



Área: Tecnologia de Alimentos

PRODUÇÃO DE FILME ANTIMICROBIANO DE AMIDO DE MILHO COM ADIÇÃO DE EXTRATO DE ERVA-MATE

Leticia Eduarda Bender*, Alice Gonzatti Rotava, Bárbara Biduski, Christian de Oliveira Reinehr

Laboratório de Bioquímica e Bioprocessos, Curso de Engenharia de Alimentos, Faculdade de Engenharia e Arquitetura, Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, RS

*E-mail: letiiciabender@gmail.com

RESUMO – A busca por alimentos livres da adição de conservantes químicos, que podem ser substituídos por compostos oriundos de fontes vegetais como os óleos essenciais e extratos tem aumentado. A erva-mate, é vastamente estudada devido suas propriedades antioxidantes, no entanto, esses compostos também possuem atividade antimicrobiana. Objetivou-se avaliar a influência de extrato de erva-mate nas propriedades antimicrobianas e antioxidantes de filmes de amido de milho. O extrato hidroalcoólico de erva-mate foi liofilizado e caracterizado quanto sua concentração de compostos fenólicos e atividade antimicrobiana. Filmes de amido com 0% e 0,75% de extrato de erva-mate foram avaliados quanto sua concentração de compostos fenólicos e atividade antimicrobiana. O extrato obteve resultado significativo de compostos fenólicos $334,59 \pm 15,08$ (mg de ác. gálico g^{-1}) e sua atividade antimicrobiana por disco-difusão obteve maior halo de inibição ($19,53 \pm 0,37$ mm) para o extrato com 15% de concentração para a bactéria *S. aureus*. O filme com 0,75% de concentração de extrato obteve $54,50 \pm 5,30$ mg. de ac. gálico g^{-1} na quantificação de compostos fenólicos, para a análise de ação antimicrobiana foram obtidos apenas resultados qualitativos, em que houve formação de halo de inibição para *S. aureus* no filme de 0,75%.

Palavras-chave: *Ilex paraguariensis*, antimicrobianos naturais, embalagens biodegradáveis.

1 INTRODUÇÃO

A industrialização de alimentos apresenta-se como principal objetivo a conservação, sendo capaz de oferecer ao consumidor alimentos com vida útil estendida. A segurança alimentar é uma questão importante dentro da indústria alimentícia, devido a tamanha incidência de relatos relacionados a contaminação dos consumidores, muitas vezes levando a óbito por alimentos contaminados (MACWAN et al., 2016). Para a conservação dos alimentos, conservantes e aditivos alimentares vem sendo amplamente utilizados. O sorbato, nitrito e nitrato os quais possuem sua segurança e uso comprovados e regulamentados por órgãos competentes como Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) são exemplos de aditivos químicos largamente utilizados no país para controle microbiano em alimentos.

O consumidor procura cada vez mais por alimentos que sejam mais próximos do natural possível, através desta questão, a indústria vem estudando para utilização de aditivos naturais ao invés dos químicos (CALO, et al., 2015; DANNEBERG et al., 2017). Produtos naturais estão sendo estudados a fim de se utilizar em alimentos como conservantes, entre eles estão os extratos de plantas e óleos essenciais de pimenta rosa, manjerição, flores de camomila, sementes de cardamomo, alecrim, orégano, cravo, alho e erva-mate, com objetivo antioxidante e/ou antimicrobiano (BONA, et al, 2010; DANNEBERG, 2017; RIBEIRO-SANTOS et al., 2017).

