UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel
Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial
Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos

Tese de Doutorado

Encapsulação de compostos bioativos em matrizes proteicas pela técnica de *electrospinning* para liberação controlada em embalagens de alimentos

Graziella Pinheiro Bruni
Engenheira de Alimentos, MSc.

Pelotas, 2019

Graziella Pinheiro Bruni

Encapsulação de compostos bioativos em matrizes proteicas pela técnica de *electrospinning* para liberação controlada em embalagens de alimentos

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Pelotas, como requisito à obtenção do título de Doutora em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Orientador:
Profa. Dra. Elessandra da Rosa Zavareze
Coorientador:
Profa. Dra. Vilásia Guimarães Martins

Pelotas, 2019

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

B896e Bruni, Graziella Pinheiro

Encapsulação de compostos bioativos em matrizes proteicas pela técnica de electrospinning para liberação controlada em embalagens de alimentos / Graziella Pinheiro Bruni ; Elessandra da Rosa Zavareze, orientadora ; Vilásia Guimarães Martins, coorientadora. — Pelotas, 2019.

86 f. : il.

Tese (Doutorado) — Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, 2019.

1. Isolado proteico de soja. 2. Zeína. 3. Carotenoides. 4. Compostos fenólicos. 5. Emulsão. I. Zavareze, Elessandra da Rosa, orient. II. Martins, Vilásia Guimarães, coorient. III. Título.

CDD : 664

Elaborada por Dafne Silva de Freitas CRB: 10/2175

Banca Examinadora

Drª. Helen Hackbart

Prof. Dr. Nathan Levien Vanier

Profª. Drª. Rosana Colussi

Profª. Drª. Vilásia Guimarães Martins

AGRADECIMENTOS

À Deus, à Santa Catarina e à todos os amigos de Luz do Plano Espiritual por sempre me amparar, me guiar e me proteger.

À minha família por sempre estar ao meu lado e apoiar as minhas decisões. Pai, muito obrigada por ser esse pai amoroso, por sempre me ajudar em todas as situações da minha vida e por não medir esforços em realizar os meu sonhos. Mãe obrigada por ser essa super mãe amorosa, alegre, companheira e acima de tudo uma pessoa iluminada que sempre me apoiou e ficou ao meu lado nos momentos mais difíceis. Ia, minha irmã, obrigada por sempre me ajudar, ser meu anjo da guarda, me incentivar e ser um exemplo para mim. Raffa, meu irmão, obrigada pelo carinho e por todos os momentos de alegria. Família, muito obrigada.

Ao meu esposo Jean Paulo pelo amor, carinho e por sempre estar ao meu lado. Tu ilumina a minha vida e preenche me coração de amor. Te amo!

À minha avó Tereza, pelo amor e carinho. Te amo.

À minha Dinda Graziela pelo amor e carinho. Te amo.

À minha prima Giovanna pelo amor e carinho. Te amo.

Ao meu Nano, meu cachorrinho e melhor amigo, por ser um companheiro fiel e por alegrar a minha vida.

Às minhas amigas da "Equipe Nano": Fran, Laura e Mari, por me ajudarem em cada etapa deste trabalho, por serem amigas maravilhosas, por me amarem e por serem pessoas extraordinárias, cada uma com suas características e qualidades. Amo vocês.

À minha amiga Cristiane, mesmo com a distância sempre me apoiou e me incentivou. Obrigada amiga. És uma amiga única. Te amo.

À minha amiga e colega Shanise, por ser minha mentora, por compartilhar o seus conhecimentos, por ser uma pessoa iluminada por Deus, por me ensinar e me ajudar em todas as etapas da Pós Graduação e principalmente pela amizade.

À minha orientadora Prof. Elessandra, pela ajuda, confiança, comprometimento e ensinamentos.

À minha co-orientadora Vilásia Martins pela ajuda, confiança, comprometimento e ensinamentos.

Ao meu supervisor Dr. Lim, da University of Guelph por toda ajuda durante o período de doutorado sanduíche.

Aos professores do Programa de Ciência e Tecnologia de Alimentos da UFPel pelos ensinamentos, em especial ao Prof. Mauricio Oliveira e ao Prof. Nathan Vanier.

Aos técnicos do CEME-Sul da Furg, Carol e Rudi, pela disponibilidade e amizade.

À todos os colegas do Programa de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, em especial aos colegas do LabGrãos, Milena e Franciene, pelo coleguismo e acolhimento.

Resumo

BRUNI, Graziella Pinheiro. Encapsulação de compostos bioativos em matrizes proteicas pela técnica de *electrospinning* para liberação controlada em embalagens de alimentos 2019, 86 p. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2019.

Electrospinning é uma técnica versátil que permite a encapsulação de compostos para inúmeras aplicações. Este trabalho está dividido em dois estudos. No primeiro estudo, objetivou-se produzir fibras de isolado proteico de soja (IPS) e álcool polivinílico (PVA) carregadas com β-caroteno através da técnica de *emulsion electrospinning*, para aplicação como recobrimento em embalagens de alimentos. As condições das soluções poliméricas utilizadas no processo de *electrospinning* como método de desnaturação das soluções protéicas e proporção de IPS:PVA foram estudadas e determinadas. Além disso, as fibras produzidas por *emulsion electrospinning* carregadas com β-caroteno foram avaliadas para liberação em meio simulante de alimentos gordurosos (óleo de soja) e submetidas ao processo de annealing visando a utilização como recobrimento em material biodegradável. As fibras contendo β-caroteno apresentaram 51,4% de eficiência de encapsulação após o processo de *electrospinning*. O processo de *annealing* realizado no recobrimento promoveu a fusão das fibras no material de polihidroxialcanoatos (PHA), sugerindo aplicação promissora na área de embalagens bioativas. No segundo estudo, objetivou-se encapsular o extrato de erva-mate em fibras de zeína pela técnica de *electrospinning* e avaliar seu potencial como matriz de liberação para embalagens de alimentos. O extrato de erva-mate foi incorporado nas soluções poliméricas de zeína nas concentrações de 1, 3 e 5%. Após o processo de *electrospinning* as fibras com as diferentes concentrações de extrato de erva-mate foram caracterizadas quanto a morfologia, aos grupos funcionais, propriedades térmicas, cinética de liberação em meio simulante de alimentos hidrofílicos (etanol 10%) e atividade antioxidante. As fibras no geral apresentaram morfologia homogênea e as fibras de zeína carregadas com 5% de extrato de erva-mate apresentaram liberação de aproximadamente 50% do extrato em meio hidrofílico e alta atividade antioxidante frente ao radical DPPH (61 a 83% inibição). Esses resultados mostraram que as fibras produzidas no presente trabalho tem potencial para o uso em embalagens de alimentos com ação antioxidante.

Palavras-chave: isolado proteico de soja; zeína; carotenoides; compostos fenólicos; emulsão; fibras.

Abstract

Electrospinning is a versatile technique that allows compound encapsulation for numerous applications. This paper is divided into two studies. The first study aimed to produce β-carotene-loaded soy protein isolate (IPS) and polyvinyl alcohol (PVA) fibers using the electrospinning emulsion technique for application as a coating on food packaging. The conditions of the polymeric solutions used in the electrospinning process as a protein solution denaturation method and IPS: PVA ratio were studied and determined. In addition, the electrospinning emulsion fibers loaded with β-carotene were evaluated for release in simulant medium of fatty foods (soybean oil) and submitted to the annealing process for use as a coating on biodegradable material. The β-carotene-containing fibers showed 51.4% encapsulation efficiency after the electrospinning process. The annealing process performed in the coating promoted the fusion of the fibers in the polyhydroxyalkanoate (PHA) material, suggesting a promising application in the bioactive packaging area. The second study aimed to encapsulate yerba mate extract in zein fibers by the electrospinning technique and to evaluate its potential as a release matrix for food packaging. Yerba mate extract was incorporated into the zein polymer solutions at concentrations of 1, 3 and 5%. After the electrospinning process the fibers with the different concentrations of yerba mate extract were characterized in terms of morphology, functional groups, thermal properties, release kinetics of hydrophilic food (10% ethanol) and antioxidant activity. The fibers in general presented homogeneous morphology and the zein fibers loaded with 5% yerba mate extract showed approximately 50% release of the extract in hydrophilic medium and high antioxidant activity against the DPPH radical (61 to 83% inhibition). These results showed that the fibers produced in the present work have potential for use in food packaging with antioxidant action.

Key words: *soy protein isolate; zein; carotenoids; phenolic compounds; emulsion; fibers.*

Lista de Figuras

Figura 1- Estrutura de alguns carotenoides com atividade pró vitamina A. 18
Figura 2- Principais compostos orgânicos no extrato de erva-mate.....20
Figura 3- Esquema de um aparelho típico de *electrospinning*.....22
Figura 4- Microscopia eletrônica de varredura (MEV) de fibras de zeína em diferentes concentrações: 30% (a) e 20% (b), *beads* indicados por setas vermelhas. 27
Figura 5 - (a) Esquema dos principais tipos de embalagens de alimentos ativos; (b) representação da membrana de fibras de *electrospinning* (em verde) contendo enzimas (em vermelho) que foram encapsuladas dentro da fibra (esquerda) ou adsorvidas na superfície (direita) da fibra.. 28
Figura 6- Termogramas de DSC da proteína nativa e proteína desnaturada pelo método básico (pH 11), método ácido (pH 2) e por uso do calor. 40
Figura 7- Imagens de MEV elaboradas com IPS nativo (A), IPS pH 11 (B), IPS pH 2 (C) e IPS calor (D). 41
Figura 8- Imagens de MEV das fibras elaboradas com IPS:PVA nas proporções de 0:100 (A), 25:75 (B), 50:50 (C) e 60:40 (D). 44
Figura 9- Microscopia óptica das emulsões de IPS:PVA preparadas por HAV (A), US (B), HAV+US (C) e das emulsões de PVA preparadas por HAV (D), US (E) e HAV+US (F). 48
Figura 10- Imagem de MEV (A) e distribuição de tamanho de partícula (B) das fibras carregadas com β-caroteno. 49
Figura 11- Fibras de IPS:PVA e fibras de PVA com β-caroteno (0 hour) (A-B) e depois de 24 hours (C-D), respectivamente.....50
Figura 12- Primeira derivada (DTG) das fibras carregadas com β-caroteno, álcool polivinílico puro, β-caroteno puro e IPS. 51
Figura 13- Espectros de FT-IR das fibras carregadas com β-carotene (A), PVA (B), óleo de soja (C), β-caroteno (D) e IPS (E). 52
Figura 14- Imagem de MEV do corte transversal e da surperfície dos recobrimentos sem annealing (A- B) com annealing (C-D), respectivamente. 54
Figura 15- Perfil de liberação do β-caroteno a partir das fibras sem annealing (a) e com annealing (b), no meio simulante de alimentos gordurosos. 54
Figura 16- DSC das fibras de IPS:PVA sem tratamento de *annealing* (a) e com tratamento de *annealing.* 55
Figura 17- Morfologia e distribuição de tamanho das fibras de zeína carregadas com extrato de erva-mate 0% (a - b), 1% (c - d), 3% (e - f) e 5% (g - h). 66
Figura 18- Espectros de FTIR do extrato de erva-mate e das fibras de zeína carregados com extrato de erva-mate (0%, 1%, 3% e 5%). 67

Figura 19- Análise termogravimétrica (TGA) (a) e suas primeiras derivadas (DTG) (b) de extrato de erva-mate e fibras de zeína carregadas com extrato de erva-mate (0%, 1%, 3% e 5%). 69
Figura 20- Atividade antioxidante do extrato de erva-mate e fibras de zeína carregadas com extrato de erva-mate (0%, 1%, 3% e 5%). 71
Figura 21- Liberação in vitro de extrato de erva-mate de fibras de zeína carregadas com diferentes concentrações de extrato de erva-mate (0%, 1%, 3% e 5%). 72

Lista de tabelas

Tabela 1- Parâmetros do electrospinning e seus efeitos habituais na morfologia das fibras. 23

Tabela 2- Tensão superficial, condutividade elétrica e comportamento reológico da solução proteica.....42

Tabela 3- Tensão superficial, condutividade elétrica e comportamento reológico das emulsões. .45

Tabela 4- Estabilidade gravitacional das emulsões: imagens das emulsões após armazenamento por 0, 5 e 24 horas e valores de seu índice de *creaming* (IC).....46

Tabela 5- Parâmetros do método CLAE -EM para quantificação de compostos fenólicos em extrato de erva-mate e fibras de zeína.....60

Tabela 6- Parâmetros reológicos e condutividade elétrica de soluções de zeína em diferentes concentrações de extrato de erva-mate (0%, 1%, 3% e 5%). 64

Tabela 7- Composição fenólica (µg g^{-1}) do extrato de erva-mate e fibras de zeína carregadas com diferentes concentrações de extrato de erva-mate (0%, 1%, 3% e 5%).....70

Sumário

1 INTRODUÇÃO 15
2 OBJETIVOS 16
2.1 Objetivo geral 16
2.2 Objetivos específicos 16
3 REVISÃO DA LITERATURA 17
3.1 Compostos bioativos 17
3.1.1 Carotenoides 17
3.1.2 Extrato de erva mate 19
3.2 Encapsulação pela técnica de *Electrospinning* 21
3.3 Matrizes proteicas 25
3.3.1 Proteína de soja 25
3.3.2 Zeína 26
3.4 Embalagens bioativas 27
4 CAPÍTULO 1 – ENCAPSULAÇÃO DE β-CAROTENO PELA TÉCNICA DE "*EMULSION ELECTROSPINNING*" PARA APLICAÇÃO COMO RECOBRIMENTO BIOATIVO DE EMBALAGENS DE ALIMENTOS. 31
4.1 Introdução 31
4.2 Material e métodos 33
4.2.1 Materiais 33
4.2.2 Fluxograma 33
4.2.3 Preparação das dispersões aquosas de IPS e IPS: PVA 35
4.2.4 Preparação de emulsões de β-caroteno-IPS: PVA 35
4.2.5 Caracterização das soluções poliméricas 36
4.2.6 Processamento via *electrospinning* das soluções 37
4.2.7 Caracterização morfológica dos materiais 37
4.2.8 Análise de infravermelho por transformada de Fourier (FT-IR) das fibras 38
4.2.9 Estabilidade térmica das fibras 38
4.2.10 Integridade estrutural das fibras em água 38
4.2.11 Eficiência de encapsulação 38
4.2.12 Ensaios de liberação *in vitro* de β-caroteno 39
4.2.13 Análise estatística 39
4.3 Resultados e Discussão 40
4.3.1 Caracterização de soluções proteicas desnaturadas 40

4.3.2 Otimização da proporção de IPS:PVA para formação das fibras por *electrospinning* 40
4.3.3 Caracterização das emulsões O/A....44
4.3.4 Caracterização morfológica, térmica e estabilidade das fibras 49
4.3.5 Análise por infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR) das fibras....51
4.3.6 Eficiência de Encapsulação (EE) 52
4.3.7 Caracterização morfológica do recobrimento bioativo e ajuste das propriedades de liberação 53
4.4 Conclusão....56
5 CAPÍTULO 2 – ENCAPSULAÇÃO DE EXTRATO DE ERVA-MATE POR MEIO DA TÉCNICA DE E*LECTROSPINNING* PARA LIBERAÇÃO CONTROLADA EM EMBALAGENS DE ALIMENTOS. 57
5.1 Introdução....57
5.2 Material e Métodos....59
5.2.1 Materiais 59
5.2.2 Obtenção do extrato de erva-mate 59
5.2.3 Compostos fenólicos totais 59
5.2.4 Compostos fenólicos individuais 59
5.2.5 Preparação de soluções poliméricas de zeína 61
5.2.6 Caracterização das soluções poliméricas....61
5.2.7 Produção de fibras pela técnica de *electrospinning* 61
5.2.8 Morfologia e distribuição de diâmetro das fibras 62
5.2.9 Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) das fibras....62
5.2.10 Propriedades térmicas das fibras....62
5.2.11 Cinética de liberação in vitro 62
5.2.12 Atividade antioxidante 63
5.2.13 Análise estatística....63
5.3 Resultados e Discussão....63
5.3.1 Caracterização de soluções de *electrospinning* 63
5.3.2 Caracterização das fibras....65
5.4 Conclusão....73
REFERÊNCIAS 75

1 INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, impulsionados pelas crescentes demandas por melhoria na saúde ou prevenção de doenças através da dieta, compostos bioativos, tais como polifenóis, carotenoides, minerais, ácidos graxos, proteínas ou peptídeos bioativos, probióticos, etc., têm sido intensamente investigados por suas possíveis aplicações na área farmacêutica, nutracêutica e de alimentos funcionais (WEN et al., 2017; ANU BHUSHANI; ANANDHARAMAKRISHNAN, 2014; DIAS; FERREIRA; BARREIRO, 2015).

Vários são os compostos bioativos de interesse para a indústria visando a aplicação em embalagens de alimentos. O β-caroteno, por exemplo, tem sido estudado para diversas aplicações, principalmente devido a sua ação pró-vitamina A (DAMODARAM et al., 2010; MOLINA, 2014) que confere características antioxidantes com ação protetora contra doenças cardiovasculares. Por outro lado, estudos recentes também têm mostrado a potencialidade de extratos ricos em compostos fenólicos, como é o caso do extrato de erva-mate (*Ilex paraguariensis*). Ambos compostos podem ser utilizados como aditivos alimentares, no entanto, a baixa estabilidade durante o processamento ou armazenamento de alimentos compromete significativamente os benefícios desses compostos, limitando, assim, suas aplicações. Portanto, é desejável uma abordagem eficaz que possa preservar a atividade biológica e obter liberação controlada de compostos bioativos (WEN et al., 2017).

A encapsulação é um método utilizado para aprisionar compostos bioativos dentro de um material polimérico, com a finalidade de proteger e fornecer a liberação controlada destes compostos, e tem sido aplicado em diversos materiais (EZHILARASI et al., 2013). Recentemente, a técnica de *electrospinning* foi proposta como uma técnica viável para encapsular compostos bioativos. Essa técnica baseia-se no processamento eletro-hidrodinâmico de soluções ou dispersões poliméricas (GOMEZ-MASCARAQUE; LOPEZ-RUBIO, 2016), consistindo de um método versátil para produzir fibras com alta relação superfície/volume e alta porosidade. Além disso, compostos bioativos encapsulados em fibras de *electrospinning*, possuem estabilidade às condições de processamento de alimentos e funcionalidades avançadas.

A encapsulação de compostos bioativos em fibras é realizada através da mistura desses compostos com a solução polimérica seguida do processamento via *electrospinning*. Em relação às matrizes de encapsulação, os polímeros de grau alimentício, como as proteínas, têm sido utilizadas, devido sua biocompatibilidade,

biodegradabilidade e não toxidade (GHORANI; TUCKER, 2015). Proteínas vegetais como a proteína de soja e a zeína apresentam propriedades estruturais e funcionais para a obtenção de fibras pela técnica de *electrospinning* para várias aplicações, desde aplicações biomédicas na liberação controlada de fármacos, (KHADKA; HAYNIE, 2012) até na liberação de compostos antimicrobianos e antioxidantes para embalagens de alimentos (SILVA et al., 2018; ANTUNES et al., 2017).

Portanto, a partir da literatura supracitada, objetivou-se com esse trabalho encapsular, através da técnica de *electrospinning,* o β-caroteno e o extrato de erva mate em fibras elaboradas a partir de matrizes proteicas, para liberação controlada em embalagens de alimentos.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Encapsular β-caroteno e extrato de erva-mate em fibras de matrizes proteicas, através da técnica de *electrospinning* e avaliar a cinética de liberação destes compostos em sistemas que simulantes de alimentos.

2.2 Objetivos específicos

Encapsular β-caroteno em fibras de isolado proteico de soja (IPS) e álcool polivinílico (PVA) e avaliar sua morfologia, grupos funcionais, estabilidade térmica, integridade estrutural em água, eficiência de encapsulação e cinética de liberação em meio simulante de alimentos gordurosos.

Caracterizar o extrato de erva-mate quanto aos compostos fenólicos individuais, totais e quanto a sua atividade antioxidante.

Encapsular extrato de erva-mate em fibras de zeína e avaliar sua morfologia, grupos funcionais, estabilidade térmica, atividade antioxidante e cinética de liberação em meio simulante de alimentos hidrofílicos.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Compostos bioativos

Os compostos bioativos são compostos que podem ser enquadrados como essenciais e não essenciais que ocorrem na natureza, fazem parte da cadeia alimentar e podem ter efeitos benéficos sobre a saúde humana. Os compostos bioativos podem variar de nutrientes isolados, suplementos dietéticos, produtos à base de ervas e alimentos processados, como cereais, sopas e bebidas. A base para o crescente interesse em compostos bioativos está em estudos epidemiológicos que mostram que uma dieta específica ou o consumo de algum componente da dieta está associado a um menor risco de doenças crônicas. Os compostos estudados mais extensivamente são os antioxidantes, cujo aumento no consumo pode evitar o risco de doenças crônicas, incluindo câncer e doenças cardiovasculares e podem ser aplicados alimentos retardando ou inibindo a oxidação. (BIESALSKI et al., 2009). Correspondem aos antioxidantes naturais, compostos nitrogenados, carotenoides e compostos fenólicos (VELIOGLU et al., 1998). Alguns desses grupos de compostos naturais serão apresentados separadamente na seção seguinte.

3.1.1 Carotenoides

Diante da diversidade de compostos bioativos, os carotenoides destacam-se pois são corantes naturais e apresentam atividade biológica, promovendo benefícios à saúde (MARTINS et al., 2016). Tal fato tem favorecido o aumento da utilização de carotenoides não só na indústria de alimentos, como também nas indústrias farmacêutica, nutracêutica e cosmecêutica (MARTÍN et al., 2007). A ocorrência de carotenoides na natureza é abrangente e eles podem ser encontrados em diversos seres vivos (MESQUITA et al., 2017). Estes compostos são lipossolúveis e responsáveis pela cor amarela, laranja e vermelha de muitos alimentos de origem vegetal e alguns de origem animal (MATIOLI & RODRIGUEZ-MAIA, 2003).

