extratos
Tensão máxima de ruptura (Mpa)	18,35 ± 0,208 ^b	11,66 ± 2,187 ^a
Alongamento na ruptura (%)	44,18 ± 23,081 ^a	47,03 ± 25,072 ^a
Módulo de elasticidade (MPa)	4,97 ± 0,012 ^b	3,28 ± 0,294 ^a

Os resultados são expressos como média ± erro padrão da média; médias seguidas de letras iguais na mesma linha não diferem ao nível de significância de 5% ($p \geq 0,05$) do teste de *Dunnnett*.

Fonte: Autora, 2022.

Em comparação com as amostras do filme controle, a incorporação dos extratos promoveu aumento não significativo do alongamento na ruptura (de 44,18 ± 23,08 para 47,03 ± 25,07), no entanto, houve uma diminuição

significativa nos valores da tensão máxima de ruptura (de $18,35 \pm 0,21$ para $11,66 \pm 2,16$) e no módulo de elasticidade (de $4,97 \pm 0,01$ para $3,28 \pm 0,29$). Esses resultados permitiram verificar que o filme com extratos, possui propriedades mecânicas favoráveis espelhadas na menor rigidez, levando em consideração o maior módulo de elasticidade do filme controle (KNAPP et al., 2019). Neste sentido, o filme controle pode ser considerado o mais frágil devido ao valor maior do módulo de elasticidade do filme controle em comparação com o filme com extrato. O efeito dos plastificantes nas propriedades mecânicas dos filmes de polímeros também está relacionado ao volume de suas estruturas, o que favorece a mobilidade dos polímeros e assim diminui as tensões e conseqüentemente reduz o módulo de elasticidade (KNAPP et al., 2019).

Do mesmo modo, a adição de extratos naturais de plantas diminuiu a tensão máxima de ruptura do filme, uma vez que podem diminuir as interações moleculares entre os componentes dos filmes diminuindo as forças de interação amido-amido, conforme também evidenciado por Han e Song (2021) e Luchese, Pavoni e Tessaro (2021).

Por outro lado, o alongamento na ruptura aumentou após a adição dos extratos, assim como no estudo realizado por Han e Song (2021), que pode ser explicado pelo papel dos extratos terem efeito plastificantes e aumentarem a flexibilidade do filme, desta maneira é considerado mais elásticos que o filme controle. Esses resultados são consistentes com os dados relatados por Rawdkuen et al. (2020) que descobriram que os extratos ricos em antocianinas da flor de ervilha borboleta reduziram a resistência à tração e aumentaram o alongamento na ruptura do filme indicador de pH à base de gelatina devido ao seu efeito plastificante, ou seja, a adição deste extrato melhorou as características do filme.

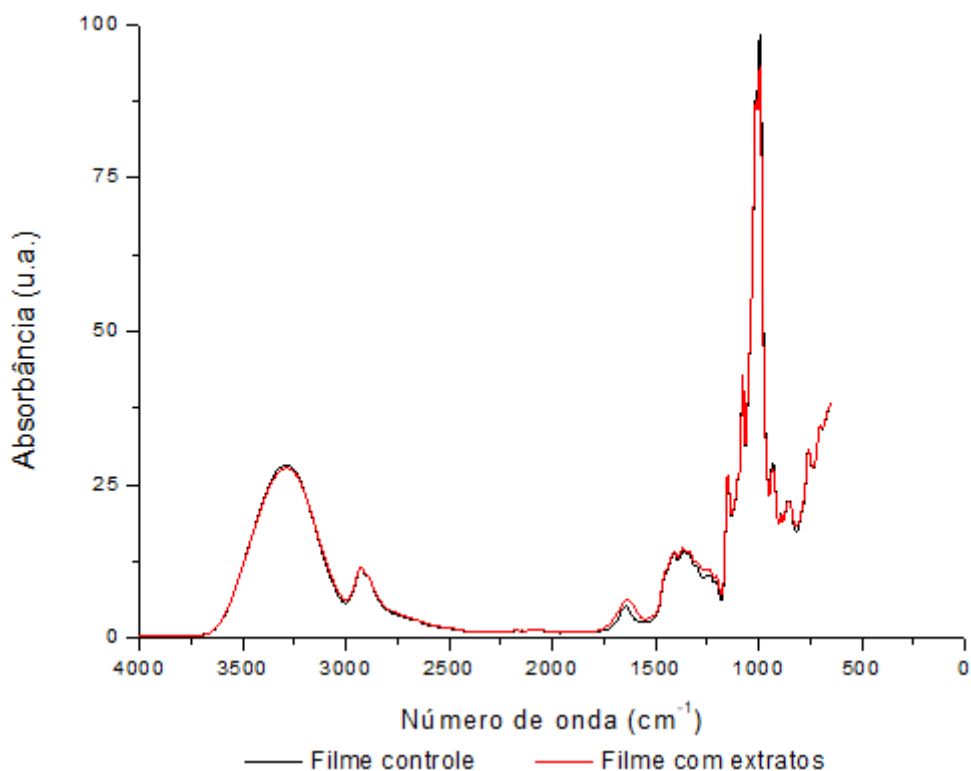
5.3.4 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

A análise de FTIR foi realizada para analisar a composição química e avaliar o efeito da incorporação dos extratos no filme. A Figura 11 apresenta os espectros de FTIR do filme controle e do filme com a adição dos extratos. O estudo mostra que os espectros dos filmes são muito semelhantes, isto significa que após a adição dos extratos não apareceram novos picos nos filmes. Há

exceção de algumas pequenas mudanças na intensidade dos picos, provavelmente devido às interações físicas (interações de *van der Waals* e ligações de H) entre os grupos fenólicos e corante no polímero (ROY; KIM; RHIM, 2021).

Pode-se observar na Figura 11 uma banda de absorção larga entre 3700-3000 cm^{-1} que corresponde a banda de alongamento OH (YONG; LIU, 2020) com um pico máximo em 3300 cm^{-1} . A absorção em 2931 cm^{-1} foi relacionada a ligação CH (HAN; SONG, 2021). É possível observar um pico de absorção em 1638 cm^{-1} que é característico da hidratação do amido (KUMAR; GHOSHAL; GOYAL, 2021b). Geralmente entre 1200–950 cm^{-1} é a região específica do polissacarídeo e as características do polissacarídeo são mostradas de acordo com a posição e intensidade das bandas (LONG et al., 2021), fato que pode ser visto onde o espectro exibe um pico intenso em 997 cm^{-1} . Esses resultados evidenciam que ao adicionar os extratos as propriedades químicas do filme não foram afetadas.

Figura 11 - Espectro na região do infravermelho do filme de amido controle e do filme de amido com extratos de erva-mate e bagaço de uva.