Os compostos que têm ação antimicrobiana e/ou antioxidante estão presentes metabólitos secundários em diversas plantas. Entre estas tem-se a erva-mate, planta tradicional para o chimarrão, bebida típica de nossa região. Seus compostos vêm sendo estudados principalmente por sua ação antioxidante, entretanto, pesquisas relacionadas a ação antimicrobiana de extratos da planta demonstram que a erva-mate também possui grande potencial como um agente antimicrobiano natural (COSTA; RACANICCI; SANTANA, 2017; BURRIS et al., 2011; PENTEADO et al., 2016; GIROLOMETTO et al., 2009). A erva-mate (*Ilex paraguariensis*) é uma planta cultivada e consumida principalmente nos países da América do Sul (BITENCOURT, 2009), possui propriedades promotoras à saúde provenientes de seus compostos bioativos, como o combate de radicais livres, auxílio na digestão, perda de peso, tratamento de diabetes, efeito estimulante, terapêutico, diurético e antimutagênica (COLPO et al., 2016; HELM et al., 2017).

A extração de compostos bioativos pode ser realizada por vários processos, como extração aquosa ou infusão, extração supercrítica, por alta pressão e por campo elétrico moderado. Fatores como temperatura em que a operação será realizada, razão entre o solvente e a matriz, estado físico da matriz e pressão do sistema, podem interferir na extração (SANTO, 2016; SERAFIM, 2016). A aplicação desses extratos naturais vem tendo sua utilização voltada para aplicação em embalagens ativas em alimentos como forma de conservação.

Para adição de antimicrobianos e antioxidantes naturais em embalagens alimentícias, podem ser utilizados biopolímeros de amido que vêm sendo estudados para este fim. (RIBEIRO-SANTOS, et al., 2017; MEDEIROS et al., 2016). A adição de um composto a um filme, faz com que a embalagem que antes era tratada como passiva, na qual



seu principal objetivo era de proteção mecânica ao alimento, torne-se uma embalagem ativa, capaz de diminuir a degradação do alimento. A utilização de filmes produzidos através de polímeros naturais também está relacionada a preocupação da população com a proporção de acúmulo de resíduos que os plásticos têm gerado no planeta.

A embalagem ativa pode agir de forma que possa matar ou reduzir o crescimento de microrganismos deteriorantes e/ou patogênicos que contaminam alimentos e tornar o alimento menos susceptível a oxidação. Para isso, pode-se adicionar agentes que possuam essa atividade aos biopolímeros ou utilizando biopolímeros que já possuam essa característica (HAN, 2003). Dentro do ramo da ciência observa-se um crescente aumento em pesquisas relacionadas a produção de embalagens biodegradáveis para a aplicação em alimentos, onde também é possível agregar a tais embalagens atributos relacionados a qualidade do alimento, caracterizando tais embalagens como ativas, como a incorporação de agentes antimicrobianos e antioxidantes naturais.

O objetivo deste estudo foi avaliar a influência de extrato de erva-mate nas propriedades antimicrobianas e antioxidantes de filmes de amido de milho.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 MATÉRIA PRIMA

A erva-mate de origem orgânica foi doada pela indústria Alma forte, e o amido de milho foi adquirido no comércio local do município de Passo Fundo – RS, Brasil.

2.2 EXTRATOS DE ERVA-MATE

A produção dos extratos foi realizada conforme a metodologia de Martin et al., (2013), com adaptações. Foram produzidos extratos por percolação, onde preparou-se solução na proporção 1:8 (m/v; grama de erva-mate: mL de solução hidroetanólica) e proporção de 60:40 para a solução hidroetanólica. A solução foi armazenada em frasco âmbar por 24 h sob refrigeração e após foi rotaevaporada em rotaevaporador rotativo (TECNAL TE-211) a 80 °C até que não houvesse mais condensação de etanol. O extrato foi congelado em ultrafreezer e posteriormente liofilizado. Os extratos liofilizados foram mantidos sob congelamento até sua utilização.