Existem basicamente duas classes de carotenoides, os carotenos e as xantofilas. Os carotenos se caracterizam pela presença de uma cadeia hidrocarbônica linear ou cíclica em um ou nos dois terminais da molécula. Já as xantofilas, compreendem os derivados oxigenados dos carotenos (JIN et al., 2003). A base estrutural dos carotenos são unidades de isopreno ligadas covalentemente na forma cabeça-cauda ou cauda-cauda, sendo que algumas estruturas podem ter grupos cíclicos terminais (caso do β-

caroteno) ou então apenas uma ou nenhuma ciclização (por exemplo, o licopeno). Os carotenoides com esqueleto carbônico mais curto são conhecidos como apocarotenais (por exemplo, a bixina). Dos carotenoides conhecidos, aproximadamente 40 tipos possuem atividade pró-vitamina A (OLLILAINEN et al., 1988), como o β-caroteno, α-caroteno, γ-caroteno e criptoxantina (Figura 1), que apresentam em sua estrutura molecular um anel beta-ionona não substituído, responsável pela ação biológica. Em decorrência da presença das insaturações, os carotenoides são sensíveis à luz, temperatura, acidez, bem como às reações de oxidação (AMBRÓSIO et al., 2006).

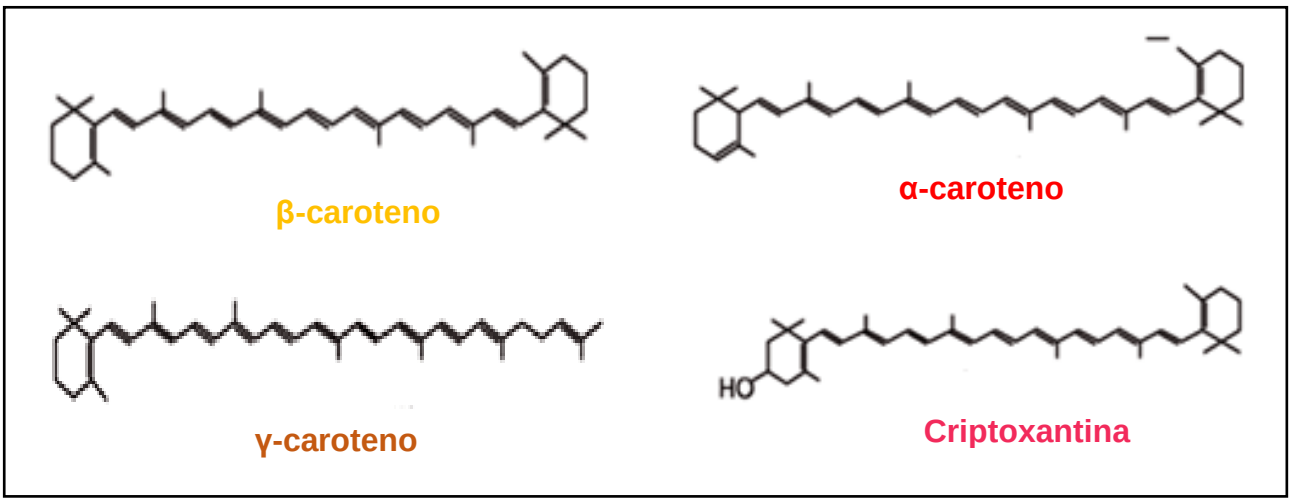


Figura 1- Estrutura de alguns carotenoides com atividade pró vitamina A. Adaptado de: AMBRÓSIO et al., 2006.

Cabe destacar que dentre os carotenoides, o β-caroteno é o que apresenta maior ação pró-vitamina A (DAMODARAM et al., 2010; MOLINA, 2014) caracterizando-se como um potente antioxidante com ação protetora contra doenças cardiovasculares. A oxidação do LDL-colesterol é fator crucial para o desenvolvimento da aterosclerose e o β-caroteno atua inibindo o processo de oxidação da lipoproteína (AMBRÓSIO et al., 2006; OSGANIAN et al., 2003; GALE et al., 2001).

O β-caroteno quando presente de forma endógena nos alimentos é estável, no entanto, sua aplicação como aditivo em alimentos se torna difícil, pois além de ser um composto insolúvel em água, durante o processamento devido a mistura com produtos químicos e exposição, sua estabilidade oxidativa diminui muito (HENTSCHEL et al., 2008; HELGASON et al. 2009). Porém, a aplicação do β-caroteno em alimentos pode ser realizada através da encapsulação (RATNAM et al., 2006). Através da encapsulação do

β-catoreno, é possível utiliza-lo como antioxidante em alimentos, visando a prevenção de reações de oxidação. A atividade antioxidante do β-catoreno está associada à capacidade de deslocar elétrons através de sua estrutura de ligações duplas conjugadas. Além disso, o β-catoreno é capaz de retirar o oxigênio singlete, auxiliando assim na proteção dos lipídios contra danos peroxidativos (ALVES et al., 2010).

Na literatura são relatados alguns trabalhos que encapsularam o β-caroteno através de diferentes técnicas. No estudo de Kong, Bhosale e Ziegler (2018) o β-caroteno foi encapsulado em um complexo de inclusão de amilose visando uma nova tecnologia de encapsulamento eficaz para incorporar moléculas hidrofóbicas. Os autores verificaram que o β-caroteno permanece estável. López-Rubio e Lagaron (2012) encapsularam o β-caroteno via técnica de *electrospinning* utilizando como matriz o concentrado de proteína de soro de leite. Os autores relataram que as cápsulas obtidas apresentaram alta atividade antioxidante. Já Gómez-Mascaraque et al. (2017) encapsularam β-caroteno através da técnica de *emulsion-electrospraying* utilizando como matrizes a zeína e o concentrado de proteína de soro de leite. Os autores observaram que através dessa técnica houve um aumento na bioacessibilidade *in vitro* do β-caroteno.

3.1.2 Extrato de erva mate

A erva mate (*Ilex paraguariensis*) é utilizada há séculos para a preparação de bebidas estimulantes ou por suas propriedades medicinais, sendo popular na região que compreende Paraguai, Uruguai, Nordeste Argentino e Sul do Brasil, (BRACESCO et al., 2011). O extrato de erva-mate (*Ilex paraguariensis*) é fonte de compostos bioativos (Figura 2), incluindo polifenóis, xantinas, flavonoides, saponinas, aminoácidos, minerais e vitaminas (HECK; MEJÍA, 2007). De acordo com Riachi e De Maria (2017) os principais compostos fenólicos presentes nesse extrato que são os ácidos clorogênicos como por exemplo, os ácidos cafeoilquínico, ferulilquínico e dicafoilquínico. Além disso, os flavonóides mais comuns são a quercetina e a rutina. Compostos como saponinas triterpênicas formadas com agliconas oleanólicas e ursólicas também são identificados no extrato de erva-mate (GNOATTO et al., 2005 ; HECK; DE MEJIA, 2007). Esses compostos são responsáveis pela formação de espuma e pelo sabor amargo típico do chimarrão. Mais recentemente, a luteína também foi identificada (SILVEIRA et al., 2016).

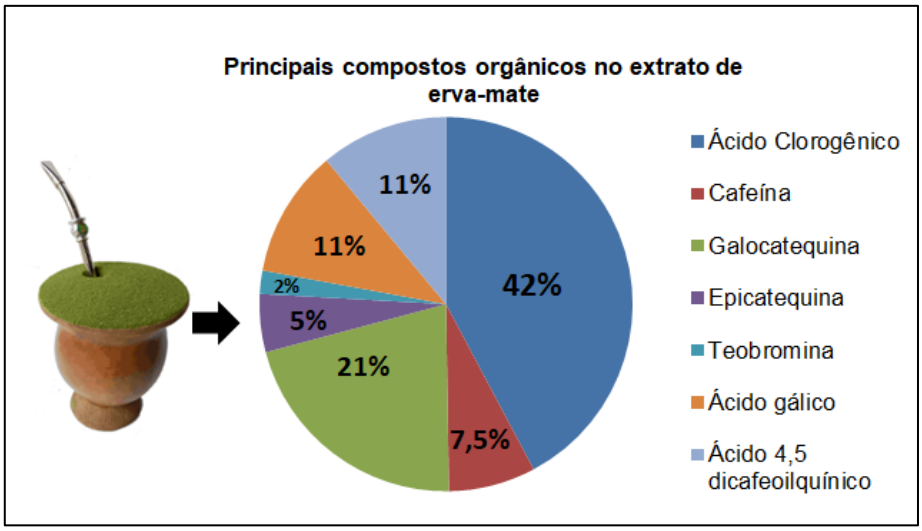


Figura 2- Principais compostos orgânicos no extrato de erva-mate. Adaptado de: BRACESCO et al., 2011.

Compostos fenólicos são metabólitos secundários, amplamente encontrados em plantas (RISPAIL; MORRIS; WEBB, 2005) que apresentam elevado potencial antioxidante e são associados à prevenção de algumas doenças degenerativas associadas ao estresse oxidativo (SCALBERT et al., 2005). De acordo Gugliucci et al. (2009), o extrato da erva mate apresenta teores de compostos fenólicos superiores aos do chá verde e dos vinhos tintos, o que lhe confere um alto potencial de atividade antioxidante. No entanto, os compostos fenólicos são instáveis na presença de luz, têm baixa biodisponibilidade, devido à sua fraca solubilidade e apresentam sabor amargo, o que associado aos demais fatores limita sua aplicação na indústria de alimentos (ESFANJANI et al., 2018; MUNIN; EDWARDS-LEVY, 2011).

Deladino et al. (2008) sugerem que os antioxidantes naturais devem ser protegidos das condições de processamento, tais como exposição ao oxigênio e temperaturas elevadas, durante a produção. Com base nisso, são encontrados alguns trabalhos em que pesquisadores estudaram a encapsulação de extrato de erva mate em diferentes matrizes, como hidrogeis de amido e alginato de cálcio (LÓPEZ-CÓRDOBA et al., 2014), hidrogeis de alginato e quitosana (DELADINO et al., 2013; DELADINO et al., 2008) e matrizes de sacarose super saturada (DELADINO et al., 2007).

3.2 Encapsulação pela técnica de *Electrospinning*

Electrospinning é uma técnica de formação de fibras, que utiliza um campo eletrostático para estirar uma solução polimérica em fibras com diâmetros que variam em micro a nano escala. A técnica de *electrospinning* possui várias vantagens sobre outros métodos de encapsulação, tais como:

- ✓ Relativa facilidade de uso, para a produção de fibras;
- ✓ Fácil incorporação de compostos bioativos em fibras;
- ✓ Tamanho do material reduzido para compostos bioativos, permitindo a sua incorporação em sistemas alimentares sem afetar as qualidades sensoriais dos produtos;
- ✓ Ausência de calor durante o processo de *electrospinning*, o que pode ser de fundamental importância especialmente para compostos sensíveis a altas temperaturas.

Além disso, fibras produzidas por *electrospinning* possuem vários méritos estruturais e funcionais, tais como diâmetros de sub-micron a nano escala, alta razão superfície-volume, alta porosidade e alta eficiência de encapsulação para compostos bioativos. Em virtude dessas vantagens estruturais, os compostos bioativos encapsulados nessas fibras exibem maior estabilidade e biodisponibilidade, e podem apresentar liberação sustentada (PÉREZ-MASIÁ; LAGARON; LÓPEZ-RUBIO, 2014). Com base nessas vantagens, a técnica de *electrospinning* mostrou potencial para utilização no campo da ciência de alimentos, principalmente na fabricação de matrizes funcionais para embalagens ativas. Uma estação típica de *electrospinning* consiste em uma fonte de alimentação de alta voltagem, seringa bombeadora, uma agulha metálica e um coletor condutor, como ilustrado na Figura 3 (MERCANTE et al., 2017). Vale destacar que devido ao campo elétrico gerado ocorre a transformação de uma góticula de solução polimérica em uma estrutura chamada cone de Taylor, evidenciado na Figura 3. Se a viscosidade e a tensão de superfície da solução forem apropriadas, a quebra deste cone é evitada e é formado um jato estável. O cone de Taylor é causado por um equilíbrio entre a força eletrostática da superfície carregada e a superfície de tensão. Um aumento da tensão aplicada leva ao alongamento do cone; quando este excede o máximo de voltagem admitida, o cone passa a um jato irregular (OLIVEIRA, 2011).

No processo de *electrospinning,* um dos aspectos de maior importância para direcionar a aplicação dos materiais obtidos é a morfologia das fibras. Dependendo do tipo de morfologia que se deseja os parâmetros inerentes à solução polimérica (por exemplo, massa molar do polímero, concentração, viscosidade, condutividade), e ao processo (por exemplo, tensão aplicada, distância da seringa-coletor, taxa de alimentação da solução polimérica) podem ser otimizados (CHEN et al., 2016; UANG et al., LI et al., 2013).

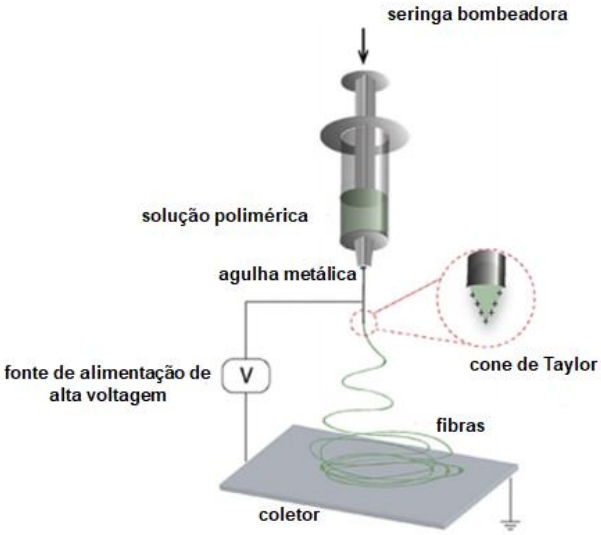


Figura 3- Esquema de um aparelho típico de *electrospinning*. Adaptado de: Mercante et al., 2017.

Na Tabela 1 estão apresentados, de forma resumida, os efeitos habituais sobre a morfologia das fibras de diversos parâmetros experimentais do processo de *electrospinning*.

Tabela 1- Parâmetros do *electrospinning* e seus efeitos habituais na morfologia das fibras.

Parâmetros	Efeito na morfologia das fibras
Parâmetros da solução polimérica	
Massa molar do polímero	Redução do número de gotículas com o aumento da massa molar.
Concentração de polímero	Aumento do diâmetro da fibra com o aumento da concentração da solução polimérica.
Viscosidade	Redução do número de gotículas e aumento do diâmetro da fibra com o aumento da viscosidade.
Condutividade	Diminuição do diâmetro da fibra com o aumento da condutividade
Parâmetros de processo	
Tensão Elétrica Aplicada	Diminuição do diâmetro da fibra com o aumento da tensão aplicada
Taxa vazão	Aumento do diâmetro da fibra com o aumento da vazão. Taxas de fluxo elevadas produzem fibras com diâmetros maiores que não são secas ao atingir o coletor e aumentam o número de *beads*.
Tipo de coletor	Alterando os coletores (placa, tambor, área, etc.), podem ser obtidas fibras alinhadas, fios ou trançados.

Adaptado de: MERCANTE et al., 2017.

Pesquisas revelam as vantagens e potenciais aplicações da técnica de *electrospinning* para a encapsulação de compostos bioativos como, por exemplo, a vantagem em melhorar a estabilidade e biodisponibilidade de moléculas bioativas e aumentar a viabilidade de probióticos, que são de extrema importância para o desenvolvimento de novos produtos funcionais. Outra importante vantagem é a capacidade de mascarar odores e sabores indesejáveis para melhorar a aceitação de certos produtos. As fibras obtidas, também podem ser usadas como sistemas de transporte para a liberação controlada e sustentada de produtos nutracêuticos ou farmacêuticos (MASCHERONI et al., 2013). Além disso, o *electrospinning* também é uma técnica promissora para a fabricação de materiais de embalagens ativas ou produção de camadas nanoestruturadas para embalagens de alimentos, que têm como aplicações o controle do crescimento microbiano e a inibição de reações de degradação oxidativa (WHEN et al., 2017). Todas essas aplicações estão associadas à composição do bioativo de interesse e à matriz no qual serão encapsulados.

Diversas são as matrizes utilizadas para a produção de fibras pela técnica de *electrospinnig* e a escolha dessa matriz muitas vezes está associada à natureza do polímero e do composto pelo qual se deseja encapsular. Também está associada à aplicação das fibras. Para a encapsulação de compostos bioativos na indústria de alimentos, os polímeros de grau alimentício, como as proteínas e os polissacarídeos, são de grande interesse, pois são biocompatíveis e biodegradáveis, renováveis, sustentáveis e não apresentam toxidade. Em contraste, eles apresentam propriedades mecânicas fracas, resultando em materiais frágeis em comparação aos polímeros sintéticos (SELL et al., 2010; RAMAKRISHNA et al., 2006). Polímeros naturais, como as proteínas, têm sido largamente utilizadas para encapsulação de compostos lipofílicos utilizando-se a técnica de *emulsion* electrospinning (SILVA et al., 2018; ANTUNES et al. 2017; GOMEZ-MASCARAQUE; LOPEZ-RUBIO, 2016).

Emulsion-electrospinning é uma técnica nova e simples para fabricar fibras de “núcleo-casca” que podem ser desenvolvidas para incorporar compostos bioativos de natureza lipofílica. A técnica consiste na fiação de uma emulsão de água em óleo (A/O) ou de óleo em água (O/A) em que os dois líquidos imiscíveis são estabilizados por um emulsificador. A vantagem da técnica de *emulsion-electrospinning* é que compostos bioativos encapsulados ficam aprisionados na matriz das fibras antes de entrar no meio circundante, assim esta abordagem pode efetivamente evitar a liberação precoce de compostos bioativos sem comprometer sua bioatividade (ZHANG; FENG; ZHANG, 2018). Em geral, as proteínas possuem propriedades emulsificantes, o que facilita a preparação da solução polimérica para a técnica de *emulsion-electrospinning*. Tavassoli-Kafrani, Goli e Fathi (2018) encapsularam óleo essencial de laranja em fibras de gelatina por *emulsion-electrospinning* e observaram que, embora a liberação inicial ocorresse nas primeiras 4 h, as fibras proporcionavam uma liberação controlada do óleo essencial após 8 h, aumentando a estabilidade do óleo diante do armazenamento. Portanto, o uso de matrizes proteicas para encapsulação de compostos lipofílicos pela técnica de *emulsion-electrospinning* torna-se promissor para aplicação na liberação controlada de compostos bioativos.

3.3 Matrizes proteicas

As proteínas são biomoléculas que consistem em aminoácidos de cadeia longa que desempenham um papel importante na catalisação das funções vitais do corpo, como replicação do DNA, reações metabólicas, respostas à estímulos, transportes de moléculas etc (SCHEIBEL, 2005). As proteínas conferem elasticidade, mobilidade, locomoção e estabilização para as células. Além disso, também auxiliam na fixação, crescimento e diferenciação das células. Sendo componentes intrínsecas do corpo, as proteínas são facilmente biocompatíveis e biodegradáveis. Devido às propriedades estruturais e funcionais, as proteínas de origem vegetal e animal têm sido exploradas para a obtenção de fibras pela técnica de *electrospinning* visando desde aplicações biomédicas (KHADKA; HAYNIE, 2012) até para embalagens de alimentos (SILVA et al., 2018; ANTUNES et al., 2017). Além disso, as proteínas são matrizes particularmente interessantes para serem utilizadas no preparo de emulsões para a técnica de *emulsion electrospinning*, uma vez que as suas estruturas anfifílicas permitem a sua utilização como emulsionantes eficazes (MCCLEMENTS, 2004).

3.3.1 Proteína de soja

A proteína de soja é uma proteína biodegradável de origem vegetal que é abundante em aminoácidos como ácido aspártico, ácido glutâmico, glicina, alanina, valina, leucina, lisina, arginina e menos de 1% de cisteína. A partir da proteína de soja podem ser obtidas produtos como o concentrado proteico (CP); a farinha de soja desengordurada e o isolado proteico de soja (IPS). Entre eles, o IPS é a forma mais pura, sendo amplamente usado na indústria de embalagens de alimentos. Materiais obtidos a partir de IPS como micropartículas, termoplásticos e membranas têm mostrado excelentes características como carreadores de fármacos (VAZ; FOSSEN; TUIL, 2003). As aplicações do IPS nas diferentes áreas se difundiram ainda mais através da técnica de *electrospinning*. Por outro lado, fibras obtidas a partir de IPS apresentam baixa flexibilidade e baixa resistência à tração, o que limita sua aplicação em embalagens de alimentos. O IPS também apresenta baixa solubilidade em solventes orgânicos, o que acaba restringindo seu uso para produção de fibras por *electrospinnig* em embalagens de alimentos (BABITHA et al., 2018). No entanto, essas desvantagens podem ser superadas através da desnaturação do IPS, visto que parâmetros como pH e temperatura tem influência nas soluções e

desempenham um papel importante na formação de fibras (LODHA; NETRAVALI, 2005; LI et al., 2009).