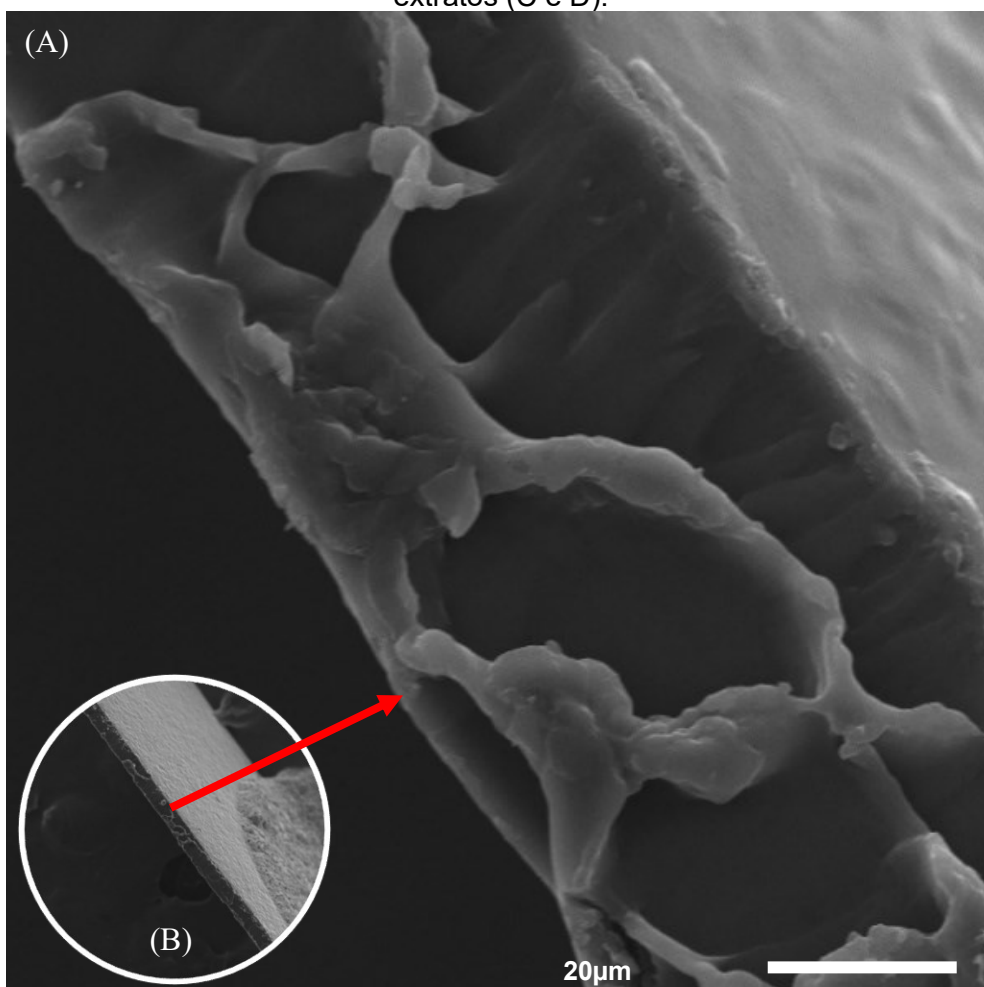


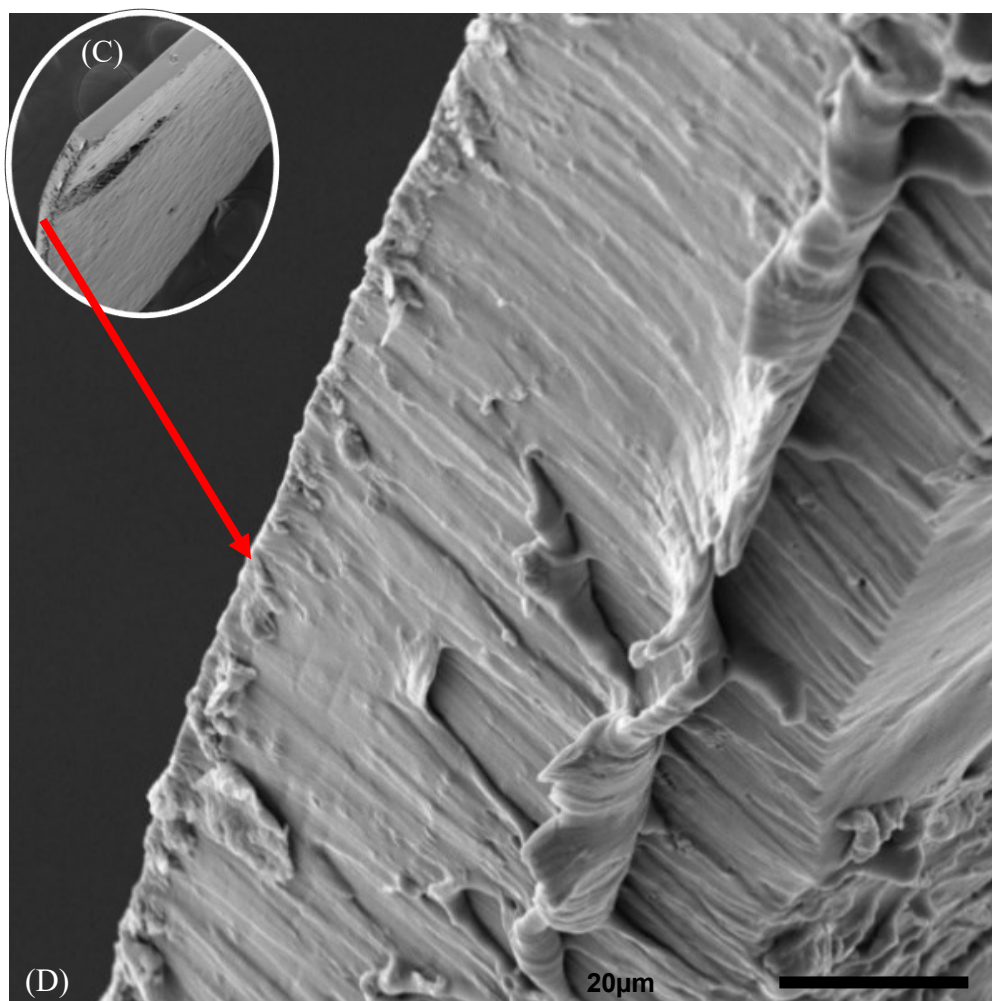
Fonte: Autora, 2022.

5.3.5 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

As micrografias eletrônicas de varredura (MEV) da região da fratura (seções transversais) do filme controle (Figura 12A e 12B) e do filme com extratos (Figura 12C e 12D) mostraram que o baixo teor de antocianinas tem pouco impacto na microestrutura dos filmes (MA & WANG, 2016). Devido a isto, a rugosidade da morfologia da superfície do filme não foi alterada.

Figura 12 - Micrografias de seção transversal do filme controle (A e B) e do filme com extratos (C e D).





Legenda: (A) filme controle com ampliação de 200µm e intensidade do feixe de 6.00; (B) filme controle com ampliação de 20µm e intensidade do feixe de 6.00; (C) filme com extratos com ampliação de 200µm e intensidade do feixe de 9.00; (D) filme com extratos com ampliação de 20µm e intensidade do feixe de 8.00.

Fonte: Autora, 2022.

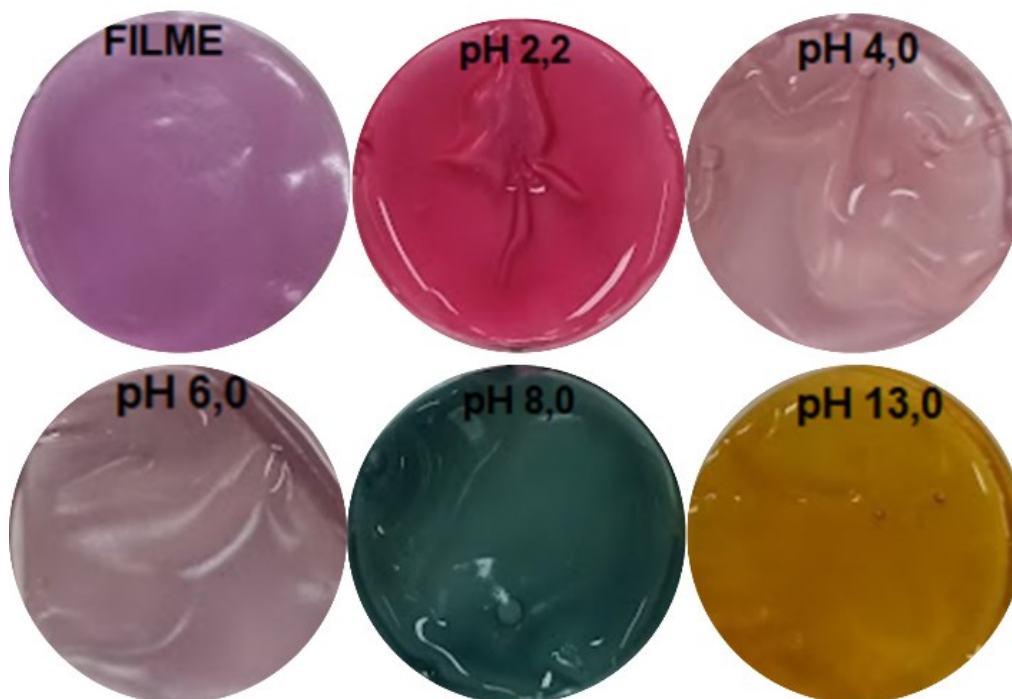
5.3.6 Avaliação da cor em diferentes condições de pH