A análise microbiológica dos extratos foi realizada utilizando o método de disco-difusão. Os microrganismos utilizados foram bactérias com grande ocorrência em alimentos: *Estafilococos aureus* coagulase positiva, *Salmonela* sp., *Pseudomonas* e *Escherichia Coli*. Os extratos foram diluídos em água nas concentrações de 5, 10, 15 e 20% do extrato liofilizado de erva-mate. Foi inoculada em placas de petri contendo ágar Mueller-Hinton a solução equivalente à 0,5 da escala Mac Farland (1×10^6 UFC/mL) das bactérias citadas no item. Poços com 6mm de diâmetro foram realizados com auxílio de perfurador estéril em cada placa, sendo adicionados 40 μ L do extrato de erva-mate em cada poço nas diluições desejadas. Todos os experimentos foram realizados em triplicata. As placas foram incubadas por 24 h à 37 °C e após foi verificado a existência de halos de inibição, que foram medidos com auxílio de micrometro digital (CLSI, 2017).

A atividade antioxidante foi realizada quantificando os compostos fenólicos totais presentes no extrato, utilizando método espectrofotométrico a 765 nm, por meio da reação de oxirredução com reagente de Folin-Ciocalteu, que reage com as hidroxilas presentes nos polifenóis, segundo a metodologia descrito por Correia et al. (2004), com modificações propostas por Sousa e Correia (2012). Os resultados foram analisados a partir da curva padrão utilizando ácido gálico como fenólico padrão, a unidade pode ser expressa em mg de ácido gálico por mL de extrato (mg GAE/mL amostra), ou mg de ácido gálico por g de extrato (mg GAE/g amostra).

2.3 FILME ATIVO BIODEGRADÁVEL

A produção do filme foi realizada pela técnica *casting*, e seguiu metodologia de Jaramillo et al., (2015) com adaptações. A solução filmogênica foi preparada com 3% de amido (p/v; amido/água), 30% de glicerol (p/p; glicerol/amido) e água como solvente. O glicerol e o amido foram dissolvidos em água e aquecidos a 90 °C por 20 min.

A solução filmogênica foi arrefecida até 50 °C e adicionada de 0% e 0,75% (p/v) de extrato de erva-mate liofilizado. A solução com extrato foi homogeneizada com agitador ultra turrax, (modelo IKA T25 digital, marca Microcanal S.A.), por 2 min e dispersas (20 g) em placas de Petri de acrílico e secos em estufa de circulação de ar a 40 °C por 24 h. Os filmes foram acondicionados conforme a norma ASTM E-171 (2018) por 72 horas à 25 °C \pm 3 °C com umidade relativa de 55% \pm 3 (solução saturada de nitrato de magnésio).

A atividade antimicrobiana dos filmes em meio sólido foi realizada de forma similar à técnica de disco-difusão (CLSI, 2017) para *S. Aureus*. Os filmes foram recortados assepticamente, sendo posteriormente dispostos em placas contendo meio sólido previamente inoculado. Para a análise de atividade antioxidante inicialmente os filmes foram colocados sob agitação em mesa agitadora por 2 horas e submersos em 40 mL de uma solução hidroalcolica em concentração 1:1 e foi realizada utilizando a metodologia de compostos fenólicos totais descrita no item 2.2.



2.4 TRATAMENTO DE DADOS

As análises foram realizadas em triplicata e os resultados obtidos foram submetidos à análise estatística através da Análise de Variância (ANOVA), utilizando o software Excel, seguido pelo teste de comparação de médias de Tukey, a 5% de significância.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 EXTRATO DE ERVA-MATE

O processo de liofilização do extrato teve como objetivo concentrar seus compostos presentes e aumentar sua vida útil. A Figura 1 representa o extrato após a liofilização.

Figura 1: Extrato de erva-mate liofilizado.



Fonte: Autor, 2020.

O resultado de halos inibitórios para *S. Aureus* está representado na Tabela 1 e na Figura 2. O extrato apresentou atividade inibitória apenas para a bactéria gram-positiva *S. Aureus* (Tabela 1), e frente as bactérias gram-negativas *Salmonella sp.*, *Pseudomonas* e *Escherichia Coli* o extrato não apresentou atividade.