Cho, Netravali e Joo (2010) observaram que aumentando o grau de desnaturação da solução de IPS ocorria a diminuição na viscosidade da solução, e que devido à alta tensão superficial da água e à baixa viscosidade da solução ocorria a formação de *beads* nas fibras produzidas pela técnica de *electrospinning*. Outro fato que deve ser ressaltado é que o IPS é uma proteína globular e, portanto, não pode produzir fibras fortes por si só, por isso diversos autores utilizam polímeros transportadores para fornecer força necessária e, assim, ajudar a formação das fibras (CHO et al., 2012). Na literatura são encontrados estudos em que o IPS foi combinado com polímeros transportadores como o álcool polivinílico (PVA) (CHO et al., 2012), o óxido de polietileno (PEO) (XU et al., 2012; Wang et al., 2013), o poli(butileno adipato co-tereftalato) (CHEN; ZHANG, 2009) e a quitosana (SILVA; REIS, 2010) para a obtenção de fibras pela técnica de *electrospinning.* No estudo de Cho, Netravali e Joo (2010) foi constatado que PVA adicionado na solução de IPS forma fibras homogêneas, com melhores propriedades mecânicas. O PVA, é um polímero hidrofílico que se biodegrada lentamente, é bem pesquisado na área biomédica e atualmente vem sendo utilizado para a elaboração de fibras através da técnica de *electrospinning* (GHOSAL et al., 2019).

3.3.2 Zeína

A zeína é a principal proteína de armazenamento do milho (GUO et al., 2005; HUDSON, 1997). Consiste em quatro componentes (alfa, beta, gama e delta) com diferentes cadeias peptídicas, tamanhos moleculares e solubilidades. O componente mais abundante na zeína comercial é a alfa-zeína que possui grupos complexos de prolaminas com pesos moleculares de 19 e 22 kDa (PARRIS et al., 2001), e compreende 70-85% de toda a zeína (SHUKLA; CHERYAN, 2001). A zeína é a uma proteína que tem sido estudada para o desenvolvimento de fibras pela técnica de *electrospinning* para diversas aplicações (PALIWAL; PALAKURTHI, 2014). A solução de zeína para *electrospinning*, assim como a solução de IPS comentada no item 3.3.1, pode ter seus parâmetros ajustados conforme a aplicação que se deseja. Torres-Giner et al. (2008) que caracterizaram a solução de zeína em relação à viscosidade e ao pH verificaram que a viscosidade ideal era de 108 cP e a solução polimérica ácida resultou em uma fibra lisa ao passo que a solução alcalina resultou em estruturas semelhantes a *beads*.

Para exemplificar, na Figura 4 estão apresentados exemplos de fibras de zeína lisas e homogêneas (a) e com *beads* (b) obtidas no estudo de Antunes et al. (2017).

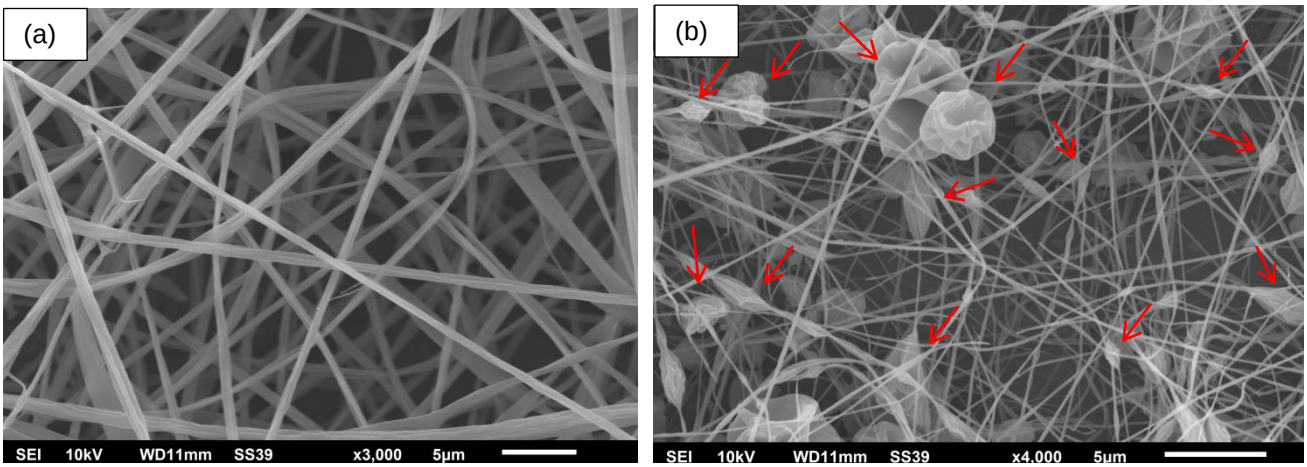


Figura 4- Microscopia eletrônica de varredura (MEV) de fibras de zeína em diferentes concentrações: 30% (a) e 20% (b), *beads* indicados por setas vermelhas. Adaptado de: ANTUNES et al., 2017.

As fibras de zeínas exibem estabilidade quando comparadas à filmes de zeína obtidos pela técnica de *casting,* devido à maior remoção do solvente durante a o processo de *electrospinning*. O diâmetro das nanofibras de zeína depende principalmente da concentração da solução. Conforme ocorre um aumento na concentração, é observado um aumento no diâmetro da fibra (NEO et al., 2012). Assim, modificando a reologia da solução e os parâmetros de processo, pode-se controlar a morfologia das fibras de zeína para as aplicações desejadas. A zeína apresenta características como tenacidade, flexibilidade, compressibilidade, brilho, hidrofobicidade e atividade antioxidante. Por isso, as fibras de zeína têm atraído muita atenção como matriz para muitas aplicações, como na liberação de medicamentos, engenharia de tecidos e em embalagens para alimentos (SHUKLA; CHERYAN, 2001; KONG; XIONG, 2006; GÜÇBILMEZ et al., 2007).

3.4 Embalagens ativas

A embalagem tradicional de alimentos tem sido usada para fornecer contenção e proteção contra mudanças externas e internas desfavoráveis durante o transporte e armazenamento. No entanto, devido à demanda dos consumidores (por exemplo, produtos de alta qualidade, mais seguros e mais frescos), o desenvolvimento de embalagens ativas tornou-se uma necessidade (ZHANG; FENG; ZHANG, 2018). Embalagem ativa pode ser definida como embalagens que contêm aditivos que mantenham ou estendem a qualidade do produto ou vida útil (BIJI; RAVISHANKAR;

MOHAN; GOPAL, 2015; YILDIRIM et al., 2018). Além disso, são descritas como embalagens que reagem a estímulos do ambiente para permitir a qualidade dos alimentos em tempo real (BROCKGREITENS; ABBAS, 2016). Em comparação com os sistemas de embalagem tradicionais, a função protetora de uma embalagem ativa é melhorada encapsulando compostos antimicrobianos, absorvedores de vapor de água, absorvedores de oxigênio, conservantes e removedores de etileno em materiais de nano escala (Figura 5).

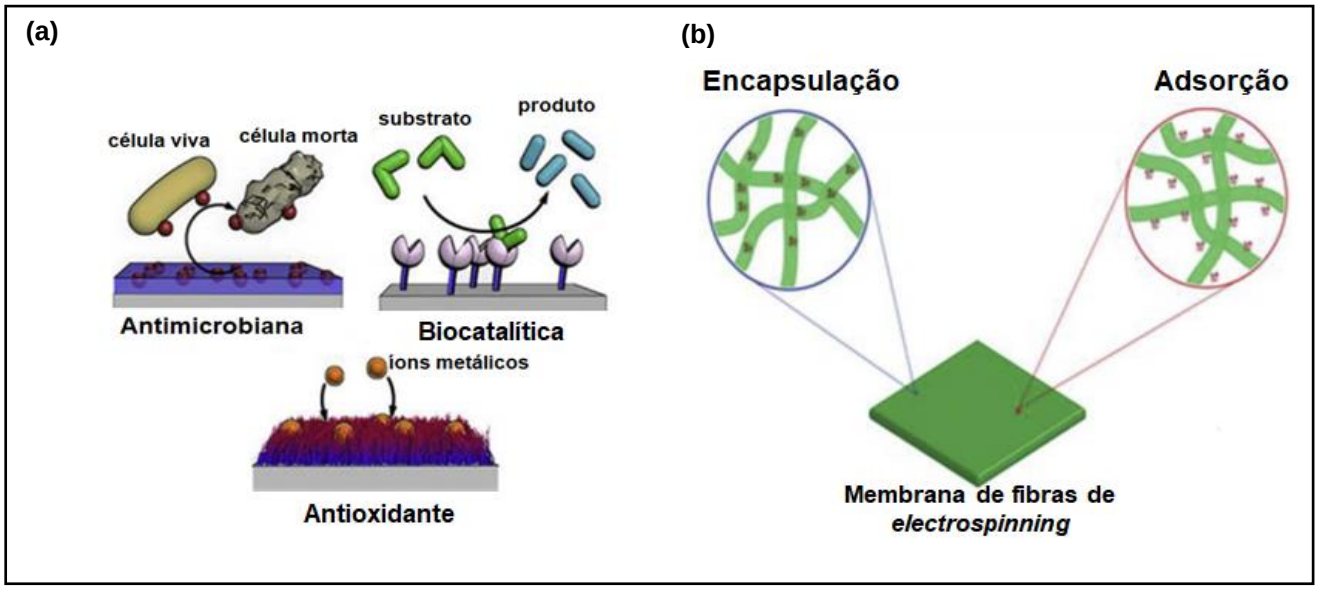


Figura 5 – (a) Esquema dos principais tipos de embalagens ativas; (b) representação da membrana de fibras de *electrospinning* (em verde) contendo enzimas (em vermelho) que foram encapsuladas dentro da fibra (esquerda) ou adsorvidas na superfície (direita) da fibra. Adaptado de: WEN et al., 2017.

No Quadro 1, estão apresentados os mais recentes compostos bioativos para embalagens de alimentos com foco em agentes antimicrobianos e antioxidantes, captadores de oxigênio e etileno e emissores de dióxido de carbono.

Quadro 1. Compostos utilizados para embalagens ativas.

Agentes bioativos para embalagens de alimentos		
Captadores de etileno		Dióxido de titânio, carbono ativado, óxidos metálicos, permanganato de potássio
Captadores de oxigênio		Paládio, ferro, ácido ascórbico, ácido gálico, glicose oxidase, pirogalol.
Antioxidantes		Óleos essenciais, extratos de plantas, α-tocoferol, lignina, compostos fenólicos
Emissores de CO_2		Bicarbonato de sódio, ácido cítrico, carbonato ferroso
Antimicrobianos		Quitosana, lisozima, óleos essenciais, lactoferrina, nisina, metais.

Adaptado de: VILELA et al., 2018.

Entre várias abordagens para a preparação de nano materiais, a tecnologia de *electrospinning* tem atraído crescente interesse devido ao seu fácil processo de operação e sua capacidade de fabricação contínua (WEISS et al., 2012). Além disso, os biopolímeros obtidos a partir de recursos naturais são considerados uma alternativa promissora aos plásticos não biodegradáveis à base de petróleo devido à sua natureza biodegradável (FARUK et al., 2012).

Atualmente, existem duas abordagens para a produção de embalagens ativas através das técnicas de *electrospinning*. A primeira abordagem é baseada em polímeros que originalmente são funcionais ou bioativos, como, por exemplo, a quitosana. As fibras elaboradas a partir de quitosana apresentam propriedades antibacterianas possibilitando prolongar o prazo de validade de alimentos frescos através da inibição do crescimento de microrganismos (TORRES-GINER; OCIO; LAGARON, 2009). A segunda abordagem é a incorporação de compostos ativos ou bioativos nas fibras, o que habitualmente envolve solubilizar ou dispersar estes compostos na solução polimérica antes do processo de *electrospinning* (TORRES-GINER, 2011). O método anterior usado para produzir fibras bioativas é a mistura direta de compostos bioativos com a matriz polimérica. No entanto, devido à baixa solubilidade / compatibilidade dos compostos com as soluções poliméricas, a funcionalidade das fibras dificilmente é alcançada na maioria dos casos. Para superar isto, os compostos bioativos podem ser alternativamente pré-incorporados na solução

poliméricas na forma de emulsões, para serem processados através da técnica de *emulsion-electrospinning*, conforme já abordado no item 3.2.

A produção de recobrimentos bioativos através da técnica de *electrospinnig* também tem sido relatada como outra classe de embalagem bioativa. As fibras quando usadas como recobrimento em materiais de embalagem melhoram suas propriedades mecânicas, ópticas e / ou funcionais. Além disso, o recobrimento pode ser utilizado para a liberação controlada de compostos bioativos ajudando na conservação e enriquecimento do alimento, dependendo da aplicação desejada (FABRA et al., 2013). Alehosseini et al. (2018) relataram que como a maioria dos compostos bioativos são altamente sensível e podem ser degradados durante o processamento térmico, sua incorporação na embalagem a granel não é viável. No entanto, uma alternativa plausível é encapsulá-los e aplicá-los como recobrimentos para a superfície da embalagem em contato com o alimentos.

4 CAPÍTULO 1 – ENCAPSULAÇÃO DE β-CAROTENO PELA TÉCNICA DE "*EMULSION ELECTROSPINNING*" PARA APLICAÇÃO COMO RECOBRIMENTO BIOATIVO DE EMBALAGENS DE ALIMENTOS.

Os resultados desse estudo estão sob revisão do periódico *Food Packaging and Shelf Life.*

4.1 Introdução

Há um interesse crescente no desenvolvimento de embalagens com materiais ativos em sua estrutura para melhorar a qualidade e a segurança dos produtos alimentícios. A incorporação de antioxidantes nas estruturas de embalagem pode representar uma série de vantagens em comparação à incorporação direta no produto alimentício. Uma dessas vantagens é a liberação mais sustentada das moléculas antioxidantes do material, promovendo impacto positivo na vida útil do produto através da manutenção dos níveis constantes de compostos antioxidantes, evitando assim a necessidade de sobrecarga alimentar com aditivos (ATAY et al., 2018; DESAI; JIN PARK, 2005).

De acordo com as preocupações ambientais atuais relacionadas ao uso de plásticos, o uso de biopolímeros para aplicações de embalagens de alimentos está ganhando atenção. Polihidroxialcanoatos (PHAs) estão entre os biopolímeros comerciais disponíveis que podem ser produzidos e processados industrialmente, e que têm propriedades térmicas, de barreira e mecânicas relativamente boas para aplicações em embalagens de alimentos. No entanto, as altas temperaturas envolvidas durante o processamento industrial desses biopolímeros (como processos de fusão ou extrusão) impedem a incorporação direta das moléculas antioxidantes dentro das estruturas de embalagem, já que esses compostos bioativos são normalmente muito sensíveis à temperatura. Como uma estratégia para a incorporação de antioxidantes dentro da estrutura da embalagem, o uso da técnica de *electrospinning* para desenvolver um recobrimento interno de embalagem é uma abordagem interessante.

Alguns trabalhos recentes (TAMPAU; GONZÁLEZ-MARTÍNEZ; CHIRALT, 2018; DENG et al., 2018; FABRA et al., 2016) mostraram o potencial da técnica de *electrospinning* para produzir estruturas multicamadas biodegradáveis, onde o uso deste

método foi crucial para obter a adesão entre os diferentes materiais usados nas estruturas multicamadas. A técnica de *electrospinning* também tem sido usada para o desenvolvimento de recobrimentos bioativos, mas pouco se sabe sobre como a modificação da estrutura das fibras pode afetar a liberação do composto nela incorporado.

Um grupo de compostos bioativos de relevância para aplicações alimentícias são os carotenoides. Os carotenoides são compostos lipofílicos que proporcionam vários benefícios à saúde humana e são responsáveis pela cor amarela presente em muitos alimentos. Em particular, o β-caroteno protege o corpo humano, reduzindo o risco de alguns tipos de câncer, bem como doenças cardíacas (RAO; RAO, 2007), e também apresenta um papel importante como antioxidante em produtos alimentícios (HOU et al., 2012). Carotenoides endógenos em alimentos geralmente são estáveis. No entanto, sua aplicação como aditivos alimentares é limitada devido à sua baixa solubilidade em água e instabilidade na presença de calor, luz, oxigênio e são propensos à degradação durante o processamento e armazenamento de alimentos (XIANQUAN et al., 2005).

Para reduzir as perdas da atividade antioxidante dos caratenóides, a incorporação dos mesmos em fibras produzidas pela técnica de *electrospinning* é uma forma viável para estabilizar e controlar sua liberação a partir das estruturas da embalgem (FABRA; LÓPEZ-RUBIO; LAGARON, 2014). Devido à natureza lipofílica do β-caroteno, a técnica de *emulsion-electrospinning* é proposta nesse estudo como uma forma promissora para encapsular o β-caroteno em materiais formadores de fibras hidrofílicas (BABITHA et al., 2017; GÓMEZ-MASCARAQUE et al., 2017a). Esta técnica baseia-se no processamento electro-hidrodinâmico de emulsões estáveis, neste caso emulsões óleo-em-água (O / A) sendo o carotenoide disperso em um óleo transportador formando as gotículas de emulsão na solução polimérica.

O isolado de proteína de soja (IPS) é amplamente utilizado na indústria alimentícia por suas propriedades funcionais (SILVA et al., 2018). O IPS é considerado um excelente material de suporte devido às suas propriedades emulsionantes e estabilizantes (MCCLEMENTS; LI, 2010). No entanto, o IPS é uma proteína globular com baixa solubilidade em solventes orgânicos e propriedades mecânicas deficientes, o que dificulta a formação de fibras através da técnica de *electrospinning* (CHO et al. 2012). Uma opção para desenvolver estruturas de encapsulação usando IPS é misturá-lo com um polímero formador de fibra, como o álcool polivinílico (PVA), que é biodegradável e amplamente utilizado no campo da biomedicina (CHO et al., 2012).

Trabalhos anteriores relataram o desenvolvimento de fibras híbridas de IPS: PVA (CHO et al., 2012, FANG et al., 2016; ZHANG et al., 1999). No entanto, a capacidade para o encapsulação de β-caroteno e o uso dessas fibras como recobrimento de embalagens não foram exploradas. Assim, o objetivo deste trabalho foi desenvolver recobrimentos bioativos constituídos por misturas de IPS e PVA contendo β-caroteno para aplicação em embalagens de alimentos. Além disso, o potencial de modificação da estrutura cristalina das fibras através do processo de *annealing* (aquecimento entre a temperatura de transição vítrea e a temperatura de fusão das fibras) e seu efeito na liberação do bioativo também foram estudadas.

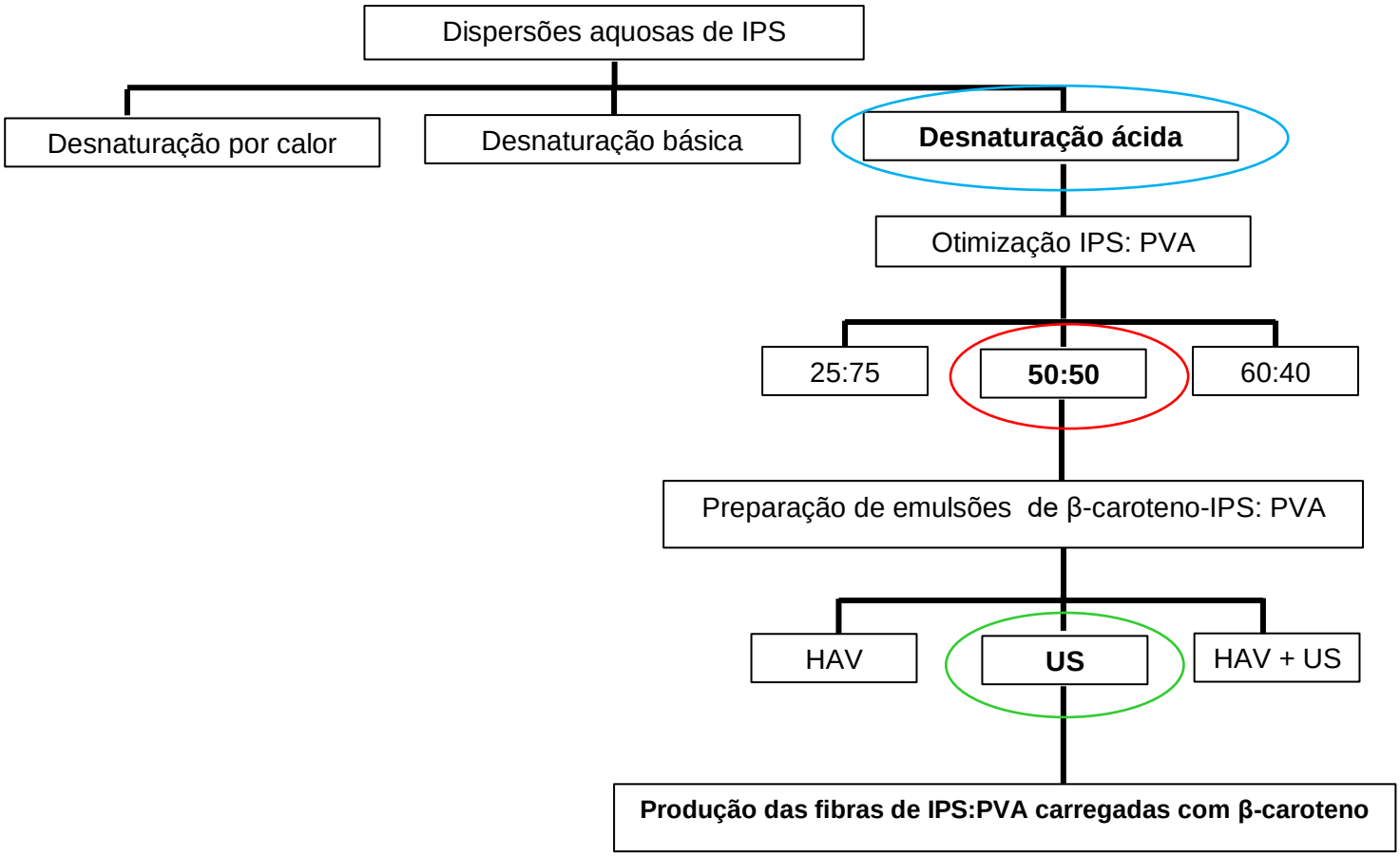
4.2 Material e métodos

4.2.1 Materiais

O isolado proteico de soja (IPS) foi gentilmente doado pela *The Solae Company* (Suíça) e o álcool polivinílico (PVA) foi adquirido da empresa *Plasticos Hidrosolubles S.L*. (Valência, Espanha). Dimetilformamida (DMF), hidróxido de sódio (NaOH), ácido clorídrico (HCl), óleo de soja, Triton ™ x-100 e β-caroteno foram obtidos da *Sigma-Aldrich* (Madrid, Espanha). O material da embalagem biodegradável PHA (espessura de 0,025 mm) foi obtida da *Goodfellow Cambridge Limited* (Huntingdon, Inglaterra).