Os filmes de amido com e sem extratos apresentaram valores de pH de $4,24 \pm 0,02$ e $6,22 \pm 0,06$, respectivamente. Como resultado, o pH do filme com extrato, identificado como “FILME” na Figura 13 sem a solução tampão é mais ácido ($\text{pH} < 5$) do que o filme controle (com valor de pH de 6,22).

Os filmes ativos têm pigmentos naturais coloridos que são sensíveis ao pH e mudam os parâmetros de cor de acordo com a sua variação. Os parâmetros de cor dos filmes a base de amido contendo extrato de bagaço de uva e extrato de erva-mate foram medidos após imersão em solução tampão em diferentes

valores de pH (2,2, 4,0, 6,0, 8,0 e 13,0). A variação de cor é mostrada na Figura 13.

Figura 13 - Variação da cor do filme à base de amido contendo extrato de bagaço de uva e erva-mate (FILME) submetidos a diferentes condições de pH (2,2, 4,0, 6,0, 8,0 e 13,0).



Fonte: Autora, 2022.

A mudança de cor foi observada em todos os pH estudados e está associada às antocianinas presentes no bagaço da uva. Esta variação foi visível e está correlacionada com o pH da solução. A mudança de cor confirma que o filme é uma boa opção para ser utilizado como embalagem ativa com indicador natural de pH. A variação de cor foi significativa o suficiente para que o consumidor possa ver facilmente a mudança de cor e obter informações sobre a condição, como por exemplo, crescimento microbiano que causa acidificação ou ação de enzimas que promovem a alcalinização de produtos alimentícios.

Os filmes mostraram diferentes tons de cor rosa na faixa de pH 2,2–6,0, tom esverdeado em pH 8,0 e a cor amarela foi observada em pH 13,0. A cor rosa pode ser atribuída pelo cátion flavílio que ocorre quando as antocianinas estão em meio ácido, o tom esverdeado pode ser devido à diminuição da concentração do cátion flavílio que foi hidratado formando uma pseudobase de carbinol incolor

e a cor amarela é devido à abertura do anel central da pirana, formando chalcona, um composto com amarelo claro (PERALTA et al., 2019a).

Estudos realizados por Koshy et al. (2021) e Liu et al. (2021) que avaliaram filmes inteligentes incorporando antocianina extraída da flor de *clitoria ternatea* e antocianinas extraídas da batata roxa ou rosela, respectivamente, mostraram resultados semelhantes, onde a mudança de cor foi afetada pela presença de antocianinas na formulação, sugerindo que o filme pode ser usado como indicador de cor responsivo ao pH.

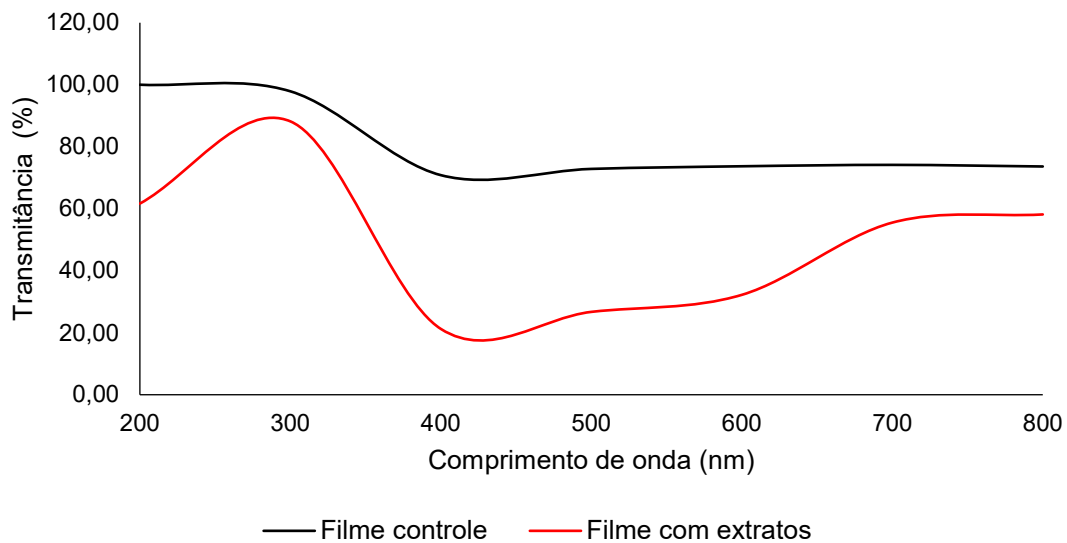
5.3.7 Atividade antimicrobiana dos filmes

Para verificar a atividade antimicrobiana dos filmes produzidos, estes foram testados utilizando a metodologia de discos difusão. Os resultados são mostrados no APÊNDICE C. Não houve aparecimento de halo de inibição, com exceção dos controles com antibióticos, possivelmente devido à baixa concentração de compostos antibacterianos presentes nos filmes. Sendo assim, assume-se que os filmes não apresentam atividade aos agentes antimicrobianos testados e mais estudos são essenciais para melhorar a atividade antimicrobiana dos filmes à base de amido com incorporação dos extratos.

5.3.8 Barreira de luz

A capacidade do material de embalagem de atuar como barreira de luz é interessante no contexto da capacidade de exposição à luz sem alterações significativas nas propriedades de compostos alimentares específicos. Portanto, as propriedades dos filmes à base de amido foram estudadas em termos da transmitância de luz na região de luz UV-vis e os resultados são apresentados na Figura 14.

Figura 14 - Propriedades de barreira à luz ultravioleta e visível (comprimentos de onda na faixa de 200–800 nm em função da transmitância) do filme à base de amido controle e contendo extrato de bagaço de uva e erva-mate.



Fonte: Autora, 2022.

Altos valores de transmitância indicam que as amostras são mais transparentes, o que pode ser observado nos valores de transmitância do filme controle. Assim, pode-se afirmar que o filme controle é transparente.

A incorporação dos extratos nos filmes diminuiu os valores de transmitância na região do ultravioleta (UV) e luz visível quando comparados com os filmes controle (sem adição de extrato), ou seja, a adição dos extratos aumentou a barreira UV / Visível dos filmes, o que ajuda a preservar o alimento. Resultados de barreira semelhantes foram relatados por Zhang et al. (2020), que encontraram uma diminuição nos valores de transmitância após a adição dos extratos de batata-doce roxa e extratos de repolho roxo nos filmes.

No contexto de que a transparência dos filmes diminuiu com a adição dos extratos, o filme desenvolvido pode ser usado como embalagem de produtos alimentícios que supostamente se degradam devido aos raios UV e à luz visível.