Tabela 1: Halo de inibição de extratos de erva-mate em diferentes concentrações.

Concentração de extrato	Halo de inibição (mm)
5%	11,14 ± 0,16 ^a
10%	17,36 ± 0,77 ^b
15%	19,53 ± 0,37 ^c
20%	15,90 ± 0,99 ^b

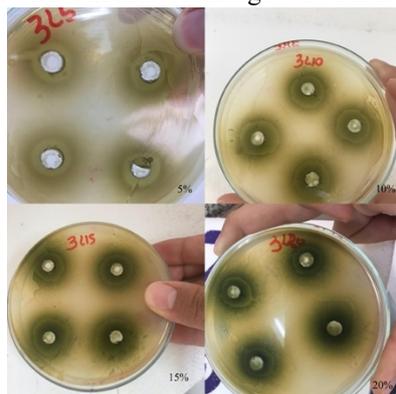
Os resultados expressão média ± desvio padrão. Letras diferentes na mesma coluna diferem significativamente pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Fonte: Autor, 2020.

O extrato de concentração de 15% obteve o maior halo, com $19,53 \pm 0,37$ (mm). Martin et.al. (2013) obtiveram resultados semelhantes quanto ao seu extrato etanólico e metanólico, ao qual apresentaram respectivamente halos de inibição para *S. Aureus* de $23,67 \pm 0,57$ (mm) e de $21,67 \pm 0,57$ (mm). A inibição do extrato frente ao *S. Aureus* está representada pela Figura 6, onde tem-se a inibição das quatro concentrações utilizadas. Segundo Pessini et al. (2003) o fato de o extrato apresentar ação antimicrobiana apenas frente a bactéria gram-positiva pode ser em função da parede celular de microrganismos gram-negativos apresentarem uma membrana externa que impossibilitaria a entrada de determinados compostos.



Figura 2: Resultado da análise microbiológica do extrato liofilizado diluído



Fonte: Autor, 2020.

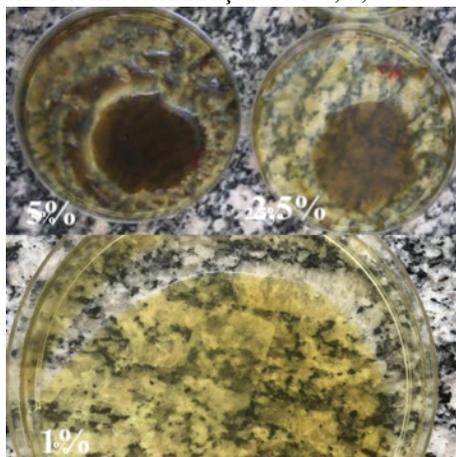
O extrato de erva-mate apresentou um conteúdo fenólico de $334,59 \pm 15,08$ mg de ácido gálico por grama extrato, resultado maior do que quando comparado ao encontrado por Vieitez et. al. (2017), que obteve valores para extratos obtidos por maceração com etanol a 75% para erva-mate $158,9 \pm 0,4$, alecrim $123,9 \pm 0,2$, boldo $163,3 \pm 3,7$, cedron $97,6 \pm 2,0$, congrosa $192,0 \pm 1,3$ e pitanga $232,2 \pm 3,9$ (mg GAE/g extrato).

Knapp et al. (2018) quantificou compostos fenólicos totais de extrato de erva-mate hidroalcolico 50:50 em forma líquida, e teve como resultado $7,28 \pm 0,08$ mg GAE/g. Através deste resultado, pode ser observado a importância de liofilizar o extrato, pois assim os compostos se concentram, além de aumentar a conservação dos compostos através da retirada da água.

3.2 FILME ATIVO BIODEGRADÁVEL

Foram realizados testes preliminares para definição da porcentagem de extrato que seria utilizado no filme biodegradável, os filmes com 1, 2,5 e 5% estão representados na Figura 3. Os filmes produzidos não apresentaram uma boa formação, estavam sem homogeneidade e quebradiços, impedindo a realização das outras análises.