4.2.2 Fluxograma

Para um melhor entendimento do trabalho, a seguir está apresentado um fluxograma compreendendo a etapas para a otimização das soluções utilizadas no processo de *electrospinning*.



Fluxograma 1- Etapas do processo de preparo da soluções poliméricas para a encapsulação de β-caroteno via técnica de *electrospinning.*

A primeira etapa do trabalho compreendeu o estudo do melhor método de desnaturação do IPS, o qual foi submetido a uma desnaturação por calor, à uma desnaturação básica e à uma desnaturação ácida. O melhor método de desnaturação (destacado em azul) foi utilizado para a segunda etapa do trabalho, a qual compreendeu a otimização da proporção de IPS: PVA (25:75, 50:50 e 60:40, respectivamente) para o preparo da solução de *electrospinning*. A proporção que apresentou melhor performance para o processo de *electrospinning* (destacada em vermelho) foi utilizada para a terceira etapa, a qual corresponde ao estudo do melhor método de emulsificação da solução para a incorporação do β-caroteno. Os métodos de emulsificação testados foram a homogeneização de alta velocidade (HAV), homogeneização via ultrassom (US) e a combinação da homogeneização de alta velocidade e ultrassom (HAV+US). A partir dessa etapa foi escolhido o método que proporcionou emulsões estáveis (destacado em

verde) onde o mesmo foi utilizado para a produção de emulsões carregadas com β-caroteno para o processamento via *electrospinning.*

4.2.3 Preparação das dispersões aquosas de IPS e IPS: PVA

Inicialmente, foram avaliadas as melhores condições do IPS para o processo de *electrospinning.* Para tanto, soluções aquosas contendo 11% (p/v) de IPS foram preparadas à temperatura ambiente (20 ± 2 ºC) dispersando a quantidade necessária de IPS em água destilada. Três dispersões de IPS foram desnaturadas utilizando diferentes procedimentos: i) desnaturação por calor: 30 min a 100 ºC (PÉREZ-MASIÁ; LAGARON; LÓPEZ-RUBIO, 2014), ii) desnaturação básica: pH 11, utilizando solução de NaOH 2M (Cho et al. 2012) e iii) desnaturação ácida: pH 2,0, utilizando solução de HCl 1M e, posteriormente, aquecimento da dispersão de IPS a 80ºC por 40 min (ROMANI et al., 2018).

Posteriormente, a solução processada com melhor desempenho, foi misturada com uma solução aquosa de PVA (também preparada a 11% (p/v) em água destilada a 95ºC até completa dissolução) em diferentes proporções de IPS: PVA (25:75, 50:50, 60:40 v:v). Um surfactante não-iônico, Triton ™ x-100, foi adicionado às diferentes soluções a 0,5% (p/v), a fim de reduzir a tensão superficial das soluções.

4.2.4 Preparação de emulsões de β-caroteno-IPS: PVA

Para preparar as emulsões O / A, o β-caroteno foi primeiramente dissolvido em óleo de soja sob agitação magnética a 90 ºC por 5 min (GÓMEZ-MASCARAQUE et al., 2017a) e depois misturado, sob agitação magnética em temperatura ambiente, com as dispersões de IPS:PVA (50:50) previamente preparadas em pH 2.

Três diferentes procedimentos de homogeneização foram avaliados para preparar as emulsões contendo β-caroteno: i) Homogeneização de alta velocidade (HAV), consistiu na homogeneização a 11000 rpm durante 5 min com um ultra-turrax (IKA T-25 Digital) equipado com um elemento dispersor (S 25N– 25F) com um diâmetro de 25 mm (IKA, Alemanha); ii) Homogeneização utilizando ultrassom (US) a uma potência de 80 W durante 2 min a uma frequência de 24 kHz em modo pulsante (50% ciclo ativo) usando um equipamento de ultra-som UP-400S (Hielcher GmbH, Alemanha). (US). Um banho de gelo foi usado neste caso para evitar o aquecimento excessivo da amostra; e iii) Uma

combinação dos dois métodos anteriores, isto é, as dispersões foram primeiro homogeneizadas utilizando o procedimento I (homogeneização a alta velocidade -HAV) e subsequentemente, o tratamento com ultrassom (US) descrito no procedimento ii foi aplicado.

A concentração final de óleo de soja que forneceu emulsões estáveis foi de 5% (p/p) e a quantidade de β-caroteno nas soluções finais foi de 5% (p/p) em relação à massa de ambos os biopolímeros.

4.2.5 Caracterização das soluções poliméricas

A condutividade elétrica das soluções foi medida usando um medidor de condutividade XS Con6 (Labbox, Barcelona, Espanha) à temperatura ambiente (22 ± 2 ºC). A tensão superficial foi medida usando o método da placa Wilhemy em um tensiômetro (EasyDyne K20, Krüss GmbH, Alemanha).

O comportamento reológico das soluções de IPS foi estudado usando um reômetro (AR-G2 TA Instruments, EUA), com uma geometria de placa paralela seguindo o método descrito por Gómez-Mascaraque, Lagarón e López-Rubio (2015). Resumidamente, a tensão de cisalhamento (σ) foi medida em função da taxa de cisalhamento (γ) de 0 a 200 s^{-1} durante 15 min a 25 ºC usando uma placa de aço inoxidável com um diâmetro de 60 mm e uma abertura de 0,5 mm. O modelo de lei de potência (Equação 1) foi aplicado para determinar o índice de consistência (k) e o índice de comportamento do fluxo (n). A viscosidade aparente foi determinada a 100 s^{-1}. Todas as medições foram feitas em triplicata.

$$\sigma = k.\gamma^{n} \qquad (1)$$

A estabilidade gravitacional das emulsões de β-caroteno-IPS:PVA foi analisada pelo método do índice de *creaming* (SURH; DECKER; MCCLEMENTS, 2006). Para tanto, as emulsões foram introduzidas em tubos selados e armazenadas por diferentes tempos (0, 5 e 24 h) à temperatura ambiente (22 ± 2 ºC). Quando a separação de fases ocorreu, a altura da camada de creme (Hc, fase rica em óleo) e a altura total de cada emulsão no tubo (He) foram medidas, e o índice de *creaming* (IC) foi calculado de acordo com a Equação 2.

$$IC = 100x\frac{(He-Hc)}{He} \quad (2)$$

As emulsões também foram visualizadas usando um sistema de microscopia digital (Nikon Eclipse 90i) equipado com uma lâmpada halógena de 12 V e 100 W. As imagens digitais foram tiradas usando um microscópio Nikon Eclipse 90i (Nikon Corporation, Japão) equipado com uma câmera de fotomicrografia digital colorida de 5 megapixels (Nikon Digital Sight DS-5Mc). As imagens adquiridas foram processadas usando o *Software* Nis-Elements Br 3.2 (Corporação Nikon, Japão).

4.2.6 Processamento via *electrospinning* das soluções

As diferentes soluções foram processadas utilizando a técnica de *electrospinning* à temperatura ambiente. O equipamento de *electrospinning*, equipado com uma fonte de alimentação variável de alta voltagem 0-30 kV, foi fornecido pela Spraybase® (Dublin, Irlanda). As soluções foram processadas sob uma taxa de fluxo constante usando uma agulha de aço inoxidável colocada em direção a uma placa metálica usada como coletor. A agulha foi conectada através de um fio de politetrafluoroetileno à solução de polímero mantida em uma seringa de plástico de 5 mL, que foi colocada verticalmente sobre uma bomba de seringa controlada digitalmente. As condições de processo foram as seguintes: vazão de 0,15 mL / h, tensão de 15 kV e distância do coletor ponta a ponta de 17 cm para as dispersões IPS e IPS:PVA.

As emulsões de IPS:PVA contendo β-caroteno foram estiradas no coletor ou diretamente no filme PHA acoplado ao coletor. As condições de processamento da emulsão foram vazão de 0,15 ml / h, voltagem de 18 kV e 20 cm de distância do coletor, com um tempo de deposição de 5 horas. Neste caso, um passo adicional de *annealing* foi aplicado em algumas das fibras, colocando-as entre placas quentes a 160 ºC por 1 min para promover a cristalinidade do PVA.

4.2.7 Caracterização morfológica dos materiais

A morfologia das fibras isoladas e dos recobrimentos nos filmes de PHA foi analisada usando um microscópio eletrônico de varredura (SEM, Hitachi S-4800). Utilizou-se uma voltagem de aceleração de 10 kV e uma distância de trabalho de 8-10 mm. As

amostras foram previamente revestidas por pulverização catódica com mistura de ouro-paládio.

4.2.8 Análise de infravermelho por transformada de Fourier (FT-IR) das fibras

As fibras obtidas por *electrospinning*, com e sem β-caroteno, foram caracterizadas utilizando-se um espectrômetro de FT-IR (Rheinstetten, Alemanha), equipado com um acessório de reflexão total atenuada (ATR). As amostras foram colocadas no cristal ATR para análise à temperatura ambiente (22 ± 2 °C) e as varreduras foram realizadas na faixa espectral de 4000-500 cm^{-1}.

4.2.9 Estabilidade térmica das fibras

A estabilidade térmica das fibras e dos compostos puros (IPS, PVA e β-caroteno) foi avaliada utilizando um analisador termogravimétrico (TA Instruments modelo Q500 TGA). As amostras (aproximadamente 8 mg) foram aquecidas em cápsulas de platina na faixa de 30 a 600 °C, com uma taxa de aquecimento de 10 $°C.min^{-1}$ sob atmosfera dinâmica de ar.

4.2.10 Integridade estrutural das fibras em água

A integridade estrutural das fibras em meio aquoso também foi avaliada. Para este fim, 10 mg das fibras foram colocados em frascos contendo 10 mL de água destilada. A integridade estrutural das fibras foi avaliada visualmente no período de 0 e 24 h.

4.2.11 Eficiência de encapsulação

A eficiência de encapsulação (EE) das amostras carregadas com β-caroteno foi realizada de acordo com Gómez-Mascaraque et al. (2017), com algumas modificações. As fibras (30 mg) foram dissolvidas numa mistura de 20 mL de água:DMF (1:1, v/v) e centrifugadas (4000 rpm) para obter alíquotas do sobrenadante para medidas de absorbância UV-vis a 418 nm. Uma curva de calibração foi obtida (R^2 = 0,9981) para o β-caroteno na mistura de solventes. O conteúdo de β-caroteno nas microestruturas foi interpolado a partir da equação linear de calibração obtida. A EE das microestruturas carregadas com β-caroteno foi calculada usando a Equação 3.

$$EE\ (\%) = \frac{Conteúdo\ real\ de\ \beta{-}caroteno\ nas\ fibras}{Conteúdo\ teórico\ de\ \beta{-}caroteno\ nas\ fibras} x\ 100 \qquad (3)$$

O conteúdo de β-caroteno na superfície das fibras foi estimado de acordo com Umesha, Monahar e Naidu (2013) e Gómez-Mascaraque et al. (2017a). Resumidamente, foram ressuspensas 10 mg de fibras em hexano (1 $mg.mL^{-1}$), posteriormente as amostras foram agitadas durante 5 s e filtradas imediatamente utilizando filtro Whatman™ com membranas de PTFE de 0,2 mm (GE Healthcare Life Sciences, UK). A absorbância do filtrado a 418 nm foi medida como descrito acima. Obteve-se uma curva de calibração (R^2 hexano = 0,9969) para o β-caroteno em hexano.

4.2.12 Ensaios de liberação *in vitro* de β-caroteno

O perfil de liberação in vitro de β-caroteno foi realizado de acordo com Costamagna et al. (2017). O óleo de soja foi escolhido como meio de simulação dos alimentos gordurosos, de acordo com o Regulamento da Comissão UE (10/2011 / CE, 2011). A liberação foi realizada a partir de 10 mg de fibras com e sem aplicação do processo de *annealing*. As amostras foram depositados em um recipiente com aproximadamente 14 mL de óleo de soja. A concentração de β-caroteno no meio de liberação foi estimada medindo a absorbância do sobrenadante a 418 nm utilizando um Espectrofotômetro NanoDrop (ND1000, Thermo Fisher Scientific, EUA) em determinados períodos de tempo. Os dados obtidos foram utilizados para determinar a quantidade total de β-caroteno liberada das fibras em cada momento.

4.2.13 Análise estatística

Os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) através do *softwere* STATISTICA 7.0 (StatSoft, França), e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey com nível de significância de 5%.

4.3 Resultados e Discussão

4.3.1 Caracterização de soluções proteicas desnaturadas

Um dos principais aspectos para a produção de fibras de IPS pela técnica de *electrospinning* é a desnaturação da proteína (MENDES; STEPHANSEN; CHRONAKIS, 2017). Assim, a eficiência de desnaturação das dispersões de IPS preparadas pelas metodologias anteriormente descritas foi primeiramente avaliada e comparada com a IPS na sua forma nativa. Na Figura 6 estão apresentados os termogramas de DSC das dispersões de IPS. É possível observar dois picos endotérmicos, a 96 e 117 ºC, respectivamente, no IPS nativo, sendo atribuídos à desnaturação das globulinas 7S e 11S (SOUSA et al. 1995), durante o processo de aquecimento. Este fato denota que o IPS nativo não foi desnaturado na forma original. Em contrapartida, os termogramas de dispersões de IPS submetidos aos processos ácido, básico ou de aquecimento, não apresentaram picos endotérmicos (Figura 6), indicando uma desnaturação das amostras nas diversas condições testadas.

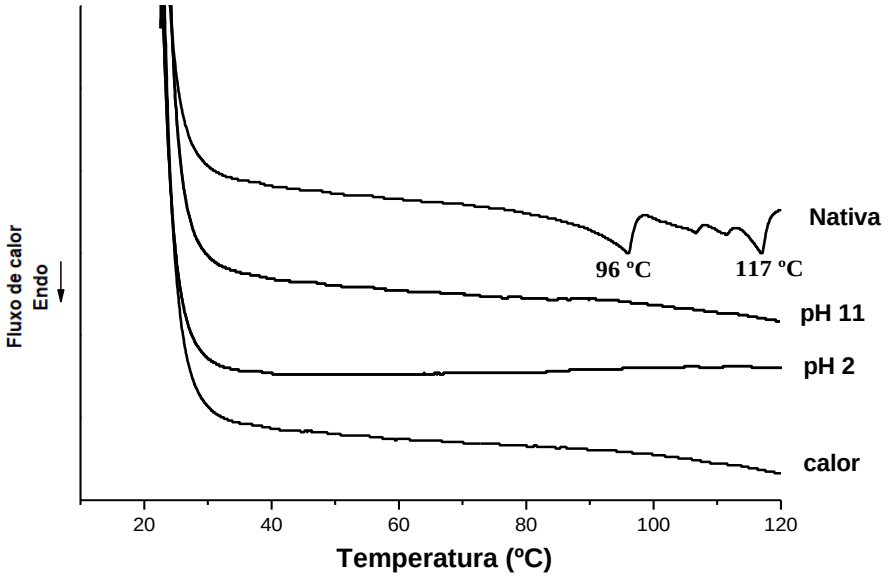


Figura 6- Termogramas de DSC da proteína nativa e proteína desnaturada pelo método básico (pH 11), método ácido (pH 2) e por uso do calor.

O processamento de soluções poliméricas por *electrospinning* depende fortemente das propriedades da solução (viscosidade, tensão superficial e condutividade elétrica), que desempenham um papel importante na determinação das melhores condições das quais fibras contínuas podem ser obtidas. As propriedades das dispersões de IPS estão

apresentadas na Tabela 2, enquanto a Figura 7 mostra as imagens MEV correspondentes das estruturas obtidas.

A partir dos resultados obtidos, observou-se que nem a tensão superficial nem a condutividade elétrica explicaram as diferenças observadas na morfologia das estruturas obtidas.

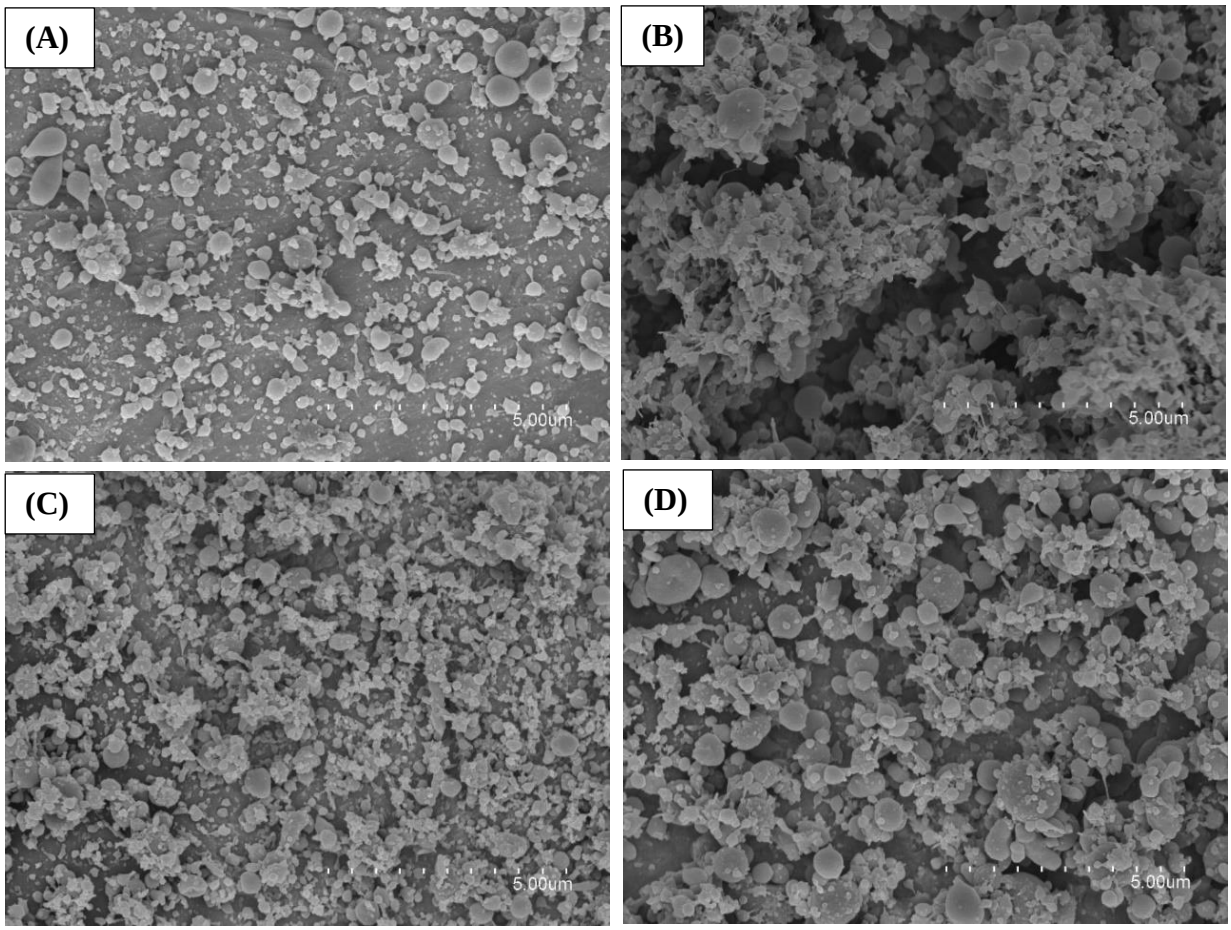


Figura 7- Imagens de MEV elaboradas com IPS nativo (A), IPS pH 11 (B), IPS pH 2 (C) e IPS calor (D).

É interessante notar que enquanto as dispersões de IPS desnaturadas por aquecimento ou usando pH básico apresentavam valores de tensão superficial ~50 mN. m^{-1}, tanto as dispersões de IPS nativas quanto aquelas preparadas em pH 2 apresentaram valores de tensão superficial muito mais baixos (em torno de 30 mN. m^{-1}), o que facilitaria o processamento das soluções através da técnica de *electrospinning*. Em geral, não foram observadas diferenças significativas na condutividade elétrica, exceto na dispersão de IPS preparada em pH 2, que apresentou valores significativamente mais altos, provavelmente devido ao uso de HCl que se dissocia em água. A tensão superficial é um parâmetro crucial para o processo, pois altos valores de tensão superficial poderiam

superar as forças eletrostáticas geradas pela alta voltagem aplicada e a condutividade elétrica da solução, dificultando a formação do cone de Taylor e o subsequente processo de *electrospinning* (BHARDWAJ; KUNDU, 2010; FONG; CHUN; RENEKER, 1999, JAWOREK, 2007, GÓMEZ-MASCARAQUE et al., 2017, ZUO et al., 2005).