5.3.9 Teste de liberação *in vitro*

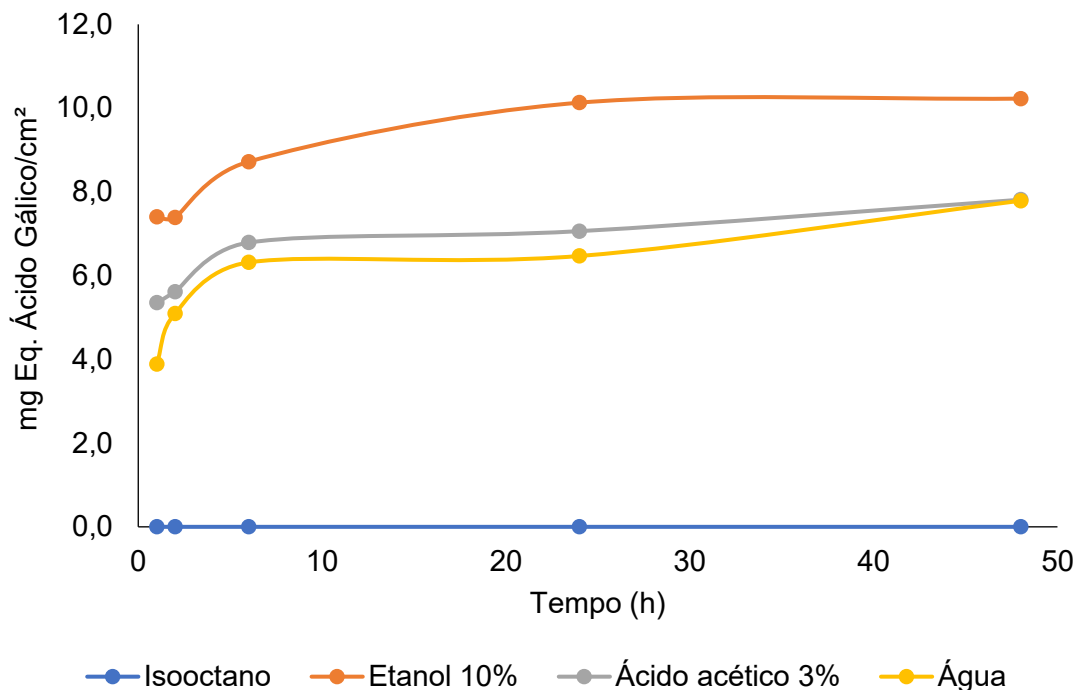
Para investigar os mecanismos que interferem na liberação de CFT, foram realizados ensaios de liberação *in vitro*. A liberação de um composto específico ou mistura de compostos contidos em uma matriz polimérica para uma fase líquida é um processo complexo. A solubilidade do composto no meio de

liberação, sua difusão através da matriz polimérica e os processos de dilatação e relaxamento da matriz interferem na liberação do composto (FARIAS et al., 2021).

O caráter hidrofílico dos simuladores água, etanol 10% e ácido acético 3% pode ser responsável pela maior liberação de CFT, conforme é mostrado na Figura 15. Estes três simuladores apresentaram uma liberação crescente de CFT. O simulador com etanol 10%, ao final das 48 horas, apresentou a maior liberação de compostos fenólicos totais (10,2 mg EAG cm⁻²). Esse comportamento foi observado por Wolff, Silveira e Lazzarotto (2019), quando avaliaram os processos de extração de compostos fenólicos da erva-mate e indicaram que as soluções de etanol/água, promovem maior eficiência de extração de compostos fenólicos totais. Por outro lado, este comportamento não foi observado no estudo de liberação de CFT utilizando isooctano, que tem característica apolar, ao longo das 48 horas. Solventes apolares não são bons extratores de CFT, uma vez que a extração de polifenóis em solvente polar é mais eficiente em razão da sua alta capacidade de solvatação entre os sítios polares dos compostos antioxidantes e o solvente polar (THOURI et al., 2017).

Este resultado indica que o filme de amido desenvolvido com extratos de erva-mate e bagaço de uva pode constituir um sistema de liberação de CFT promissor para alimentos alcoólicos, segundo a Comissão da União Europeia, e para alimentos aquosos, ácidos e alcoólicos (até 15%), de acordo com o órgão governamental americano *Food and Drug Administration* (JAMSHIDIAN; TEHRANY; DESOBRY, 2012). Diante disso, os resultados obtidos confirmaram o potencial do filme e permitiram observar a liberação gradual dos compostos e com isso, as matérias-primas estudadas se mostraram excelentes alternativas para aplicação em embalagens ativas capazes de controlar as alterações de qualidade estendendo a vida útil dos alimentos.

Figura 15 - Liberação de compostos fenólicos totais presentes no filme em sistemas com os diferentes simuladores de alimentos.

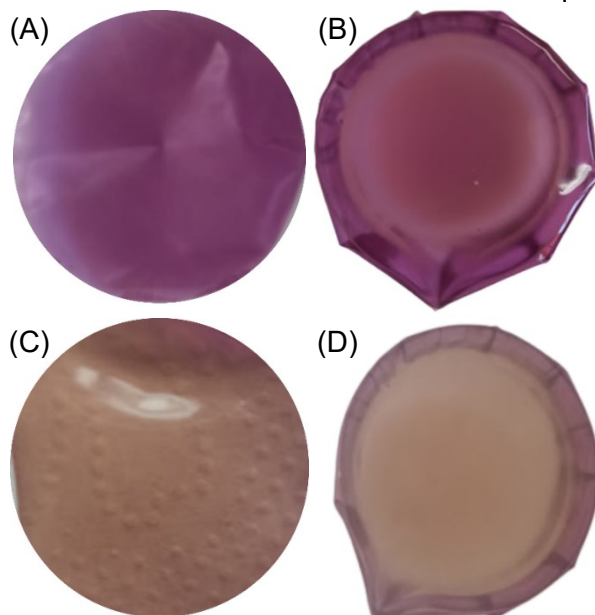


Fonte: Autora, 2022.

5.3.10 Teste de aplicação do filme como indicador de pH em embalagem

Imagens do teste de aplicação do filme como indicador de pH na deterioração do leite são mostradas na Figura 16. Após vários dias, em razão da contaminação microbiana o leite começa a deteriorar-se à temperatura ambiente e, conseqüentemente, o pH diminui (MA; WANG, 2016). O pH do leite de vaca fresco varia de 6,4 a 6,8, entretanto com o decorrer do tempo, o pH diminui, isto significa que à medida que o leite azeda, torna-se mais ácido e, portanto, o pH fica mais baixo. O filme no instante inicial (tempo = 0 dias) exibiu uma cor roxa (Figura 16A) e após 7 dias, o filme tornou-se ligeiramente rosa claro (Figura 16B), claramente indicando que o leite havia deteriorado. Assim, este filme pode monitorar a mudança de pH e ser usado como um filme inteligente em embalagens.