Figura 3: Filmes com concentração de 1%, 2,5% e 5% de extrato.

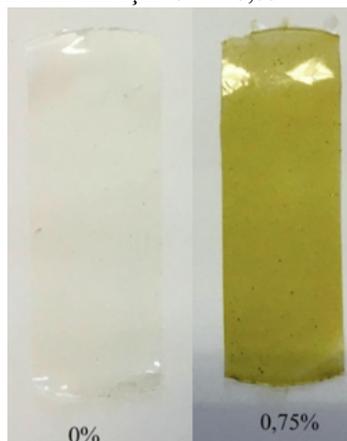


Fonte: Autor, 2020.

Após os testes preliminares, foram produzidos filmes com concentrações de 0% e 0,75% de extrato, aos quais por apresentarem melhor formação, representados na Figura 4. Os filmes com 0 e 0,75% apresentaram maior homogeneidade comparado aos filmes produzidos nos testes preliminares. A cor do filme 0,75% apresentou cor esverdeada, devido a adição do extrato. Os filmes também apresentaram a superfície lisa e de fácil manuseio.



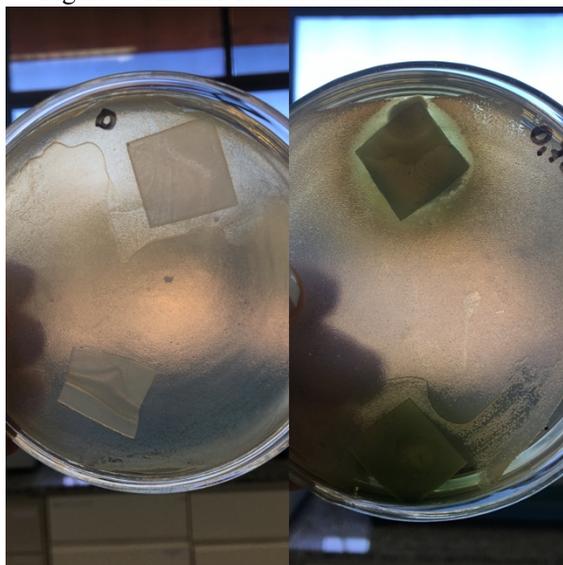
Figura 4: Filmes com concentração 0% e 0,75% de extrato de erva-mate.



Fonte: Autor, 2020.

Os resultados da análise microbiológica estão representados na Figura 4 e demonstram a identificação de uma pequena inibição de crescimento microbiano ocasionada pelo filme na concentração de 0,75%. No entanto novos testes são necessários para obtenção de resultados quantitativos quanto a essa inibição.

Figura 8: Análise de disco-difusão dos filmes.



Fonte: Autor, 2020.

O conteúdo de fenólicos totais presentes nos filmes foi de $0,25 \pm 0,07$ mg de ácido gálico por grama de filme na concentração de 0% e de $54,50 \pm 5,30$ mg de ácido gálico por grama de filme na concentração de 0,75%. Os resultados diferiram estatisticamente, segundo o teste de Tukey ($p < 0,05$). O filme de 0,75% de erva-mate demonstrou maior teor de compostos fenólicos. Por apresentar conteúdo relevante de compostos fenólicos, o filme de amido adicionado de extrato de erva-mate se torna um material com grande potencial de uso como embalagens com propriedades antioxidantes. Seria interessante realizar uma extração dos compostos dos filmes por mais tempo, ou com teor de etanol maior, para chegar a uma quantidade de compostos fenólicos totais mais próxima do que foi encontrado no extrato liofilizado.