Os índices de fluxo e a consistência, juntamente com os valores de viscosidade aparente a uma taxa de cisalhamento de 100 s^{-1}, estão apresentados na Tabela 2. Os valores do coeficiente de correlação foram, em todos os casos, em torno de 0,99. Foi observado um comportamento pseudoplástico para todas as dispersões de IPS.

Tabela 2. Tensão superficial, condutividade elétrica e comportamento reológico da solução proteica.

Parâmetros	Soluções				
	Nativa	Calor	pH 11	pH 2	PVA
Tensão Superficial ($mN.m^{-1}$)	34,2± 0,32^{c}	51,40 ± 0,74^{a}	52,90 ± 0,99^{a}	33,40 ±1,04^{c}	44,80 ± 1,00^{b}
Condutividade Elétrica ($mS.cm^{-1}$)	1,40 ± 0,09^{c}	1,20 ± 0,03^{d}	1,54 ± 0,04^{c}	4,56 ± 0,04^{a}	2,6 ± 0,0^{b}
Comportamento reológico	Pseudo-plástico	Pseudo-plástico	Pseudo-plástico	Pseudo-plástico	Newtoniano
μ (Pa.s) ($0 \leq \gamma \leq 200^{-1}$)	-	-	-	-	0,07 ± 0,04^{a}
n	0,65 ± 0,02^{b}	0,77 ± 0,02^{a}	0,43 ± 0,03^{b}	0,74 ± 0,01^{a}	-
$K(Pa.s)^{n}$	0,44 ± 0,04^{c}	0,61 ± 0,07^{b}	3,72 ± 2,02^{a}	0,46 ± 0,05^{c}	-
η (Pa.s) (γ=100 S^{-1})	0,47 ± 0,06^{b}	0,43 ± 0,04^{b}	4,65 ± 0,07^{a}	0,40 ± 0,07^{b}	-

Letras diferentes (a-d) na mesma linha indicam significância de $p < 0,05$ entre as amostras.

As dispersões de IPS desnaturadas usando condições básicas de pH foram significativamente mais viscosas, sendo aproximadamente 10 vezes mais altas e com um comportamento pseudoplástico mais aparente, de acordo com o menor valor de *n*, o que provavelmente foi responsável pelas estruturas aglomeradas observadas da Figura 7B. Essas diferenças podem ser explicadas pelo diferente arranjo de complexos proteicos em meio básico e ácido, como relatado anteriormente. Soluções proteicas em condições básicas de pH, principalmente interações hidrofóbicas e ligações de hidrogênio são responsáveis pela conformação da proteína, enquanto em pH ácido, as interações de

ligações dissulfídicas e não covalentes desempenham um papel crucial na formação das estruturas (ROMANI et al., 2018).

As diferenças observadas nas propriedades das soluções do IPS desnaturado em condições ácidas foram responsáveis pelo melhor desempenho quando processado via *electrospinning.* De fato, as soluções proteicas desnaturadas através do calor e do pH básico foram bastante instáveis durante o processo de *electrospinning*, apresentando constante gotejando. Vale ressaltar que o processamento por *electrospinning* de soluções poliméricas aquosas pode ser favorecido com a diminuição do comprimento da cadeia, como observado anteriormente para os polissacarídeos (PÉREZ-MASIÁ et al., 2014b). Portanto, para experimentos subsequentes, o IPS desnaturado em condições ácidas foi selecionado.

4.3.2 Otimização da proporção de IPS:PVA para formação das fibras por *electrospinning*

Como o objetivo deste estudo foi desenvolver um recobrimento bioativo em embalagens de alimentos pela técnica de *electrospinning*, as soluções elaboradas somente com IPS só deram origem a morfologias tipo cápsulas, portanto, foi utilizado o álcool polivinílico (PVA) como polímero formador de fibras, visando favorecer a formação do recobrimento. Inicialmente, diferentes proporções de IPS:PVA foram avaliadas visando incorporar a quantidade máxima de IPS nas fibras. A Figura 8 mostra a morfologia das fibras preparadas com diferentes proporções IPS:PVA (0:100, 25:75, 50:50 e 60:40).

Como observado a partir da Figura 8, o aumento da quantidade de IPS nas soluções levou a uma maior presença de *beads* nas fibras. Das diferentes proporções avaliadas, a mais estável em termos de gotejamento de solução durante o processo de *electrospinning* foi a proporção de 50:50, que apesar de apresentar *beads*, formou uma esteira de fibra contínua quando aplicada diretamente no coletor ou no filme de recobrimento de PHA, portanto, esta proporção de mistura foi selecionada para as formulações subsequentes. Cho et al. (2012) também prepararam fibras híbridas de IPS: PVA, mas neste caso, a desnaturação da proteína foi realizada em condições básicas, mas similarmente a este trabalho, proporções de 50:50 da formulação também levaram à formação de *beads* nas fibras.

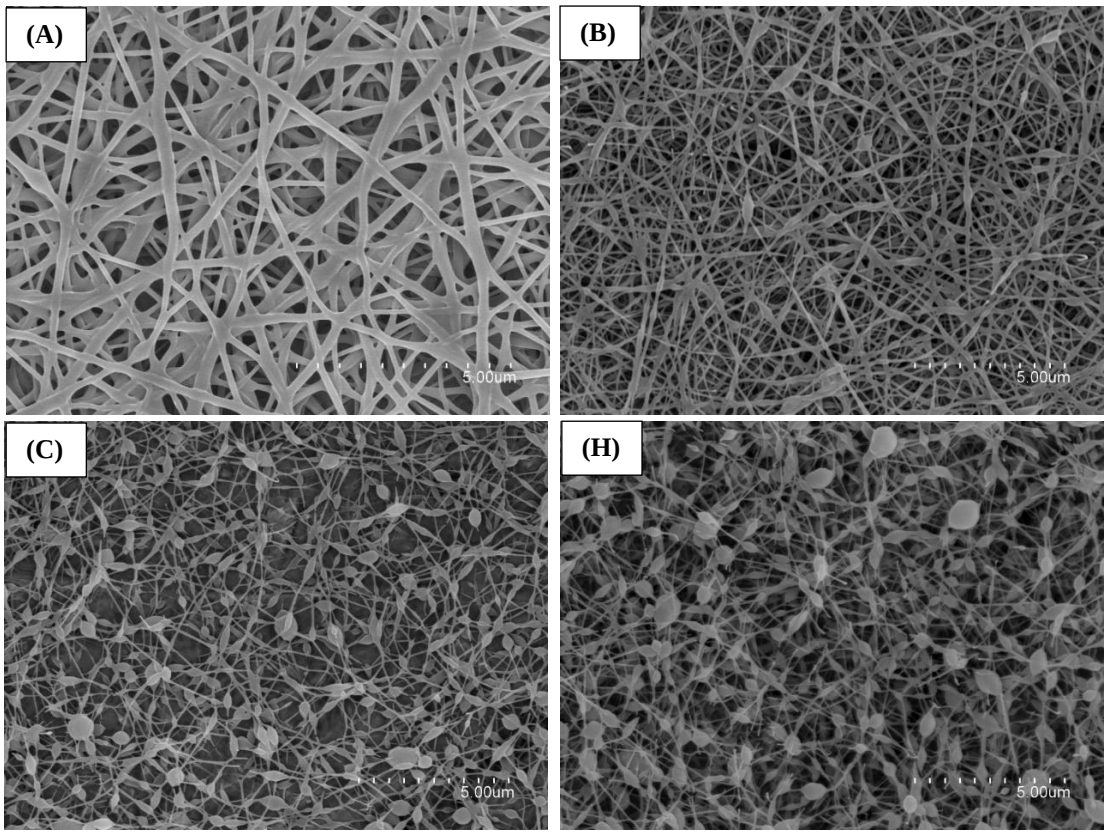


Figura 8 – Imagens de MEV das fibras elaboradas com IPS:PVA nas proporções de 0:100 (A), 25:75 (B), 50:50 (C) e 60:40 (D).

4.3.3 Caracterização das emulsões O/A

A solução de IPS:PVA preparada na proporção de 50:50 foi selecionada para desenvolver as emulsões com β-caroteno como estratégia para incorporar o bioativo lipofílico nas fibras. As emulsões O/A foram preparadas por três diferentes metodologias e as propriedades das emulsões, visando o *electrospinning* (tensão superficial, condutividade e propriedades reológicas) foram caracterizadas. A tensão superficial e a condutividade elétrica (Tabela 3) das emulsões de IPS:PVA, independentemente do método de emulsificação, foram semelhantes. A tensão superficial não ultrapassou o valor de 50 $mN.m^{-1}$, o que poderia comprometer o processo de *electrospinning* mencionado anteriormente. Em relação às propriedades reológicas, as emulsões mostraram um comportamento newtoniano. Misturas de IPS com PVA também se comportam como um líquido newtoniano como relatado anteriormente (PAL et al., 2017).

Tabela 3. Tensão superficial, condutividade elétrica e comportamento reológico das emulsões.

Parâmetros	Emulsões		
	HAV	US	HAV+ US
Tensão Superficial ($mN.m^{-1}$)	34,60 ± 2,19[a]	34,20 ± 1,41[a]	34,30 ± 0,40[a]
Condutividade Elétrica ($mS.cm^{-1}$)	4,10 ± 0,03[a]	4,13 ± 0,03[a]	4,02 ± 0,04[a]
Comportamento reológico	Newtoniano	Newtoniano	Newtoniano
μ (Pa.s) ($0 \leq \gamma \leq 200^{-1}$)	0,07 ± 0,02[b]	0,08 ± 0,01[a]	0,05 ± 0,01[c]
r^2	0,9952	0,9953	0,9965

Letras diferentes (a-d) na mesma linha indicam significância de $p < 0,05$ entre as amostras.
* HAV: homogeneização de alta velocidade; US: ultrassom; HAV + US: combinação dos métodos de homogeneização de alta velocidade e ultrassom.

A estabilidade gravitacional, bem como os valores do índice de *creaming* das emulsões estão apresentados na Tabela 4. As emulsões de IPS:PVA preparadas com HAV e a combinação dos métodos (HAV + US) após 24 horas não foram estáveis (Tabela 4). O tratamento do HAV é uma metodologia com alta tensão de cisalhamento (TRUJILLO-CAYADO et al., 2017), que pode ter causado a desintegração física das gotículas de emulsão da proteína quando aplicada sozinha ou quando combinada com US.

De acordo com McClements, Decker e Weiss (2007), a separação gravitacional é uma das formas mais comuns de instabilidade em emulsões, dando origem a uma camada de creme, na qual consiste o movimento ascendente das gotículas devido à sua menor densidade do que o líquido circundante. Óleos comestíveis têm densidades mais baixas do que a água, então a formação de creme é comumente observada em emulsões O/A. Portanto, devido ao β-caroteno apresentar carácter lipofílico e por ter sido solubilizado na fase oleosa da emulsão, a estabilidade gravitacional das várias emulsões preparadas foi avaliada, visto que este parâmetro é um aspecto chave para a estabilidade do processo de *emulsion electrospinning*.

Tabela 4- Estabilidade gravitacional das emulsões: imagens das emulsões após armazenamento por 0, 5 e 24 horas e valores de seu índice de *creaming* (IC).

Procedimento	**Emulsão de IPS:PVA**			**Emulsão de PVA**		
	Tempo (h)			**Tempo (h)**		
	0	**5**	**24**	**0**	**5**	**24**
Homogeneização de Alta Velocidade (HAV)						
IC (%)	100	92,3	80	100	61,5	84,6
Ultrassom (US)						
IC (%)	100	100	100	100	53,8	84,3
Homogeneização de Alta Velocidade + Ultrassom (HAV + US)						
IC (%)	100	100	84,6	100	38,4	69,2

Em contraste, a emulsão IPS:PVA preparada por US não mostrou nenhuma separação de fases após 24 horas, garantindo estabilidade gravitacional durante o

processo de *electrospinninig*. A excelente estabilidade gravitacional da emulsão preparada por US também pode ser parcialmente atribuída à presença de IPS na formulação, uma vez que a proteína possui boas propriedades emulsificantes, atribuída ao seu caráter anfifílico, o que favorece uma adsorção mais rápida da proteína na interface óleo e água através dos aminoácidos não polares das cadeias proteicas (GÓMEZ-MASCARAQUE et al., 2017a).

Além disso, segundo Yang et al. (2018), o processo de US aumenta significativamente a hidrofobicidade da superfície, expondo as regiões hidrofóbicas do IPS após o processo de cavitação. De fato, este aumento na estabilidade da emulsão como consequência da incorporação de IPS na formulação foi provado preparando as mesmas emulsões, no entanto, utilizando somente PVA como matriz polimérica na fase hidrofílica. Como observado na Tabela 4, nenhum dos métodos de processamento utilizados promoveu emulsões estáveis, quando o IPS nas formulações não estava presente.

As imagens de microscopia óptica das diferentes emulsões estão apresentadas na Figura 9. A emulsão preparada por US (Figura 9B) mostrou gotas aparentemente maiores, no entanto, mais individualizadas. Por outro lado, as emulsões preparadas por HAV (Figura 9A) e o método combinado US + HAV (Figura 9C) apresentaram menor tamanho de gotículas, no entanto, aglomeradas, sugerindo que o processo de HAV pode ter promovido a floculação entre as gotículas de óleo. Segundo Mcclements et al. (2007), a floculação é o processo pelo qual duas ou mais gotículas se associam, mantendo sua integridade individual. Este fenômeno é observado quando as interações de atração entre as gotas dominam as interações de repulsão de longo alcance, mas não as de repulsão de curto alcance. Assim, as gotículas permanecem próximas umas das outras (floculam), sem aproximar-se o suficiente para se fundirem (coalescer). As propriedades macroscópicas das emulsões, como aparência e percepção sensorial, são fortemente influenciadas pela extensão e natureza da floculação. Trabalhos anteriores sobre emulsões de IPS já mostraram que a homogeneização em alta velocidade (HAV) não promoveu emulsões estáveis, enquanto a redução no tamanho da gota induzida pelo processo de ultrassom teve um efeito positivo na estabilidade da emulsão de IPS, evitando o fenômeno de *creaming* por pelo menos 48 horas (GÓMEZ-MASCARAQUE; LÓPEZ-RUBIO, 2016).

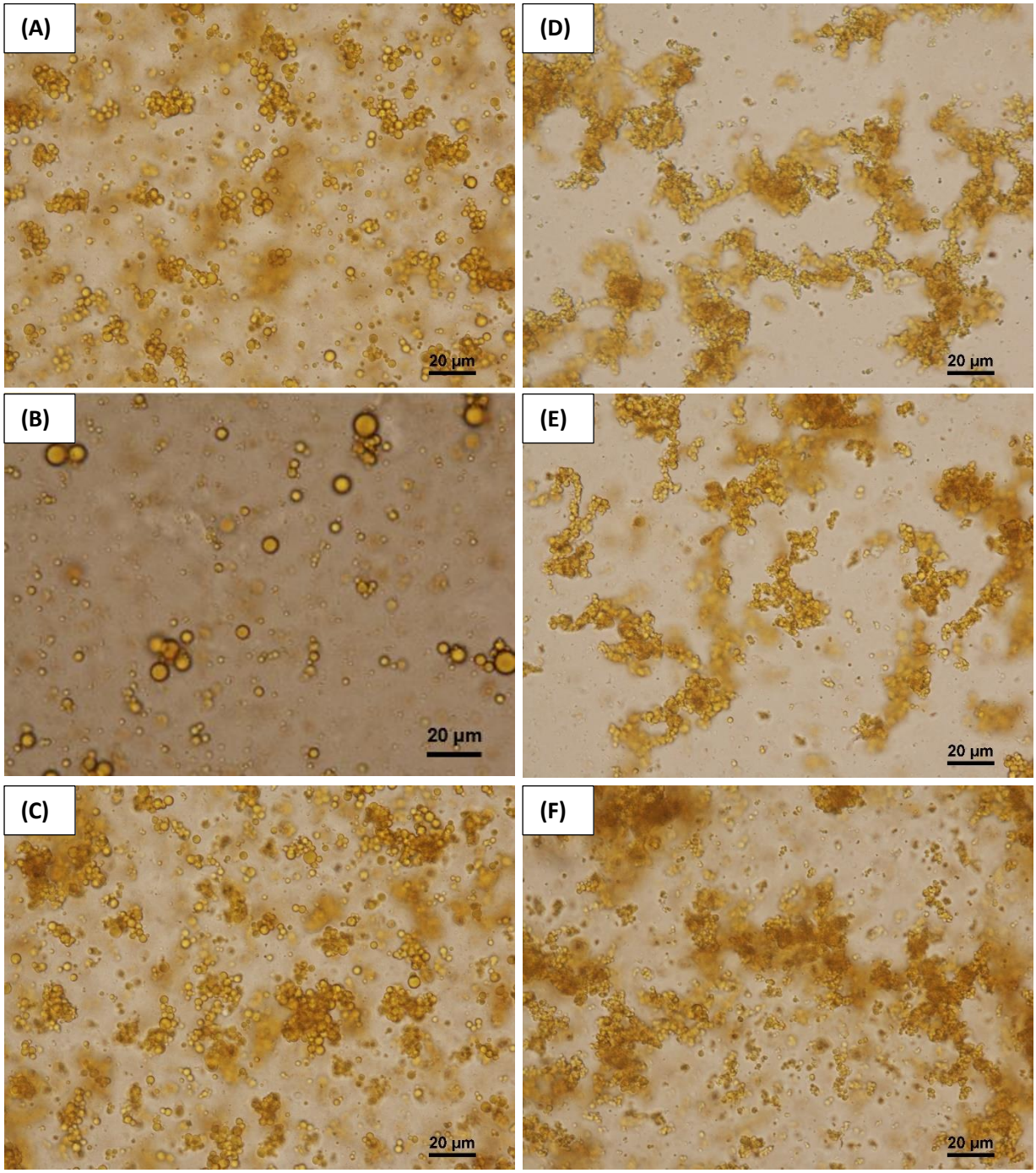


Figura 9 – Microscopia óptica das emulsões de IPS:PVA preparadas por HAV (A), US (B), HAV+US (C) e das emulsões de PVA preparadas por HAV (D), US (E) e HAV+US (F).

A Figura 9 também mostra que, após 5 horas de preparação, as emulsões preparadas usando apenas PVA, apesar do método de emulsificação, apresentaram floculação maciça, explicando a falta de estabilidade gravitacional observada na Tabela 4. Este resultado indica que as emulsões preparadas com apenas PVA não seria adequado para o encapsulação de β-caroteno. Segundo Gómez-Mascaraque et al. (2017a), a grande instabilidade da emulsificação e a subsequente separação de fases durante o

processo de *emulsion electrospinning* diminuem significativamente a eficiência da encapsulação.

4.3.4 Caracterização morfológica, térmica e estabilidade das fibras

A morfologia e a distribuição do tamanho de partícula das fibras carregadas com β-caroteno obtidas por *emulsion electrospinning* estão apresentadas na Figura 10. As fibras obtidas por *emulsion electrospinning* apresentaram *beads*. O PVA atuou como polímero transportador e auxiliou na formação de fibras, uma vez que, em geral, não é possível obter fibras de IPS puro, dada a natureza globular da proteína e as dificuldades encontradas para obter coesão molecular suficiente para a formação das fibras mesmo após desnaturação de proteínas (CHO et al., 2012). Durante a remoção do material depositado no coletor do *electrospinning*, observou-se a formação de um filme contínuo, a qual é uma característica de interesse para o desenvolvimento do recobrimento.

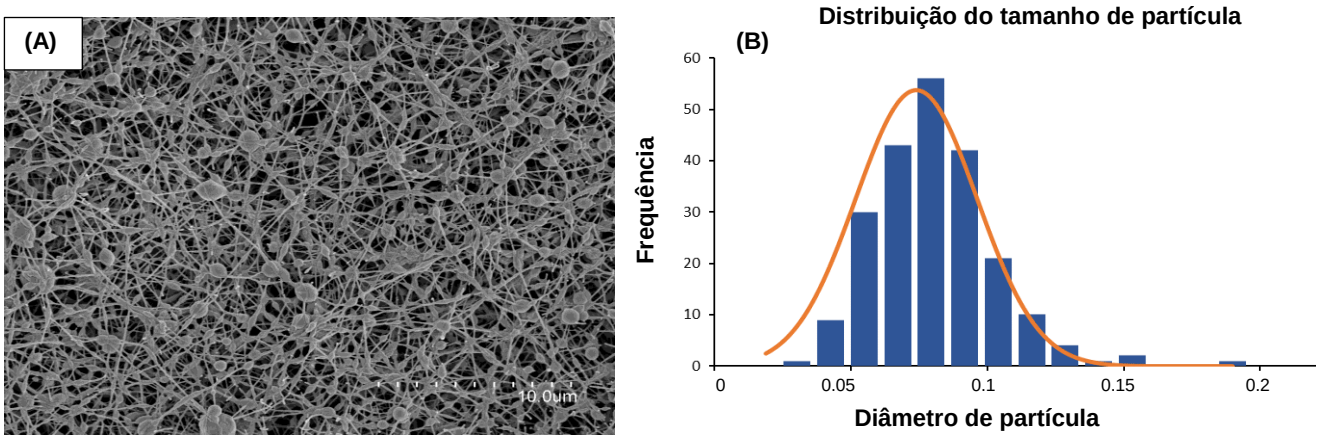


Figura 10- Imagem de MEV (A) e distribuição de tamanho de partícula (B) das fibras carregadas com β-caroteno.

Em relação à estabilidade estrutural das fibras na água, também foi avaliada a influência da incorporação do IPS dentro das fibras (Figura 11).

A Figura 11 mostra que, enquanto as fibras elaboradas somente com PVA perderam completamente sua estrutura após 24 h em contato com a água, as fibras híbridas IPS:PVA ficaram parcialmente dissolvidas em água, permanecendo o β-caroteno encapsulado dentro das estruturas como observado na Figura 11C. Este fato mostra que

a mistura de IPS e PVA, além de auxiliar na formação de fibras, também alterou suas propriedades de solubilidade em água.