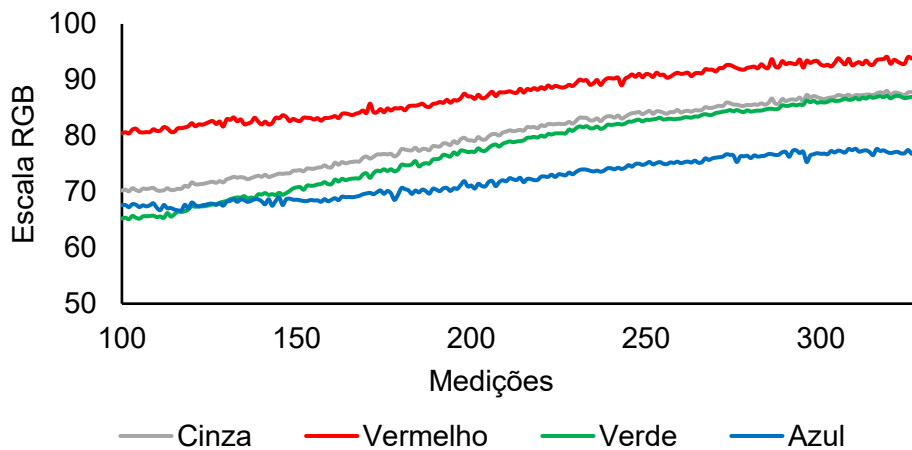
Figura 16 - Aplicação de filme como indicador de variação de pH em leite mantido durante 7 dias em temperatura de 35 °C. (A) e (B) representam o filme no tempo = 0 dias e (C) e (D) filme no tempo = 7 dias. (A) e (C) estão em fundo branco e (B) e (D) estão encobrendo a amostra de leite no béquer.



Fonte: Autora, 2023.

A Figura 17 mostra que a diferença de cor depende do período de armazenamento. Isso indica que a cor do indicador de frescor muda conforme resultado de mudanças na qualidade do leite de vaca. No entanto, mais estudos sobre a análise da relação entre as mudanças na qualidade dos produtos embalados e as mudanças na cor para determinação da vida de prateleira de produtos embalados devem ser realizados.

Figura 17 - Diferenças de cor RGB (vermelho, verde e azul) do filme com extratos durante o armazenamento de leite a 35 °C.



Fonte: Autora, 2023.

6 CONCLUSÃO

Neste estudo, um sistema de empacotamento inteligente foi obtido pela incorporação de extrato de erva-mate mais extrato de bagaço de uva à um filme a base amido. O filme inteligente de amido apresentou variação de cor em função da faixa de pH, indicando ser possível verificar na embalagem de produtos alimentícios as alterações no pH à medida que se deterioram.

A incorporação dos extratos aumentou significativamente a espessura e o teor de umidade em comparação ao filme controle sem adição dos extratos. As propriedades mecânicas foram melhoradas pela adição dos produtos naturais. O filme com extratos respondeu bem ao processo de deterioração do leite, fornecendo uma resposta de cor evidente à deterioração.

Embora os resultados sejam preliminares e sejam necessários mais estudos, inclusive com outros alimentos, é possível sugerir que o filme pode ser uma alternativa para informar os consumidores sobre a segurança e a qualidade das condições do produto embalado com base na variação do pH.

REFERÊNCIAS

ALPASLAN, D. Use of colorimetric hydrogel as an indicator for food packaging applications. **Bulletin of Materials Science**, v. 42, n. 5, p. 1–11, 2019.

AMIN, U. et al. Biodegradable active, intelligent, and smart packaging materials for food applications. **Food Packaging and Shelf Life**, Amsterdam, v. 33, 2022.

ARRUDA, M. R. E. et al. Avaliação de extratos de antocianinas como indicadores de pH obtidos por diferentes métodos. **Brazilian Journal of Food Research**, Campo Mourão, v. 10, n. 3, p. 87, 2019.

BAJIĆ, M. et al. Natural plant extracts as active components in chitosan-based films: A comparative study. **Food Packaging and Shelf Life**, Amsterdam, v. 21, p. 100365, 2019.

BISOGNIN, D. A. et al. Contents of total phenolics and flavonoids in and antioxidant activity of *Ilex paraguariensis* leaves. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, Brasília, v. 54, 2019.

BOROSKI, M., VISENTAINER, J. V., COTTICA, S. M., MORAIS, D. R. **Antioxidantes: princípios e métodos analíticos**. Curitiba: Appris, 2015.

BRAGA, L. R.; SILVA, F. M. Embalagens ativas: uma nova abordagem para embalagens alimentícias. **Brazilian Journal of Food Research**, Campo Mourão, v. 8, n. 4, p. 170, 2017.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução **RDC nº 277, de 22 de setembro de 2005**. Regulamento Técnico para Café, Cevada, Chá, Erva-Mate e Produtos Solúveis. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 23 ago. 2005.

BRUNO ROMANINI, E. et al. Ultrasound assisted extraction of bioactive compounds from BRS Violet grape pomace followed by alginate-Ca²⁺ encapsulation. **Food Chemistry**, Amsterdam, v. 338, p. 128101, 2021.

CALDAS, T. W. et al. Phenolic compounds recovery from grape skin using conventional and non-conventional extraction methods. **Industrial Crops and Products**, Amsterdam, v. 111, p. 86–91, 2018.

CEBALLOS, R. L. et al. Effect of yerba mate extract on the performance of starch films obtained by extrusion and compression molding as active and smart packaging. **Carbohydrate Polymers**, Barking, v. 244, p. 116495, 2020.

CHENG, M. et al. Effect of dual-modified cassava starches on intelligent packaging films containing red cabbage extracts. **Food Hydrocolloids**, New York, v. 124, p. 107225, 2022.

CHI, W. et al. Developing a highly pH-sensitive κ-carrageenan-based intelligent

film incorporating grape skin powder via a cleaner process. **Journal of Cleaner Production**, Amsterdam, v. 244, p. 118862, 2020.

LEITES, L.C.; FRICK, P.J.M.; CRISTINA, T.I. Influence of the incorporation form of waste from the production of orange juice in the properties of cassava starch-based films. **Food Hydrocolloids**, New York, v. 117, p. 106730, 2021.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing**; Fifteenth Informational Supplement. Wayne, PA, v. 25.

COSTA, D. E. M.; RACANICCI, A. M. C.; SANTANA, Â. P. Atividade antimicrobiana da erva-mate (*Ilex paraguariensis*) contra microrganismos isolados da carne de frango. **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, v. 18, n. 0, p. 1–7, 2017.

DE BIASI, B.; GRAZZIOTIN, N. A.; HOFMANN JR, A. E. Atividade antimicrobiana dos extratos de folhas e ramos da *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil., Aquifoliaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Curitiba, v. 19, n. 2b, p. 582–585, 2009.

DE OLIVEIRA, J. P. et al. Characterization of aerogels as bioactive delivery vehicles produced through the valorization of yerba-mate (*Ilex paraguariensis*). **Food Hydrocolloids**, New York, v. 107, p. 105931, 2020.

DEMIRKOL, M.; TARAKCI, Z. Effect of grape (*Vitis labrusca* L.) pomace dried by different methods on physicochemical, microbiological and bioactive properties of yoghurt. **LWT - Food Science and Technology**, London, v. 97, p. 770–777, 2018.

EMBRAPA. Sistema de Produção de Erva-mate. Disponível em: <https://www.embrapa.br/florestas/busca-de-solucoes-tecnologicas/-/produtoservico/2093/sistema-de-producao-de-erva-mate>.

FACCIN, C.; VIEIRA, L. R.; FREITAS, E. M. DE. Application of Yerba Mate (*Ilex Paraguariensis* A.St.-Hil.) in Food - a Review. **Caderno pedagógico**, Lajeado, v. 12, n. 3, p. 200–209, 2015.

FARIAS, N. S. DE et al. Alginate based antioxidant films with yerba mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.): Characterization and kinetics of phenolic compounds release. **Food Packaging and Shelf Life**, Amsterdam, v. 28, 2021.

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

GOLASZ, L. B.; SILVA, J. DA; BOTELHO DA SILVA, S. Film with anthocyanins as an indicator of chilled pork deterioration Filme com antocianinas como indicador da deterioração de carne suína refrigerada. **Ciênc. Tecnol. Aliment**, Campinas, v. 2012, p. 155–162, 2013.