4 CONCLUSÃO

O filme de amido de milho com adição de extrato hidroalcoólico liofilizado de erva-mate obteve bom desempenho, tendo em vista que apresentaram tanto atividade antioxidante quanto atividade antimicrobiana para *S. Aureus*. O filme adicionado de extrato possui alto potencial como embalagem bioativa, sendo capaz não apenas de inibir



crescimento microbiológico, mas como de desempenhar características antioxidantes, podendo ser utilizado em alimentos com altos teores de lipídeos a fim de amenizar a oxidação lipídica, por exemplo.

5 AGRADECIMENTOS

Agradecemos a Universidade de Passo Fundo por ter nos proporcionado todos os materiais e espaço para realização desse trabalho.

6 REFERÊNCIAS

ASTM E171 / E171M-11. Standard Practice for Conditioning and Testing Flexible Barrier Packaging. **ASTM International**. West Conshohocken, PA, 2018.

BITENCOURT, J.; ZUFFELLATO-RIBAS, K.C.1; WENDLING, I.; KOEHLER, H.S. Enraizamento de estacas de erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hill.) provenientes de brotações rejuvenescidas. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 11, n. 3, p.z 277-281, 2009.

BONA, E. A. M; PINTO, F. G. S.; BORGES, A. M. C.; WEBER, L. D.; FRUET, T. K.; ALVES, L. F. A.; MOURA, A. C. Avaliação da Atividade Antimicrobiana de Erva-Mate (*Ilex paraguariensis*) sobre Sorovares de *Salmonella* spp. de Origem Avícola. **UNOPAR Científica**, Ciências Biológicas e da Saúde. v. 12, 2010

BURRIS, K. P. DAVIDSON, P. M.; STEWART, S. N. Jr; HARTE, F. M. Antimicrobial activity of yerba mate (*Ilex paraguariensis*) aqueous extracts against *Escherichia coli* O157: H7 and *Staphylococcus Aureus*. **Journal of Food Science**, v. 76, n. 6, p. M456-M462, 2011.

CALO, J. R.; CRANDALL, P. G.; O'BRYAN, C. A.; RICKE, S. C. Essential oils as an antimicrobials in food systems – a reiew. **Food Control**. v. 54 p. 111-119, 2015

CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 27th ed. **CLSI supplement M100**. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2017.

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

COLPO, A. C.; ROSA, H.; LIMA, M. E.; PAZZINI, C. E. F.; CAMARGO, V. B.; BASSANTE, F. E. M.; PUNTEL, R.; ÁVILA, D. S.; MENDEZ, A.; FOLMER, V. Yerba mate (*Ilex paraguariensis* St. Hill.)-based beverages: How successive extraction influences the extract composition and its capacity to chelate iron and scavenge free radicals. **Food Chemistry**. v. 206, p. 185-195, 2016.

CORREIA, R. T.; MCCUE, P.; MAGALHÃES, M. M.; MACÊDO, G.; SHETTY, K., Production of phenolic antioxidants by the solid-state bioconversion of pineapple was temixed with soy flour using *Rhizopus Oligosporus*. Process. **Biochemistry**. v. 39, n. 12, p. 2167-2172, 2004.

DANNENBERG, G. D. S; FUNCK, G. D.; CRUXEN, C. E. D. S; MARQUES, J. D. L.; DA SILVA, W. P; FIORENTINI, A. M. Essential oil from pink pepper as na antimicrobial component in cellulose acetate film: Potential for application as active packaging for sliced cheese. **LWT-Food Science and Technology**, v. 81, p. 314-318, 2017.

GIROMELETTO, G.; AVANCINI, C. A. M.; CARVALHO, H. H. C.; WIEST, J. M. Atividade antibacteriana de extratos de erva mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil). *Revista brasileira de plantas mediciniais*. **Botucatu**. Vol. 11, n. 1, p. 49-55, 2009.

HAN, J. H. Antimicrobial food packaging. In: AHVENAINEN, R. (Ed.). **Novel food packaging techniques**. Washington: CRC Press, 2003. P. 69-89.