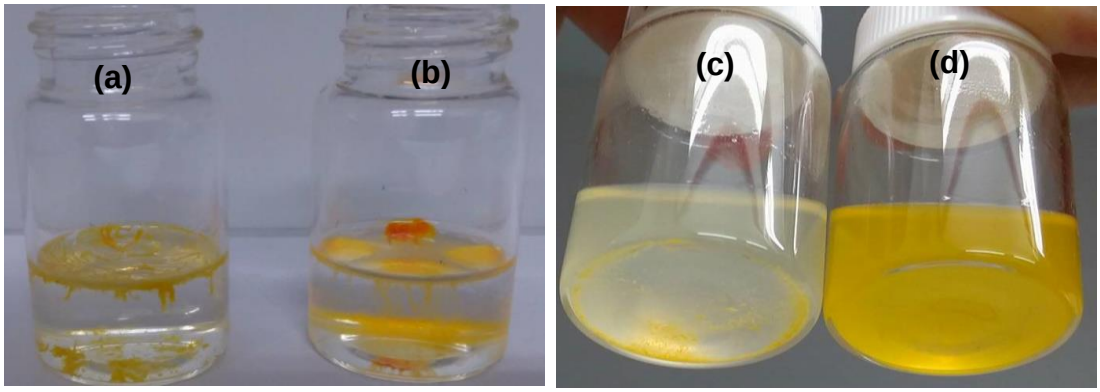


Figura 11- Fibras de IPS:PVA e fibras de PVA com β-caroteno (0 h) (A-B) e depois de 24 horas (C-D), respectivamente.

De acordo com a Chen et al. (2018) a desnaturação diminui a solubilidade das proteínas em água, uma vez que estas têm seu estado conformacional e suas interações intramoleculares alteradas. Como a aplicação das fibras de IPS:PVA é destinada à produção de recobrimentos para aplicações em embalagens ativas para alimentos, a diminuição na solubilidade da água é mostrada como um fator positivo, o que permitirá uma liberação mais gradual do bioativo para o alimento.

A Figura 12 mostra as curvas de derivadas termogravimétricas (DTG) da fibras de IPS:PVA carregadas com β-caroteno e de seus constituintes individuais.

As fibras apresentaram quatro estágios de degradação térmica, que provavelmente correspondem à degradação térmica dos compostos individuais presentes nas fibras. No entanto, é difícil atribuir inequivocamente cada um dos picos a um componente específico, embora em geral seja observada uma mudança para temperaturas mais altas nas taxas máximas de degradação, apontando para uma melhor estabilidade das fibras, provavelmente como consequência dos componentes e das interações dos polímeros.

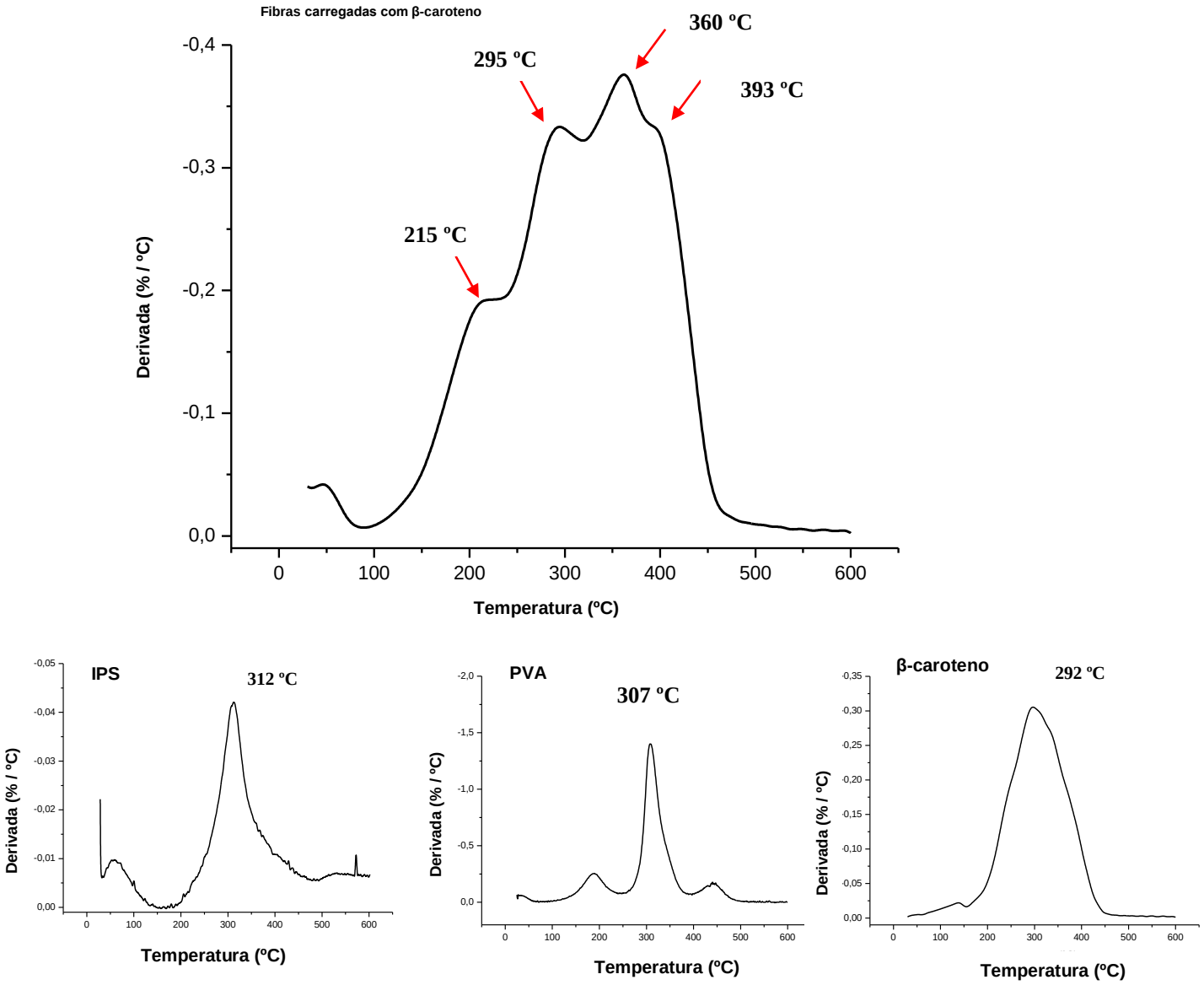


Figura 12- Primeira derivada (DTG) das fibras carregadas com β-caroteno, álcool polivinílico puro, β-caroteno puro e IPS.

4.3.5 Análise por infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR) das fibras

Os espectros de FTIR das fibras carregadas com β-caroteno e de cada componente individual estão apresentados na Figura 13.

O espectro de FT-IR das fibras carregadas com β-caroteno apresentou bandas relacionadas com os seus precursores. Neste espectro, bandas características de IPS foram identificadas a 3288 cm^{-1} para a amida A (NH alongamento), 1645 cm^{-1} referente à amida I (C = O alongamento), 1536 cm^{-1} referente à amida II (NH flexão e alongamento) e

1240 cm^{-1} referentes à amida III (alongamento CN) (GÓMEZ-MASCARAQUE; LÓPEZ-RUBIO, 2016). Uma banda a 1735 cm^{-1} referente a grupos C=O de triglicérides de óleo de soja (GÓMEZ-MASCARAQUE et al., 2017a; PÉREZ-MASIÁ et al., 2015) e a 955 cm^{-1}, correspondente ao grupo C = C dos carotenoides (GÓMEZ-MASCARAQUE et al., 2017a; RUBIO-DIAZ; FRANCIS; RODRIGUEZ-SAONA, 2011) foram observados. Além disso, bandas a 2923 cm^{-1} referentes a C-H dos grupos alquila e banda de 1730 cm^{-1} referente a C=O e C-O do grupo carbonila de PVA (REZAEE et al., 2017) foram observadas. Nos espectros do β-caroteno carregado foi observada uma banda de 1446 cm^{-1} que é repetida nos espectros de β-caroteno puro.

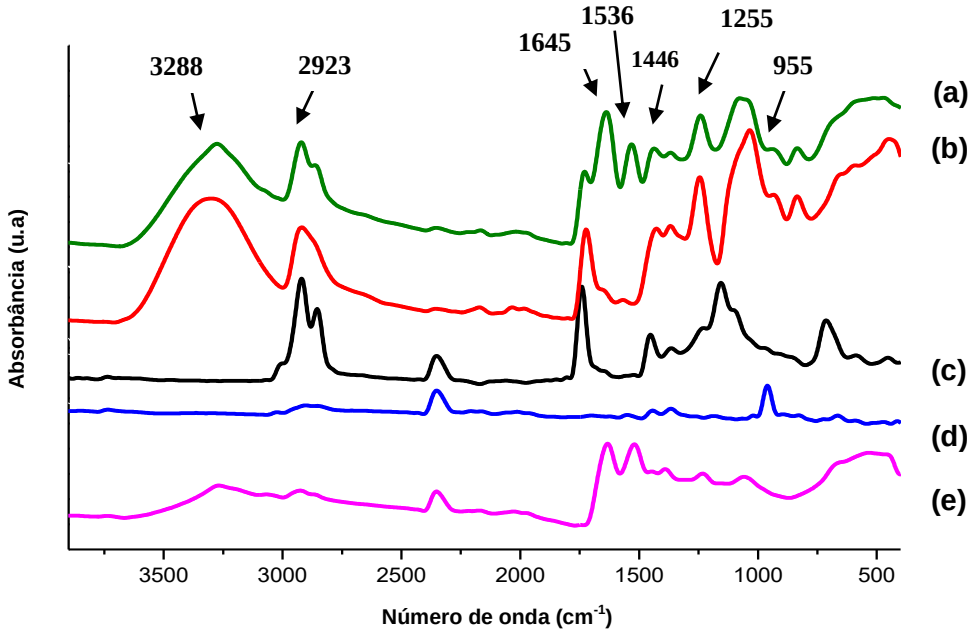


Figura 13- Espectros de FT-IR das fibras carregadas com β-carotene (A), PVA (B), óleo de soja (C), β-caroteno (D) e IPS (E).

4.3.6 Eficiência de Encapsulação (EE)

A EE do β-caroteno aprisionado nas fibras IPS: PVA foi de 65,0 ± 2,6%, onde 13,6 ± 0,9% se manteve na superfície das fibras e, deste modo, a porcentagem de carotenoide eficazmente encapsulado nas fibras foi de 51,4 ± 0,9%. Goméz-Mascaraque et al. (2017a) relataram um valor de 34,7% de EE de β-caroteno, usando zeína como matriz. Segundo Donhowe et al. (2014), a EE do β-caroteno encapsulado em matrizes de quitosana-alginato foi de 54,7%. Ge et al. (2015) relataram uma EE de 34,2%, na qual micelas de quitosana foram usadas para encapsulação de β-caroteno. JAIN et al. (2016) encontraram

um valor mais elevado de EE (79,3%) de β-caroteno utilizando caseína e goma de tragacanto para encapsular o β-caroteno através do de coacervação. Portanto, a estratégia desenvolvida neste trabalho, ou seja, a produção de fibras de IPS:PVA pela técnica *emulsion electrospinning* foi eficiente para o encapsulação de β-caroteno.

Vários fatores podem afetar o encapsulação de bioativos. Segundo Gómez-Mascaraque et al. (2017a), que utilizaram zeína e proteína de soro como matrizes de encapsulação para o β-caroteno, o principal fator que afetou a eficiência da encapsulação por meio de *electrospraying* foi a estabilidade gravitacional das emulsões. Kong, Bhosale e Ziegler (2018) usaram um complexo de amilose como matriz de encapsulação para o β-caroteno e relataram que o encapsulação eficaz dependia do efeito emulsificante dos surfactantes para dissolver o β-caroteno. Portanto, é possível concluir que a eficiência de encapsulação do β-caroteno depende do procedimento de emulsificação e da matriz na qual ele é incorporado.

4.3.7 Caracterização morfológica do recobrimento bioativo e propriedades de liberação

Visando a obtenção de um recobrimento interno de estruturas de embalagens bioativas de alimentos, o recobrimento foi diretamente coletado em um filme de poliidroxialcanoato (PHA). Além disso, a fim de favorecer a adesão do recobrimento ao PHA e para modular a libertação do β-caroteno, foi aplicado um tratamento de *annealing* como especificado na seção de métodos. A partir do tratamento de *annealing*, o qual foi observado anteriormente para aumentar a cristalinidade dos polímeros (LÓPEZ-RUBIO et al., 2003), era esperado que este promovesse uma alteração da cristalinidade do PVA, afetando assim a liberação do composto.

A Figura 14 mostra as imagens de SEM da secção transversal e da superfície do filme de PHA com o recobrimento de IPS:PVA antes (Figuras 14A e 14B) e após o tratamento de *annealing* (Figuras 14C e 14D).

Como observado nas imagens de SEM, o tratamento de *annealing*, levou à coalescência e melhorou a adesão das fibras ao material de PHA e, mesmo que uma estrutura semelhante à fibra ainda pudesse ser observada, elas parecem praticamente fundidas. Processos de *annealing* também foram aplicados anteriormente em estruturas de fibra para promover a fusão entre fibras e aumentar a integridade estrutural da

membrana (KAUR et al. 2011) e também para melhorar a adesão ao polímero de suporte (LI ; HASHAIKEH; ARAFAT, 2013).

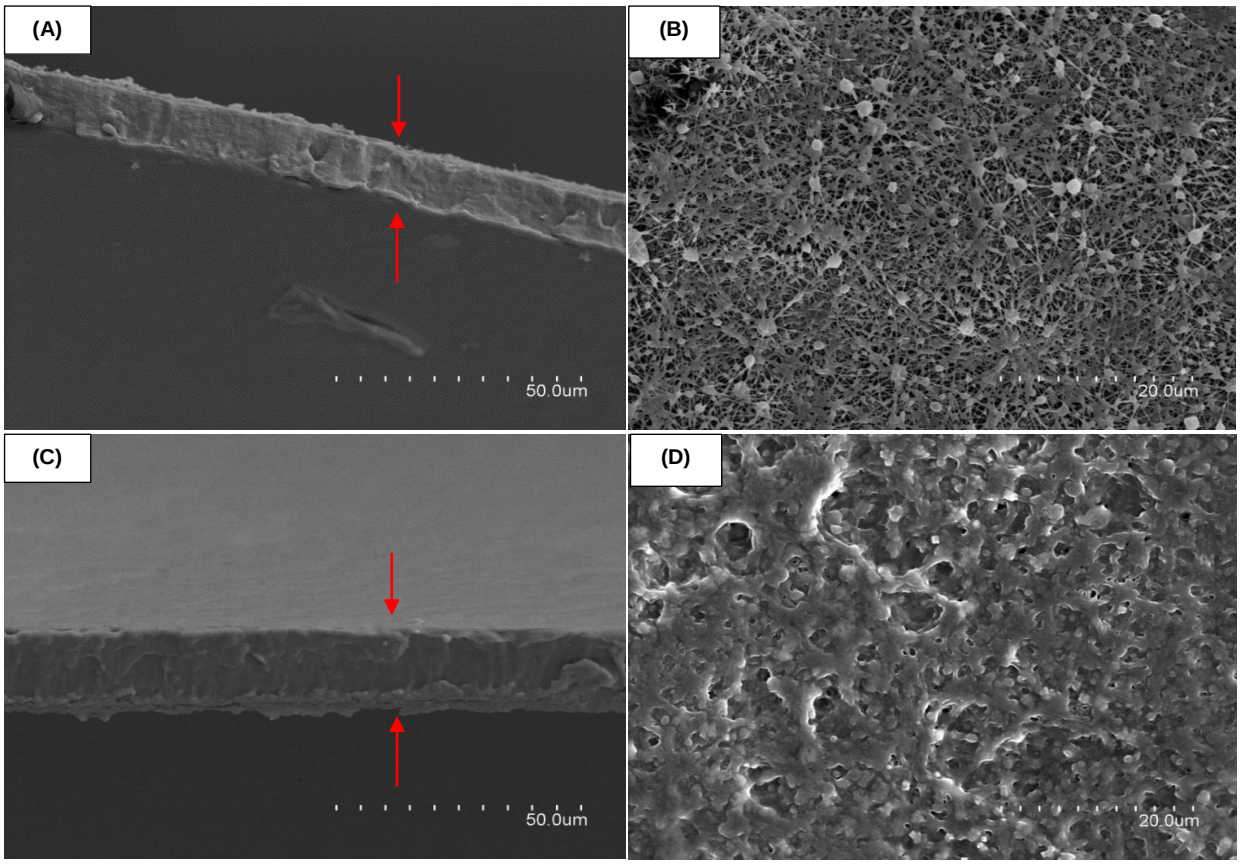


Figura 14- Imagem de MEV do corte transversal e da surperfície dos recobrimentos sem *annealing* (A- B) com *annealing* (C-D), respectivamente.

O ensaio de liberação *in vitro* foi realizado a partir do recobrimento de fibra com e sem annealing (Figura 15).

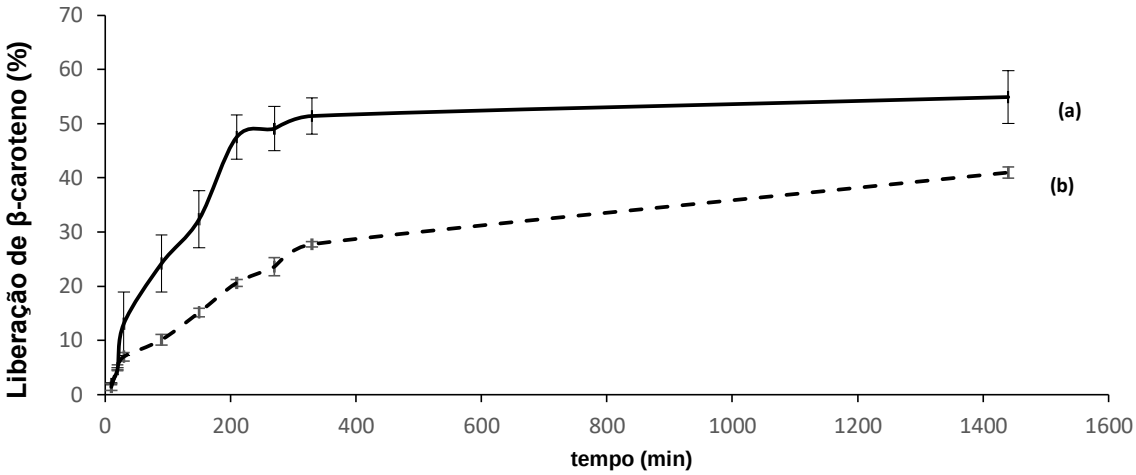


Figura 15 – Perfil de liberação do β-caroteno a partir das fibras sem annealing (a) e com annealing (b), no meio simulante de alimentos gordurosos.

Um meio de liberação de óleo de soja, que simula alimentos gordurosos, foi selecionado devido à solubilidade do β-caroteno neste meio. É possível observar que a liberação do composto hidrofóbico da matriz que não foi submetido ao processo de *annealing* ocorreu durante as primeiras 5 h de liberação. No entanto, uma liberação mais lenta e sustentada ocorreu a partir das fibras com *annealing*, sugerindo que este tratamento efetivamente favorece uma liberação mais controlada do bioativo, o que pode ser de interesse para aplicação como recobrimento na embalagem dos alimentos.

Experimentos de DSC das fibras antes e após o processo de *annealing* foram realizados e as curvas de DSC são mostradas na Figura 16.

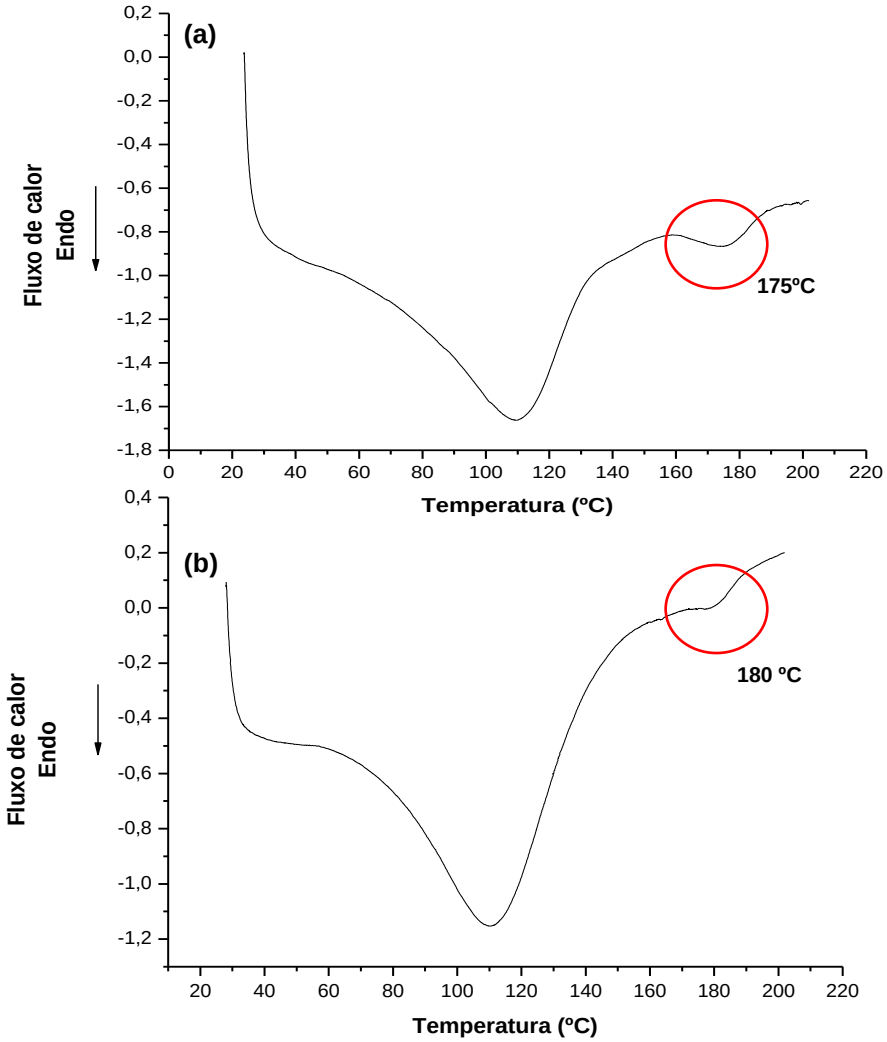


Figura 16- DSC das fibras de IPS:PVA sem tratamento de *annealing* (a) e com tratamento de *annealing.*

Além do pico amplo atribuído à evaporação da água restante nas fibras, a transição térmica observada em temperaturas mais altas que podem estar relacionadas ao

derretimento dos cristais de PVA, indicou que o processo de *annealing* efetivamente promoveu a cristalização dos materiais, através da mudança na temperatura de fusão de 175 para 180ºC, a qual está claramente observada, indicando que os cristais maiores ou mais perfeitos aparentemente têm efeito nas propriedades de liberação dos recobrimentos ativos.