GOULA, A. M.; THYMIATIS, K.; KADERIDES, K. Valorization of grape pomace: Drying behavior and ultrasound extraction of phenolics. **Food and Bioproducts Processing**, Rugby, v. 100, p. 132–144, 2016.

HAN, H. S.; SONG, K. BIN. Noni (*Morinda citrifolia*) fruit polysaccharide films containing blueberry (*Vaccinium corymbosum*) leaf extract as an antioxidant packaging material. **Food Hydrocolloids**, New York, v. 112, p. 106372, 2021.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz. **Métodos Físico-químicos para Análises de Alimentos**. 4. ed. São Paulo: IAL, 2008.

JALLOUL, A. BEN et al. Variations in phenolic composition and antioxidant activities of *Scabiosa maritima* (*Scabiosa atropurpurea* sub. *maritima* L.) crude extracts and fractions according to growth stage and plant part. **South African Journal of Botany**, Pretoria, v. 146, p. 703–714, 2022.

JAMRÓZ, E. et al. Intelligent and active composite films based on furcellaran: Structural characterization, antioxidant and antimicrobial activities. **Food Packaging and Shelf Life**, Amsterdam, v. 22, p. 100405, 2019.

JAMSHIDIAN, M.; TEHRANY, E. A.; DESOBRY, S. Release of synthetic phenolic antioxidants from extruded poly lactic acid (PLA) film. **Food Control**, Kidlington, v. 28, n. 2, p. 445–455, 2012.

KAMILOGLU, S. et al. Anthocyanin absorption and metabolism by human intestinal Caco-2 cells—A review. **International Journal of Molecular Sciences**, Basel, v. 16, n. 9, p. 21555–21574, 2015.

KLEIN, E. J. et al. Avaliação do processo de obtenção de extratos de folhas de uvaia (*Eugenia Pyriformis* c.) utilizando extração assistida por ultrassom. **Blucher Chemical Engineering Proceedings**, Campinas, v. 1, n. 3, p. 846–851, 2015.

KNAPP, M. A. et al. Yerba mate extract in active starch films: Mechanical and antioxidant properties. **Journal of Food Processing and Preservation**, Westport, v. 43, n. 3, p. 1–12, 2019.

KOSHY, R. R. et al. Preparation of pH sensitive film based on starch/carbon nano dots incorporating anthocyanin for monitoring spoilage of pork. **Food Control**, Kidlington, v. 126, 2021.

KOTILOĞLU, D.; ACET, T.; ÖZCAN, K. Phytochemical profile and biological activity of a therapeutic orchid from Anatolia: *Dactylorhiza romana* subsp. *georgica*. **Journal of Food Measurement and Characterization**, v. 14, n. 6, p. 3310–3318, 2020.

KUMAR, R.; GHOSHAL, G.; GOYAL, M. Effect of basil leaves extract on modified moth bean starch active film for eggplant surface coating. **LWT - Food**

Science and Technology, London, v. 145, p. 111380, 2021.

KUREK, M. et al. Comparison of protective supports and antioxidative capacity of two bio-based films with revalorised fruit pomaces extracted from blueberry and red grape skin. **Food Packaging and Shelf Life**, Amsterdam, v. 20, p. 100315, 2019.

LARA, E.; JUNIOR, C.; MORAND, C. Interest of mate (*Ilex paraguariensis* A . St.-Hil.) as a new natural functional food to preserve human cardiovascular health – A review. **Journal of Functional Foods**, Amsterdam, v. 21, p. 440–454, 2016.

LIU, J. et al. pH-sensitive and antibacterial films developed by incorporating anthocyanins extracted from purple potato or roselle into chitosan/polyvinyl alcohol/nano-ZnO matrix: Comparative study. **International Journal of Biological Macromolecules**, Amsterdam, v. 178, p. 104–112, 2021.

LONG, X. et al. Insights on preparation, structure and activities of *Gracilaria lemaneiformis* polysaccharide. **Food Chemistry: X**, Amsterdam, v. 12, n. 231, 2021.

MA, Q.; WANG, L. Preparation of a visual pH-sensing film based on tara gum incorporating cellulose and extracts from grape skins. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, Lausanne, v. 235, p. 401–407, 2016.

MALI, S.; GROSSMANN, M. V. E.; YAMASHITA, F. Filmes de amido: produção, propriedades e potencial de utilização. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 31, n. 1, p. 137, 2010.

MEDINA JARAMILLO, C. et al. Biodegradability and plasticizing effect of yerba mate extract on cassava starch edible films. **Carbohydrate Polymers**, Barking, v. 151, p. 150–159, 2016.

MIGLIORANZA, B. M. G. et al. Biodegradable film for raisins packaging application: Evaluation of physico-chemical characteristics and antioxidant potential. **Food Chemistry**, Amsterdam, v. 365, p. 130538, 2021.

MONTEIRO, G. C. et al. Bioactive compounds and antioxidant capacity of grape pomace flours. **LWT - Food Science and Technology**, London, v. 135, 2021.

PERALTA, J. et al. Aqueous hibiscus extract as a potential natural pH indicator incorporated in natural polymeric films. **Food Packaging and Shelf Life**, Amsterdam, v. 19, p. 47–55, 2019.

PRIETTO, L. et al. pH-sensitive films containing anthocyanins extracted from black bean seed coat and red cabbage. **LWT - Food Science and Technology**, London, v. 80, p. 492–500, 2017.

RASPE, D. T. et al. Ultrasound-assisted extraction of compounds from *Stevia*

leaf pretreated with ethanol. **Industrial Crops and Products**, Amsterdam, v. 172, p. 1–9, 2021.

RAWDKUEN, S. et al. Application of anthocyanin as a color indicator in gelatin films. **Food Bioscience**, Amsterdam, v. 36, p. 100603, 2020.

REIS, L. C. B. et al. Active biocomposites of cassava starch: The effect of yerba mate extract and mango pulp as antioxidant additives on the properties and the stability of a packaged product. **Food and Bioproducts Processing**, Rugby, v. 94, p. 382–391, 2015.

REN, L. et al. Influence of chitosan concentration on mechanical and barrier properties of corn starch/chitosan films. **International Journal of Biological Macromolecules**, Amsterdam, v. 105, p. 1636–1643, 2017.

RIACHI, L. G.; DE MARIA, C. A. B. Yerba mate: An overview of physiological effects in humans. **Journal of Functional Foods**, Amsterdam, v. 38, p. 308–320, 2017.

ROCHA, G.O.; FARIAS, M.G. Filmes Compostos Biodegradáveis a Base de Amido de Mandioca e Proteína de Soja. **Polímeros**, São Carlos, v. 24, n. 5, p. 587–595, 2014.

ROCKENBACH, I. I. et al. Phenolic compounds content and antioxidant activity in pomace from selected red grapes (*Vitis vinifera* L. and *Vitis labrusca* L.) widely produced in Brazil. **Food Chemistry**, Amsterdam, v. 127, n. 1, p. 174–179, 2011.

ROY, S.; KIM, H. J.; RHIM, J. W. Effect of blended colorants of anthocyanin and shikonin on carboxymethyl cellulose/agar-based smart packaging film. **International Journal of Biological Macromolecules**, Amsterdam, v. 183, p. 305-315, 2021.

ROY, S.; RHIM, J. W. Fabrication of chitosan-based functional nanocomposite films: Effect of quercetin-loaded chitosan nanoparticles. **Food Hydrocolloids**, New York, v. 121, 2021.