HELM, C.V.; RUIZ, H.Z.; MIRANDA, A.C.; WENDLING, I.; LIZ, M.V. Metilxantinas e compostos fenólicos em amostras de erva-mate. In: **Encontro Nacional de Química Ambiental**, 8, 2017, Curitiba. O químico e os desafios ambientais na sociedade atual: resumos e trabalhos completos. Curitiba: UTFPR, 2017.



JARAMILLO, C. M.; SELIGRA, P. G.; GOYANES, S.; BERNAL, C.; FAMÁ, L. Biofilms based on cassava starch containing extract of yerba mate as antioxidant and plasticizer. **Starch Journal**, v. 67, 780-789, 2015.

KNAPP, M. A.; SANTOS, D. F.; RICCIO, D. P.; DEON, V. G.; SANTOS, G. H. F.; PINTO, V. Z. Yerba mate extract in active starch films: Mechanical and antioxidant properties. **Journal of food processing and preservation**, 2019.

MACWAN, S. R.; DABHI, B. K.; APARNATHI, K. D.; PRAJAPATI, J. B. Essential oils of herbs and spices: their antimicrobial activity and application in preservation of food. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v. 5, n. 5, p. 885-901, 2016.

MARTIN, J. G. P.; PORTO, E.; DE ALENCAR, S. M.; DA GLÓRIA, E. M.; CORRÊA, C. B.; CABRAL, I. S. R. Antimicrobial activity of yerba mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil. against food pathogens. **Revista Argentina de microbiologia**, v. 45, n. 2, p. 93-98, 2013.

MEDEIROS, E. A. A.; CARDOSO, R. R.; ALVES, R. B. T.; ÂNGULO, J. D. V.; SOARES, N. F. F. Atividade antimicrobiana de filme de acetato de celulose incorporado com óleo essencial de orégano (*Oreganum vulgare* L.) em queijo minas frescal., **XXV Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos**. Gramado. 24 a 27 de outubro de 2016.

PENTEADO, J. O.; VOLÇÃO, L. M.; RAMOS, D. F.; SILVA-JÚNIOR, M.; MUCCILLO-BAISH, A. L. Atividade antimicrobiana de extratos de *Ilex paraguariensis*. **Revista de Epidemiologia e Controle de Infecção**, v. 1, n. 1, p. 136-146, 2016.

PESSINI, G.L.; HOLETZ, F.B.; SANCHES, N.R.; CORTEZ, D.A.G.; DIAS FILHO, B.P.; NAKAMURA, C.V. Avaliação da atividade antibacteriana e antifúngica de extratos de plantas utilizadas na medicina popular. **Rev Bras Farmacogn** 13: 21-24, 2003.

RIBEIRO -SANTOS, R.; ANDRADE, M.; DE MELO, N. R.; SANCHES-SILVA, A. Use of essential oils in active food packaging: recent advances and future trends. **Trends in Food Science & Technology**, v. 61, p. 132-140, 2017.

SANTO, A. T. D. E. Estudo sobre processos de extração e purificação de cafeína da erva-mate. **Dissertação de mestrado em Engenharia e Tecnologia de Materiais** - Faculdade de Engenharia. Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, 2016.

SERAFIM, R.A. Efeito da aplicação de extrato de erva-mate (*Ilex paraguariensis*) assistido por ultrassom na estabilidade oxidativa de linguiça suína. 59 f. **Dissertação de mestrado em Tecnologia de Alimentos** - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Londrina, 2016.

SOUSA, B. A.; CORREIA, R. T. P. Phenolic content, antioxidant activity and anti-amylolytic activity of extracts obtained from bioprocessed pineapple and guava wastes. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 29, n. 01, p. 25 - 30, Jan./Mar., 2012.

VIEITEZ, I.; MACEIRAS, L.; JACHMANIÁN, I.; ALBORÉS, S. Antioxidant and antibacterial activity of different extracts from herbs obtained by maceration or supercritical technology. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 133, p. 58-64, 2017.