4.4 Conclusão

Fibras de IPS:PVA carregadas com β-caroteno obtidas pela técnica de "e*mulsion-electrospinning*" foram produzidas para aplicação como recobrimento em embalagens de alimentos. O método de ultrassom utilizado para a preparação da emulsão promoveu a estabilidade da emulsão em até 24 h. As fibras obtidas através da metodologia de "*emulsion-electrospinning*" apresentaram em torno de 54% de eficiência de encapsulação do β-caroteno. O maior conteúdo de β-caroteno foi liberado no meio simulante de alimentos gordurosos nas primeiras 5 horas, porém as fibras que foram submetidas ao tratamento de *annealing* apresentaram uma liberação mais lenta, provavelmente devido a cristalização do PVA. Além disso, o tratamento de *annealing* realizado no recobrimento promoveu aderência e coesão entre as fibras e o filme de PHA. A partir dos resultados obtidos, é possível sugerir que as fibras de IPS:PVA carregadas com β-caroteno apresentam potencial para serem aplicadas como recobrimento em embalagens para alimentos gordurosos.

5 CAPÍTULO 2 – ENCAPSULAÇÃO DE EXTRATO DE ERVA-MATE POR MEIO DA TÉCNICA DE E*LECTROSPINNING* PARA LIBERAÇÃO CONTROLADA EM EMBALAGENS DE ALIMENTOS.

Os resultados deste estudo serão enviados ao *Internacional Journal of Biological Macromolecules.*

5.1 Introdução

Atualmente tem se observado diversas exigências no setor de embalagens de alimentos, não apenas pelos consumidores, mas também pelos setores de exportação/importação. As principais exigências são por embalagens que ofereçam segurança contra fatores intrínsecos e extrínsecos e, ao mesmo tempo, que possam enriquecer nutricionalmente os alimentos nelas armazenados. Do ponto de vista nutricional, já se sabe que muitos alimentos processados perdem componentes endógenos benéficos à saúde, como vitaminas, ácidos graxos, peptídeos, compostos fenólicos etc. Portanto, a liberação controlada de compostos bioativos com alta atividade antioxidante em embalagens de alimentos poderia contribuir na conservação de alimentos. Na literatura são encontrados diversos estudos que relatam a elaboração de matrizes poliméricas para o encapsulamento de compostos bioativos através da técnica de *electrospinning* para aplicação em embalagens de alimentos (ANTUNES et al., 2019; EVANGELHO et al. 2018; SILVA et al.; 2018, ANTUNES et al., 2017).

A técnica de *electrospinning* é um processo para produzir fibras poliméricas em nanoescala e o princípio desta técnica baseia-se na aplicação de um campo elétrico para a formação de fibras que são depositadas em um coletor aterrado. O encapsulamento de compostos bioativos nas fibras é obtido através da mistura desses compostos com a solução polimérica, seguido do processo de *electrospinning* (WEN; ZONG; LINHARDT; FENG; WU, 2017). Polímeros como as proteínas têm sido utilizadas como matriz de encapsulamento, principalmente porque são de grau alimentício, não tóxicas, biocompatíveis, biodegradáveis e sustentáveis. Um exemplo é a zeína, que é uma proteína de armazenamento importante no milho e apresenta elasticidade, capacidade de formação de filme e hidrofobicidade, o que a torna interessante para o encapsulamento de compostos bioativos e subsequente aplicação em embalagens de alimentos (ANTUNES et al., 2017).

A encapsulação via técnica de *electrospinning*, auxilia na liberação controlada e permite que as características funcionais e biológicas dos compostos bioativos sejam mantidas, uma vez que não são utilizadas temperaturas elevadas durante o processamento. Compostos bioativos obtidos a partir de plantas podem ser encapsulados e utilizado em embalagens de alimentos principalmente devido a sua ação antioxidante (MARQUES; FARAlH, 2009). Um exemplo é a erva-mate (*Ilex paraguariensis*), que é classificada como uma planta do sul da América, consumida por uma infusão e que apresenta propriedades diuréticas, anti-inflamatórias e propriedades estimulantes (SCHINELLA et al., 2000). Compostos fenólicos são compostos abundantes no extrato de erva-mate e algumas de suas propriedades farmacológicas têm sido relacionadas principalmente ao alto conteúdo de ácido clorogênico e seus derivados (JAISWAL; SOVDAT; VIVAN; KUHNERT, 2010; MARQUES; FARAH, 2009). Neste contexto, o extrato de erva-mate é uma alternativa promissora para utilização como antioxidantes naturais de baixo custo o poderia auxiliar na conservação de alimentos (LÓPEZ-CÓRDOBA; DELADINO; MARTINO; 2014), tornando-se um substituto aos aditivos sintéticos (MOURE et al. 2001).

Na literatura atual, o extrato de erva-mate foi encapsulado por diferentes técnicas e em diferentes matrizes poliméricas, como em esferas de alginato de cálcio (DELADINO et al., 2008; DELADINO et al., 2013), em matriz de sacarose (DELADINO et al., 2007) e em filmes biodegradáveis de ácido polilático (JARAMILLO et al., 2016; ARRIETA, et al., 2018). No entanto, não há relatos até o momento do encapsulamento do extrato de erva-mate via técnica de *electrospinning*. Diversos estudos relatam a encapsulação de compostos bioativos como probióticos, proteínas e lipídeos funcionais através da técnica de *electrospinning* usando zeína como matriz polimérica (ALEHOSSEINI et al., 2019; ANTUNES et al., 2017, SILVA et al., 2018). Os materiais resultantes desses estudos exibiram bons resultados de retenção e liberação controlada em comparação com componentes não encapsulados (CHEN et al., 2010; FERNÁNDEZ; TORRES-GINER; LAGARON, 2009; LOPEZ-RUBIO, SANCHEZ; SANZ; LAGARON, 2009). Portanto, o presente trabalho visa encapsular o extrato de erva-mate em fibras de zeína pela técnica de *electrospinning* e avaliar seu potencial como matriz de liberação para embalagens de alimentos.

5.2 Material e Métodos

5.2.1 Materiais

Erva-mate (*Ilex paraguariensis*) adquirida localmente da cidade de Ijuí, RS, e usada como matéria-prima para a extração do extrato de erva-mate. A zeína (97% de pureza, Sigma-Aldrich) foi usada como polímero para a produção de fibras. Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico.

5.2.2 Obtenção do extrato de erva-mate

O extrato de erva-mate foi obtido segundo metodologia descrita por Córdoba et al., (2013) com algumas modificações. Aproximadamente 300 g de erva-mate moída e 1 L de água destilada foram adicionados a um frasco de 2 L; o frasco foi então aquecido à temperatura de ebulição (100 ºC) usando uma manta de aquecimento por 1 h. Subsequentemente, o material foi filtrado, congelado a -80 °C e liofilizado.

5.2.3 Compostos fenólicos totais

O conteúdo fenólico total foi determinado usando o reagente de Folin-Ciocalteau. Dois gramas de extrato liofilizado de erva-mate foram homogeneizados com 20 mL de metanol por uma hora e centrifugados por 20 min a 5.000 rpm em centrífuga refrigerada a 4 ºC. Uma alíquota de 250 µL do sobrenadante foi diluída em 4 mL de água. Tanto as amostras como o controle (contendo 250 µL de metanol) foram combinados com 250 mL de reagente de 0,25 N de Folin-Ciocalteau (SWAIN; HILLIS, 1959). Após 3 min de reação, 500 mL de Na_2CO_3 1 N foram adicionados, a mistura que foi incubada durante 2 h à temperatura ambiente, e a absorbância foi medida a 725 nm com resultados expressos como mg de equivalentes de ácido gálico por 100 g de peso seco (mg GAE g^{-1} peso seco).

5.2.4 Compostos fenólicos individuais

A análise de compostos fenólicos individuais foi realizada usando um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (Shimadzu, Japão) acoplado a um espectrômetro de massa QTOF (Impact HD, Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha). Para isso, 100 mg de extrato de erva-mate e fibras foram homogeneizados com solução de

1,990 µL de metanol em água (75%, v / v) acidificada com 0,1% (v / v) de ácido fórmico e 10µL de reserpina a 200µg mL^{-1}. (padrão interno). A mistura foi agitada em vórtex durante 10 segundos, sonicada num banho de ultra-som (Quimis, Brasil) durante 15 min a temperatura ambiente e depois centrifugada durante 10 min a 11.000 x g (Eppendorf, 5430R, Hamburgo, Alemanha).

O sobrenadante resultante foi filtrado usando membrana de nylon 0,22 µm e analisado. A análise foi realizada utilizando uma coluna Bidentate C18 (100 x 2,1 mm, MicroSolv Technology Corporation, Eatontown, NJ, EUA), fase A (água com 0,1% (v / v) de ácido fórmico) e fase B (acetonitrilo com 0,1% (v / v) ácido fórmico) e após o programa de gradiente: 5% B (0,0 min), 0-90% B em 0,01-15 min, 90% em 15-18 min e 90-5% B em 18,01- 20 minutos. Em seguida, a coluna foi reequilibrada durante 6 min utilizando a composição inicial do solvente. A vazão foi ajustada para a 0,2 mL min^{-1} e a temperatura da coluna foi mantida a 40 °C. 10 µL de cada solução amostra foram injetados e analisados em duplicata. Os parâmetros operacionais da MS foram os seguintes: tensão capilar, +3500 V; pressão do nebulizador, 40 psi; vazão de gás de secagem, 9 L min^{-1}; temperatura do gás, 200 ºC. Espectros de massa precisos da EM foram registrados na faixa de m / z 50-1200. A calibração externa do EM foi realizada usando solução de formiato de sódio (10 mM). Para a quantificação dos compostos fenólicos, foram preparadas curvas externas de calibração com padrões comerciais e os parâmetros encontram-se na Tabela 5. Os dados de EM foram processados por meio de Análise de Dados 4.0 e análise de quantificação de bússola da Bruker Daltonics (Bremen, Alemanha).

Tabela 5- Parâmetros do método CLAE -EM para quantificação de compostos fenólicos .

Composto	**$[M-H]^-$**	**Tempo de retenção**	**Faixa linear**	**Equação de regressão**	**r^2**	**LD[1] (ng/mL)**	**LQ[2] (ng/mL)**
Ácido clorogênico	353,0867	6,41	313-5000	y = 22,997x – 6448,70	0,9902	11,98	36,31
Ácido caféico	179,0338	6,97	156-5000	y = 156,27x - 13,642,33	0,9984	11,52	34,91
Rutina	609,1450	7,57	156-2500	y = 47,57x + 5067,68	0,9945	37,23	112,82
Quercetina	301,0343	9,79	156-2500	y = 125,94x – 13950,36	0,9999	20,92	63,40
Kaempferol	285,0393	10,73	156-2500	y = 201,73x – 4158,05	0,9993	20,20	61,22

[1]LD: limite de detecção; [2]LQ: limite de quantificação.

5.2.5 Preparação de soluções poliméricas de zeína

A solução de zeína (30%) foi preparada dissolvendo 3 g de polímero em 10 mL de etanol aquoso a 70% (v/v), agitando-se durante 1 h à temperatura ambiente. O extrato de erva-mate, em diferentes concentrações (0, 1, 3 e 5%, p/v), foi adicionado às soluções poliméricas de zeína. As soluções finais foram agitadas em um agitador magnético por cerca de 1 h antes do processo de *electrospinning.*

5.2.6 Caracterização das soluções poliméricas

Os parâmetros reológicos das soluções poliméricas foram medidos usando um reômetro programável (Brookfield, Modelo DV - III ULTRA, EUA). A solução foi vertida (aproximadamente 0,5 mL) em recipiente de aço inoxidável acoplado ao reômetro com spindle nº 51 e analisado na velocidade de cisalhamento de $\gamma = 0 – 100\ s^{-1}$. O modelo de lei de potência (Equação 4) foi aplicado para determinar a viscosidade aparente "ηap" a 55 s^{-1}, o coeficiente de consistência "κ" $(Pa.s)^n$ e o índice de comportamento do fluxo "n" (u.a).

$$\sigma = k.\gamma n \qquad (4)$$

Onde σ é a tensão de cisalhamento aplicada (Pa) e γ a taxa de cisalhamento (s^{-1}).

A condutividade elétrica foi determinada usando um medidor de condutividade portátil (MS Tecnopon, modelo mCA 150P, Brasil), em triplicata à temperatura ambiente.

5.2.7 Produção de fibras pela técnica de *electrospinning*

As soluções poliméricas foram colocados em uma seringa de 3 mL, com agulha de 0,7 mm de diâmetro e bomba de infusão de seringa (KD Scientific, 100, Holliston, England) para controlar a taxa de fluxo da solução de polímero a 1 mL / h. O processo de *electrospinning* foi conduzido conectando-se o eletrodo positivo (+ 20 kV) da fonte de energia (INSTOR, INSES-HV30, Brasil) para a agulha, enquanto o eletrodo negativo (-3 kV) para um coletor de aço inoxidável que foi coberto folha de alumínio. A distância horizontal entre a bomba de infusão e a ponta da agulha foi de 20 cm. No processo, a temperatura foi controlada a 23 ± 2 °C por um condicionador de ar e a umidade relativa foi ajustada a 45 ± 2% com um desumidificador.

5.2.8 Morfologia e distribuição de diâmetro das fibras

A morfologia das fibras foi analisada utilizando um microscópio eletrônico de varredura (MEV, Modelo K550, Emitech, Ashford, Kent, Reino Unido). As amostras foram analisadas a uma voltagem de aceleração de 10 kV. O diâmetro médio e a distribuição de diâmetro das fibras foram avaliados a partir das micrografias, com base em 50 fibras selecionadas aleatoriamente usando o *software* ImageJ.

5.2.9 Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) das fibras

As interações entre as concentrações nas fibras serão investigadas usando espectrômetro de reflexão total atenuada por infravermelho (FTIR - ATR) de transformada de Fourier (IR Prestige21; Shimadzu Corp. Japão). A análise será feita na região do infravermelho médio na faixa de 4000 a 500 cm^{-1} e com resolução espectral de 4 cm^{-1}. Os sinais serão processados utilizando o software GRAMS (Galactic Industries Corp., Salem, NH, USA).

5.2.10 Propriedades térmicas das fibras

A estabilidade térmica das fibras, bem como extrato de erva-mate foi avaliada utilizando um analisador termogravimétrico (TGA, TA-60WS, Shimadzu, Kyoto, Japão). As amostras (cerca de 5 mg) foram aquecidas em cápsulas de platina na faixa de 30 a 600 ºC, a uma taxa de aquecimento de 10 $ºC.min^{-1}$, com fluxo de nitrogênio de 50 $mL.min^{-1}$. Uma cápsula de platina vazia foi usada como referência.

5.2.11 Cinética de liberação in vitro

Foram realizados testes de liberação *in vitro* para as fibras de zeína incorporadas com as diferentes concentrações do extrato de erva-mate em meio etanol 10% que de acordo com o Regulamento da Comissão 10/2011 da UE (10/2011 / EC), é considerado como simulante de alimentos para produtos alimentares hidrofílicos. Um método adaptado de Costamagna et al. (2017) foi usado para criar os perfis de liberação.

Resumidamente, 160 mg de amostras de fibra de zeína foram imersas em 2 mL do de etanol 10% (simulante de alimentos hidrofílicos) à temperatura ambiente. Em intervalos de tempo apropriados, a concentração do extrato de erva-mate no meio de liberação foi

estimada medindo a absorbância do sobrenadante a um comprimento de onda de 301 nm usando um espectrofotômetro (SpectraMax 190, Microplate reader, Molecular Devices, EUA). Uma curva de calibração foi construída registrando todo o espectro do extrato de erva-mate diluído em etanol a 10%. Os dados obtidos foram utilizados para determinar a quantidade total do extrato de erva-mate liberado das fibras de zeína em cada ponto de tempo. Três repetições de cada amostra foram analisadas.

5.2.12 Atividade antioxidante

A atividade antioxidante do extrato de erva-mate e das fibras foi avaliada através da capacidade de sequestrante do radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH) (BRAND-WILLIAMS ET AL., 1995; ROESLER et al., 2007). As amostras (1 mg) foram pesadas em tubos falcon adicionadas de 3,9 mL da solução de DPPH recentemente preparada em metanol (absorbância ajustada para 1,1 ± 0,02). As amostras foram agitadas em vortex por 30 s e deixadas em repouso ao abrigo da luz. Ao final de 2 h 30 min a absorbância foi medida a 515 nm e a capacidade de sequestrar o radical, expressa em porcentagem, foi calculada em relação ao controle (sem antioxidante), conforme a Equação 5:

$$\%\ \text{inhibition}\ \frac{\text{ABS branco} - \text{ABS amostra}}{\text{ABS branco}} \text{x}100\% \qquad (5)$$

5.2.13 Análise estatística

Os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) através do *softwere* STATISTICA 7.0 (StatSoft, França), e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey com nível de significância de 5%.

5.3 Resultados e Discussão

5.3.1 Caracterização de soluções de *electrospinning*

Estudos relatam que o processo de *electrospinning* é dependente da viscosidade da solução (MERCANTE et al., 2017), portanto, uma avaliação reológica foi realizada em soluções de zeína com diferentes concentrações de extrato de erva-mate (0%, 1%, 3% e 5%) (Tabela 6). De acordo com os valores de r^2 (~ 0,99) (Tabela 6), o modelo de lei de potência aplicado às soluções estudadas foi adequado.

As soluções de zeína, independentemente da concentração do extrato, apresentaram comportamento reológico newtoniano (n próximo a 1). Além disso,

observou-se que a viscosidade das soluções aumentou com o aumento da concentração do extrato de erva-mate nas soluções (Tabela 6).

Segundo Shi et al. (2019), esse tipo de comportamento reológico é atribuído a soluções de polímeros neutros, em que a zeína forma agregados de tamanho limitado e esses agregados são distribuídos uniformemente em soluções. Segundo Tiwari e Venkatraman (2012), a viscosidade da solução é um dos requisitos mais importantes no processo de *electrospinning*, uma vez que está associada à habilidade da solução polímero na formação das fibras (*electrospinnibility*). Os mesmos autores sugeriram que a viscosidade deve ser alta o suficiente, em sinergia com a repulsão eletrostática, para superar as forças associadas à tensão superficial. No presente estudo, foi possível sugerir que o comportamento reológico associado às diferentes concentrações do extrato de erva-mate não influenciou o processo de *electrospinning*, mostrando que nas concentrações estudadas, as soluções permaneceram estáveis durante todo o processo, sem gotejamento excessivo.

Tabela 6. Parâmetros reológicos e condutividade elétrica de soluções de zeína em diferentes concentrações de extrato de erva-mate (0%, 1%, 3% e 5%).

Solução de *electrospinning*	Condutividade elétrica ($mS.cm^{1}$)	Parâmetros Reológicos			
		n	$K(Pa.s)^n$	r^2	η (Pa.s) ($\gamma = 55\ s^{-1}$)
Zeína	951,00 ± 5,71 [a]	1,09 ± 0,01	0,56 ± 0,02[d]	0,9971	0,57 ± 0,02[d]
Zeína 1% EEM*	944,50 ± 2,04[b]	1,04 ± 0,02	0,77 ± 0,05[c]	0,9993	0,71 ± 0,01[c]
Zeína 3% EEM	937,00 ± 0,81[c]	1,05 ± 0,01	0,84 ± 0,03[b]	0,9990	0,86 ± 0,03[b]
Zeína 5% EEM	923,50 ± 1,22[d]	1,03 ± 0,02	1,10 ± 0,01[a]	0,9999	1,01 ± 0,07[a]

Resultados são expressos como média (n = 3) ± desvio padrão.
* EEM: Extrato de erva mate
[a,b,c] Valores com letras diferentes na mesma coluna são significativamente diferentes ($p < 0.05$).
Parâmetros reológicos: κ = coeficiente de consistência, n = índice de comportamento do fluxo, ηap = viscosidade aparente.

A condutividade elétrica das soluções poliméricas é outro parâmetro que influencia o processo de *electrospinning,* principalmente na morfologia das fibras (MERCANTE et al., 2017). A partir da Tabela 6, é possível observar que houve diminuição nos valores de condutividade elétrica conforme houve aumento na concentração do extrato de erva-mate na solução. Segundo Mercante et al. (2017), a adição de materiais não condutores à

solução de polímero pode diminuir a condutividade das soluções e consequentemente influenciar o diâmetro das fibras. Neste trabalho, apesar da diminuição da condutividade elétrica nas soluções de acordo com a maior quantidade de extrato, nenhum gotejamento foi observado, o que implicou em um processamento estável.