SAURABH, C. K.; GUPTA, S.; VARIYAR, P. S. Development of guar gum based active packaging films using grape pomace. **Journal of Food Science and Technology**, New Delhi, v. 55, p. 1982-1992, 2018

SHARMILA, G. et al. Ultrasound assisted extraction of total phenolics from *Cassia auriculata* leaves and evaluation of its antioxidant activities. **Industrial Crops and Products**, Amsterdam, v. 84, p. 13–21, 2016.

SIGURDSON, G. T.; TANG, P.; GIUSTI, M. M. Natural Colorants: Food Colorants from Natural Sources. **Annual Review of Food Science and Technology**, Palo Alto, v. 8, p. 261-280, 2017.

SILVA JÚNIOR, M. E. et al. Ultrasound-assisted extraction of bioactive

compounds from ciriguela (*Spondias purpurea* L.) peel: Optimization and comparison with conventional extraction and microwave. **Arabian Journal of Chemistry**, Saudi Arabia, v. 14, n. 8, p. 103260, 2021.

SILVA, R. P. et al. Caracterização fitoquímica e análise da atividade antimicrobiana e antioxidante dos extratos de *Ilex paraguariensis*, st hill.: uma revisão de literatura. **Brazilian Journal of Development**, Curitiba, v. 7, n. 4, p. 38806–38830, 2021.

SOYKEABKAEW, N.; THANOMSILP, C.; SUWANTONG, O. A review: Starch-based composite foams. **Composites Part A: Applied Science and Manufacturing**, Oxford, v. 78, p. 246–263, 2015.

THOURI, A. et al. Effect of solvents extraction on phytochemical components and biological activities of Tunisian date seeds (var. Korkobbi and Arechti). **BMC Complementary and Alternative Medicine**, London, v. 17, n. 1, p. 1–10, 2017.

VALDUGA, A. T. Antioxidant potential of yerba mate (*Ilex paraguariensis* St . Hil .) extracts in *Saccharomyces cerevisiae* deficient in oxidant defense genes. **Brazilian journal of biology**, São Carlos, v. 76, p. 539-544, 2016.

VARDANEGA, R.; SANTOS, D. T.; DE ALMEIDA, M. A. Intensification of bioactive compounds extraction from medicinal plants using ultrasonic irradiation. **Pharmacognosy Reviews**, Mumbai, v. 8, n. 16, p. 88, 2014.

VERSINO, F. et al. Starch-based films and food coatings: An overview. **Starch/Staerke**, Weinheim, v. 68, n. 11–12, p. 1026–1037, 2016.

WANG, Z. et al. Cassava starch: Chemical modification and its impact on functional properties and digestibility, a review. **Food Hydrocolloids**, New York, p. 107542, 2022.

WOLFF, S. M.; SILVEIRA, A. C. DA; LAZZAROTTO, M. Metodologia para extração de fenólicos totais e antioxidantes da erva-mate. **Iniciação Científica Cesumar**, Maringá, v. 21, n. 1, p. 45, 2019.

YAMAMOTO, H. et al. Cooperativity and nonuniformity in the viscosity-change process of rice starch in hot excess water. **Food Hydrocolloids**, New York, v. 103, p. 105674, 2020.

YONG, H.; LIU, J. Recent advances in the preparation, physical and functional properties, and applications of anthocyanins-based active and intelligent packaging films. **Food Packaging and Shelf Life**, Amsterdam, v. 26, p. 100550, 2020.

YUN, D. et al. Development of active and intelligent films based on cassava starch and Chinese bayberry (: *Myrica rubra* Sieb. et Zucc.) anthocyanins. **RSC Advances**, Cambridge, v. 9, n. 53, p. 30905-30916, 2019.

ZHANG, K. et al. Novel pH-sensitive films based on starch/polyvinyl alcohol and food anthocyanins as a visual indicator of shrimp deterioration. **International Journal of Biological Macromolecules**, Amsterdam, v. 145, p. 768-776, 2020.

ZHANG, X. et al. Development and characterization of active and pH-sensitive films based on psyllium seed gum incorporated with free and microencapsulated mulberry pomace extracts. **Food Chemistry**, Amsterdam, v. 352, p. 129333, 2021.

APÊNDICE A - Testes preliminares de extração da erva-mate

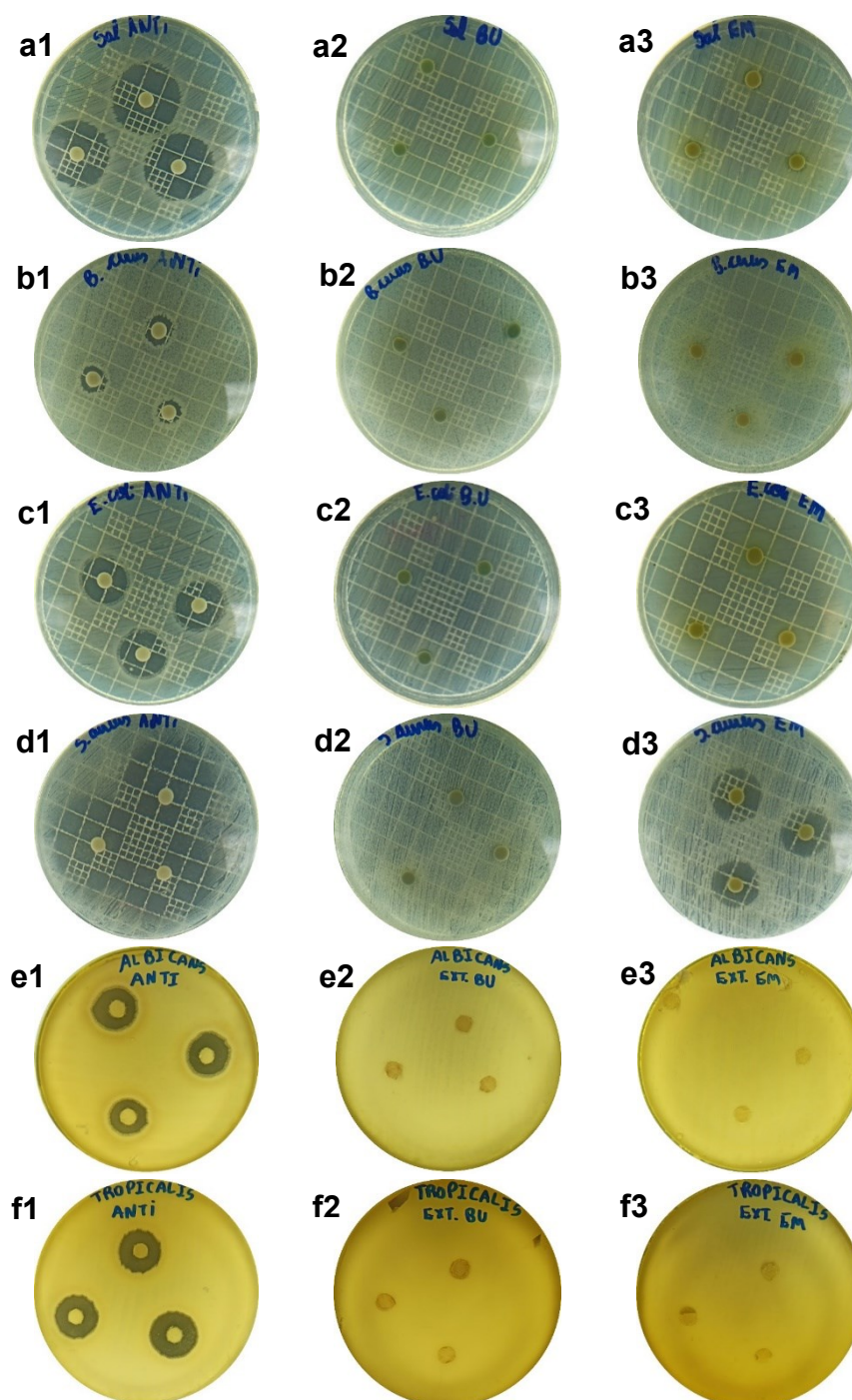
Resultados de compostos fenólicos totais dos extratos da erva-mate obtidos por diferentes condições de extração

Variáveis	E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7	E8	E1'	E1'	E1'	E1'
Equipamento	Sonicador de ponteira ultrassônico								banho ultrassônico			
Temperatura (°C)	25	25	25	25	22	22	22	22	22	25	45	55
Razão erva-mate-água (g 100 mL ⁻¹)	8,0	8,0	8,0	8,0	1,2	4,2	1,2	4,2	1,2	8,0	4,2	7,3
Amplitude (%)	25	50	75	90	23	23	50	50	-	-	-	-
Tempo (minutos)	10	10	10	10	30	30	30	30	30	10	30	30
Solvente	Água destilada											
(mg Eq Ácido Gálico g ⁻¹ amostra)	20,67	22,40	23,31	20,22	29,74	24,04	29,58	25,03	39,15	12,34	38,53	25,40

Fonte: Autora, 2022.

No tempo de 30 minutos o equipamento pode aquecer e alterar a amostra. Nesta operação é necessário fazer a extração por 15 minutos, deixar arrefecer o equipamento por 10 minutos e após o restante do tempo de extração, tornando assim a operação inviável. Para comparação de métodos, também foram realizados testes em banho ultrassônico, com capacidade de 2,5 Litros, frequência de 50/60 Hz e frequência ultrassônica de 42 kHz. Neste equipamento não é possível o controle da temperatura, tornando assim o experimento não válido.

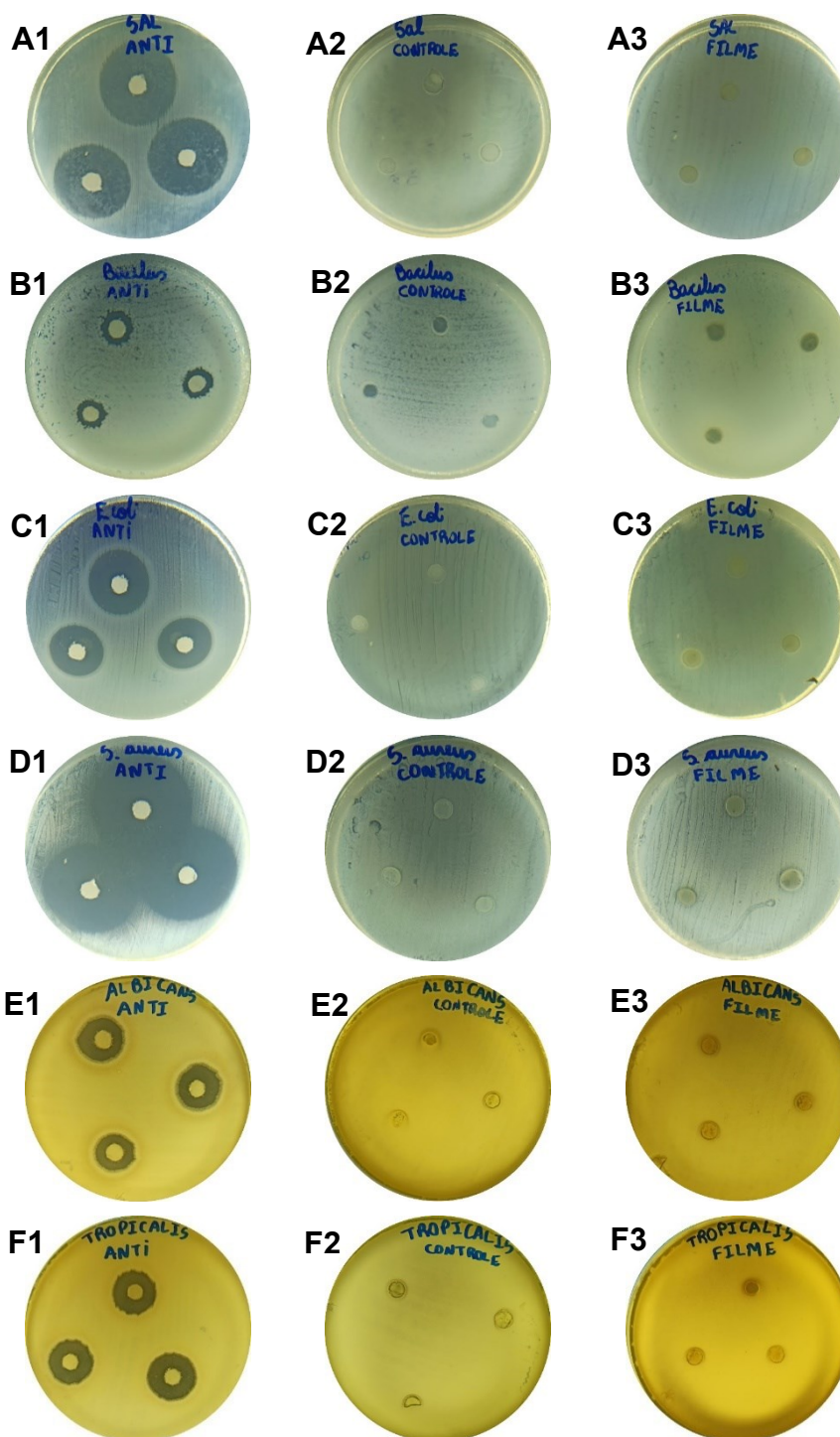
APÊNDICE B - Halo de inibição dos extratos de erva-mate e bagaço de uva pelo método de disco-difusão



Legenda: (a1, a2, a3) Halo total de inibição da *S. enterica* pelo antibiótico, extrato de bagaço de uva e extrato de erva-mate, respectivamente; (b1, b2, b3) Halo total de inibição da *Bacillus cereus* pelo antibiótico, extrato de bagaço de uva e extrato de erva-mate, respectivamente; (c1, c2, c3) Halo total de inibição da *E. coli* pelo antibiótico, extrato de bagaço de uva e extrato de erva-mate, respectivamente; (d1, d2, d3) Halo total de inibição da *S. aureus* pelo antibiótico, extrato de bagaço de uva e extrato de erva-mate, respectivamente; (e1, e2, e3) Halo total de inibição da *Candida albicans* pelo antibiótico, extrato de bagaço de uva e extrato de erva-mate, respectivamente; (f1, f2, f3) Halo total de inibição da *Candida tropicalis* pelo antibiótico, extrato de bagaço de uva e extrato de erva-mate, respectivamente.

Fonte: Autora, 2022

APÊNDICE C - Halos de inibição dos filmes contendo extrato de erva-mate e bagaço de uva pelo método de disco-difusão



Legenda: (A1, A2, A3) Halo total de inibição da *S. enterica* pelo antibiótico, filme controle e filme com extrato, respectivamente; (B1, B2, B3) Halo total de inibição da *Bacillus cereus* pelo antibiótico, filme controle e filme com extrato, respectivamente; (C1, C2, C3) Halo total de inibição da *E. coli* pelo antibiótico, filme controle e filme com extrato, respectivamente; (D1, D2, D3) Halo total de inibição da *S. aureus* pelo antibiótico, filme controle e filme com extrato, respectivamente; (E1, E2, E3) Halo total de inibição da *Candida albicans* pelo antibiótico, filme controle e filme com extrato, respectivamente; (F1, F2, F3) Halo total de inibição da *Candida tropicalis* pelo antibiótico, filme controle e filme com extrato, respectivamente.

Fonte: Autora, 2022.