5.3.2 Caracterização das fibras

5.3.2.1 Morfologia e distribuição de tamanho das fibras

O efeito do teor de extrato de erva-mate nas estruturas morfológicas das fibras de zeína e a distribuição de tamanho estão apresentados na Figura 17.

Em geral, as fibras elaboradas somente com zeína (0% de extrato de erva-mate) apresentaram morfologia similar a fitas, no entanto, conforme aumento da concentração do extrato, foram observadas mudanças na forma das fibras. Nas fibras contendo 5% de extrato de erva-mate, observa-se uma forma mais cilíndrica, mostrando-se diferente da morfologia de fitas quando comparada às fibras elaboradas com zeína pura (0% de extrato de erva-mate).

Em relação à distribuição de tamanho, não foi observada uma tendência. No entanto, observou-se que as fibras de zeína com maior concentração de extrato de erva-mate (5%) apresentaram maior diâmetro médio, onde é possível relacionar com a maior viscosidade da solução (Tabela 6). Considerando as imagens apresentadas na Figura 17, é possível sugerir que as fibras de zeína com diferentes concentrações de extrato de erva-mate apresentam potencial para aplicação em embalagens de alimentos, pois fibras homogêneas com excelente morfologia auxiliam na taxa constante de liberação de compostos bioativos (TIWARI; VENKATRAMAN, 2012).

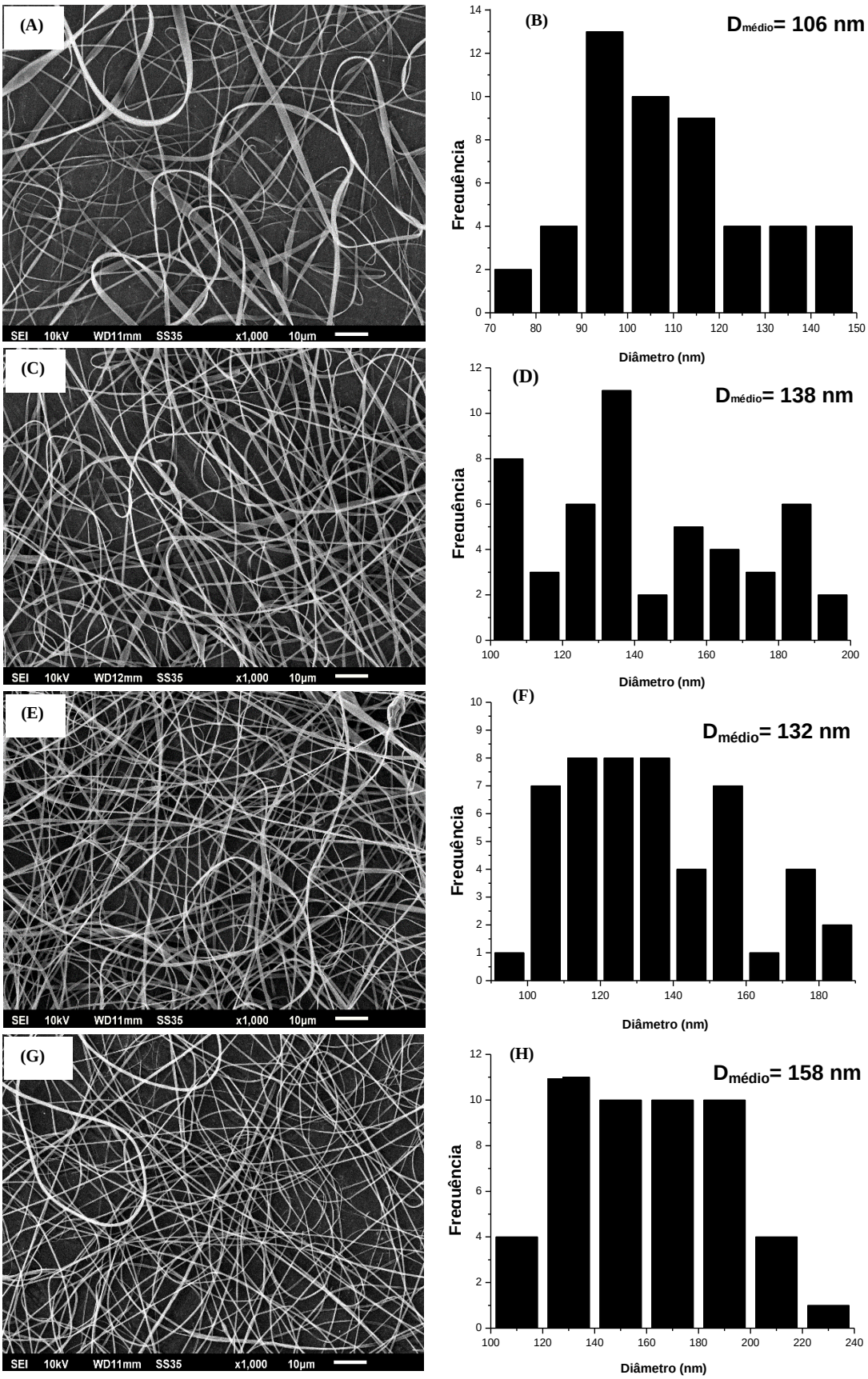


Figura 17- Morfologia e distribuição de tamanho das fibras de zeína carregadas com extrato de erva-mate 0% (a - b), 1% (c - d), 3% (e - f) e 5% (g - h).

5.3.2.2 Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FT-IR) das fibras

A espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTI-R) é frequentemente usada para estabelecer diferenças estruturais nas fibras carregadas com compostos bioativos (LEIDY; XIMENA, 2019). Por esta razão, as fibras de zeína produzidas com diferentes concentrações de extrato de erva-mate foram analisadas por FTIR e estão apresentadas na Figura 18.

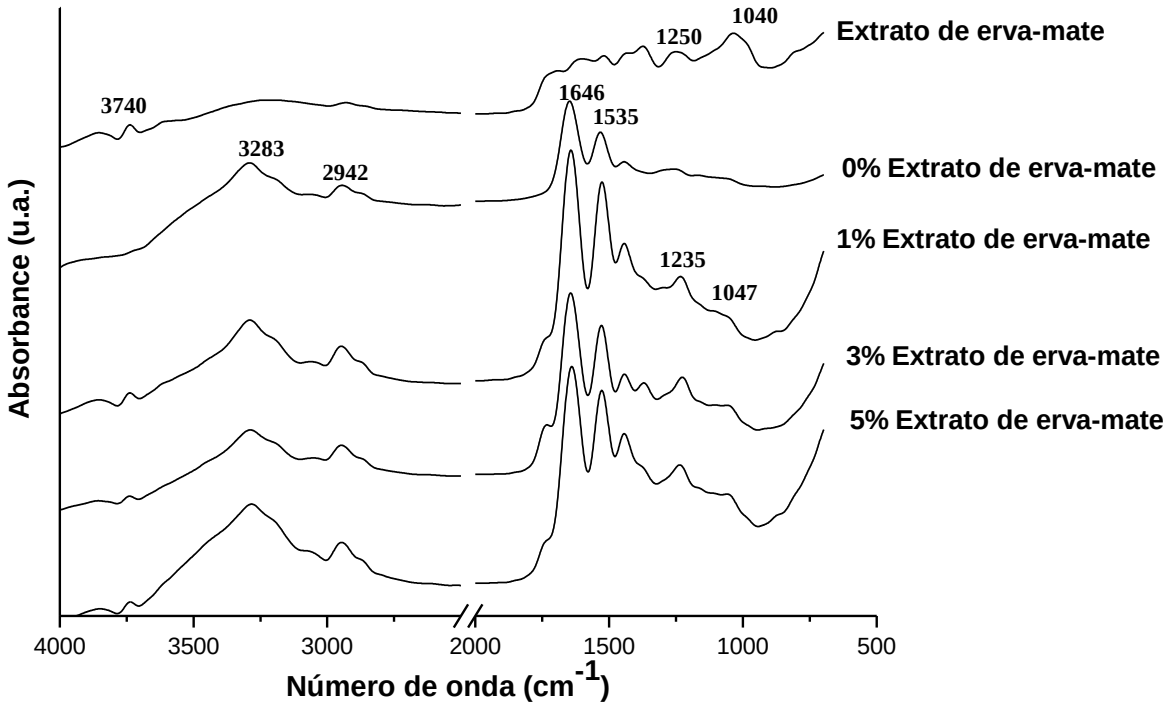


Figura 18- Espectros de FTIR do extrato de erva-mate e das fibras de zeína carregados com extrato de erva-mate (0%, 1%, 3% e 5%).

Nos espectros do extrato puro de erva-mate e nas fibras carregadas com 1%, 3% e 5% de extrato de erva-mate observa-se uma faixa em torno de 3740 cm^{-1} que está associada à vibração de alongamento dos grupos -OH a qual pode ser associada aos resíduos de moléculas de lignina e celulose da erva-mate. A banda em 1250 cm^{-1} de extrato puro de erva-mate apresentou uma sucinta mudança para 1235 cm^{-1} nas fibras carregadas com extrato de erva-mate. Segundo Arrieta et al. (2018), esta faixa está associada a vibrações esqueléticas aromáticas de compostos presentes na erva-mate. A faixa em 1040 cm^{-1} que apresentou deslocamento para 1047 cm^{-1} nas fibras contendo extrato de erva-mate está relacionada à vibração de alongamento do grupo CN das aminas presentes na erva-mate (GULLÓN et al., 2018). Assim, é possível sugerir que

estas bandas fornecem indícios do carregamento do extrato de erva-mate nas fibras de zeína.

Além disso, nas fibras com diferentes concentrações de extrato de erva-mate, são identificadas bandas em torno de 3283, 1646 e 1535 cm^{-1}, que indicam a presença de amida A (alongamento NH), amida I (alongamento de CO) e amida II (Flexão de NH e estiramento CN), respectivamente (ALTAN; AYTAC; UYAR, 2018), o que já era esperado, uma vez que esta é uma região de impressões digitais de proteínas como a zeína. A faixa em torno de 2942 cm^{-1} é atribuída à ligação C-H presente na estrutura da zeína (ANTUNES et al., 2017).

5.3.2.3 Estabilidade térmica das fibras

A estabilidade térmica e a temperatura de decomposição do extrato de erva-mate e fibras com diferentes concentrações de extrato de erva-mate (0%, 1%, 3% e 5%) foram analisadas através da análise termogravimétrica (TG) e da primeira derivada (DTG) (Figura 19).

No extrato é possível identificar 3 regiões de decomposição térmica. A primeira região (aproximadamente 80 °C) refere-se à evaporação da umidade da amostra. A segunda região em torno de 220 ºC está associada à decomposição de alguns componentes de baixo peso molecular presentes no extrato. A terceira região em torno de 310 °C está associada à decomposição térmica de compostos de estrutura mais complexa, como hemicelulose e pectinas (MONDRAGON et al., 2014, GULLÓN et al., 2018; ARRIETA et al., 2018).

As fibras de zeína com as diferentes concentrações do extrato apresentaram duas regiões de perda de massa (Figura 19). A primeira região em torno de 80 °C, assim como no termograma do extrato de erva-mate, está associada à perda de umidade. A segunda região, observada em torno de 325 °C, está associada à degradação de proteínas e clivagem de ligações peptídicas (ANTUNES et al., 2017; NEO et al., 2013). A partir da análise térmica das fibras é possível sugerir que o extrato de erva-mate quando incorporado na matriz polimérica das fibras de zeína apresentou maior estabilidade térmica, já que nas fibras com diferentes concentrações de extrato de erva-mate apresentou temperatura de decomposição térmica superior à extrato puro de erva-mate.

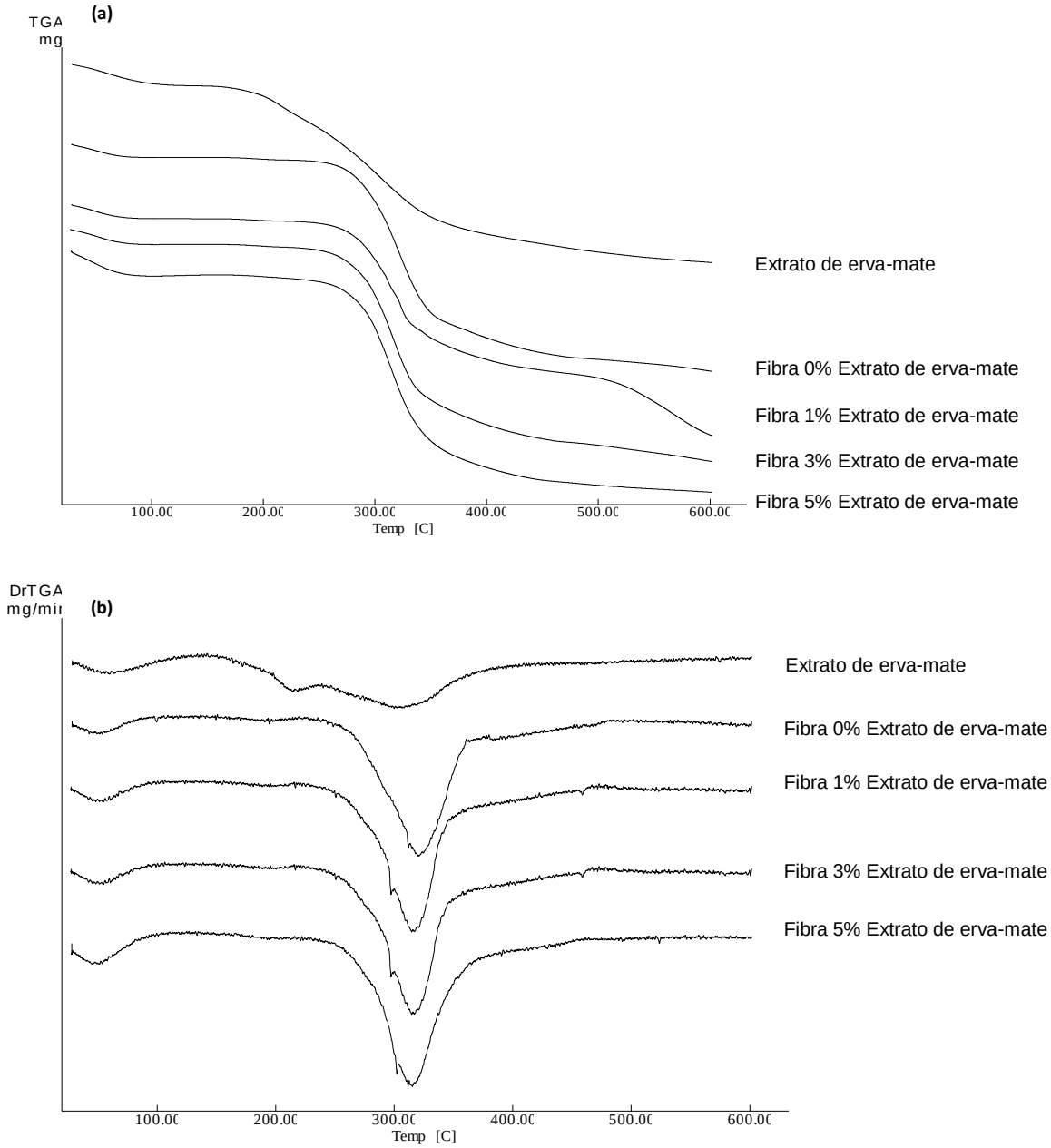


Figura 19- Análise termogravimétrica (TGA) (a) e suas primeiras derivadas (DTG) (b) de extrato de erva-mate e fibras de zeína carregadas com extrato de erva-mate (0%, 1%, 3% e 5%).

A encapsulação de compostos bioativos através da técnica de *electrospinning* é uma alternativa interessante porque através deste processo é possível aumentar a estabilidade térmica destes compostos e facilitar o desenvolvimento de materiais de embalagem com potencial antioxidante (BAZANA; CODEVILLA; MENEZES, 2019). Portanto, é possível sugerir que as fibras de zeína com diferentes concentrações de extrato de erva-mate produzidas no presente estudo apresentam potencial para aplicação em embalagens de alimentos ativos.

5.3.2.4 Compostos fenólicos totais e individuais

O teor total de fenólicos do extrato foi de 1287,76 ± 11,55 mg de ácido gálico, 100 g^{-1} de extrato de erva-mate. Os conteúdos médios de compostos fenólicos quantificados por HPLC-MS são apresentados na Tabela 7. Neste estudo, o ácido clorogênico e a rutina foram os principais compostos fenólicos observados no extrato de erva-mate, corroborando os resultados de Deladino et al. 2013. Além disso, ácido cafeico, kaempferol e quercetina também foram detectados no extrato de erva-mate. Algumas das propriedades biológicas do extrato de mate, incluindo propriedades antioxidantes e antimicrobianas notáveis, são atribuídas à presença desses compostos (BURRIS et al., 2012).

Tabela 7- Composição fenólica (µg g^{-1}) do extrato de erva-mate e fibras de zeína carregadas com diferentes concentrações de extrato de erva-mate (0%, 1%, 3% e 5%).

Amostra	Ácido Clorogênico	Ácido Caféico	Kaempferol	Quercetina	Rutina
Extrato de erva mate (EEM)	9975,95 ± 18,64	199,02 ± 0,27	2,48 ± 0,02	12,22 ± 0,00	1192,47 ± 2,73
Fibras 1% EEM	743,62 ± 7,12	9,58 ± 0,13	< LD[1]	1,12 ± 0,00	64,85 ± 1,57
Fibras 3% EEM	854,98 ± 0,73	11,46 ± 0,00	0,20 ± 0,00	1,12 ± 0,00	84,14 ± 0,34
Fibras 5% EEM	899,75 ± 0,00	14,46 ± 0,00	0,22 ± 0,00	1,20 ± 0,00	102,72 ± 1,80

[1] LD: limite detectável.

Todos os compostos fenólicos observados no extrato foram detectados nas fibras de zeína carregadas com 1%, 3% e 5% de extrato de erva-mate, exceto o kaempferol que estava abaixo do LD em fibras compostas com 1% de extrato. Como observado na Tabela 7, as fibras de zeína com 5% de extrato apresentaram maiores níveis ($p < 0,05$) de compostos fenólicos individuais analisados. Como controle, fibras elaboradas apenas com zeína (0% de extrato de erva-mate) também foram avaliadas, mas nenhum dos compostos fenólicos descritos acima foi detectado.

5.3.2.5 Atividade antioxidante das fibras

A atividade antioxidante das fibras carregadas com as diferentes concentrações de extrato de erva-mate foi realizada pelo ensaio DPPH e é mostrada na Figura 20.

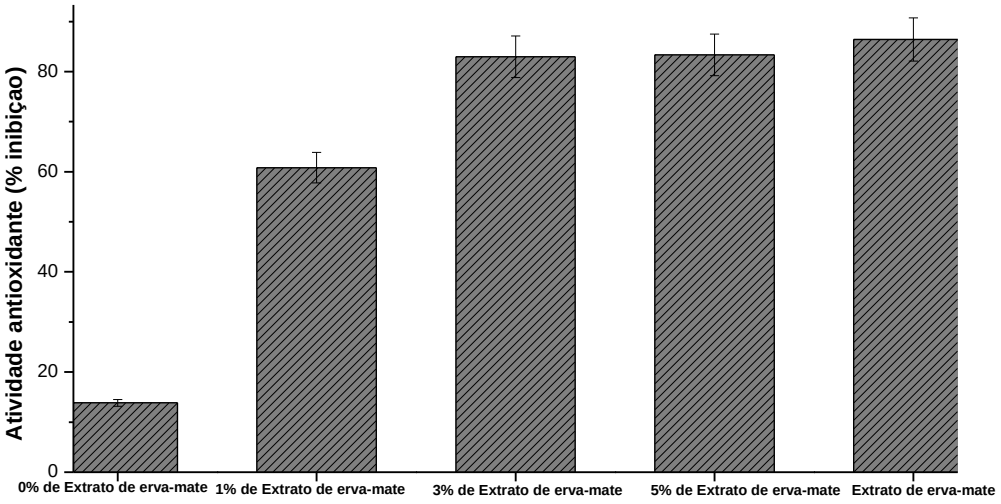


Figura 20- Atividade antioxidante do extrato de erva-mate e fibras de zeína carregadas com extrato de erva-mate (0%, 1%, 3% e 5%).

A atividade sequestrante do radical DPPH baseia-se na redução do DPPH na presença de um doador antioxidante de hidrogênio (ALTAN et al., 2018). A atividade antioxidante das fibras de zeína carregadas com extrato de erva-mate variou de 61 a 83%, seguindo uma tendência, ou seja, quanto maior a concentração de extrato nas fibras, maior sua atividade antioxidante. A fibra de zeína (0% de extrato de erva-mate) apresentou atividade antioxidante de 13%, que segundo Aytac et al. (2016), pode estar relacionada à absorção da solução de DPPH devido à alta área superficial das fibras, proporcionando maior contato com o meio. Além disso, alguns autores atribuem a atividade antioxidante da zeína à α-zeína presente em sua composição (LI et al., 2013; ZHANG et al., 2011).

Segundo Bazana, Codevilla e Menezes (2019), extratos naturais são fontes de antioxidantes, como compostos fenólicos cuja atividade é bem conhecida nas indústrias farmacêutica, cosmética e alimentícia, e podem substituir estabilizadores sintéticos amplamente utilizados na indústria de embalagens. Neste estudo, os resultados mostraram que as fibras de zeína incorporadas com diferentes conteúdos de extrato de erva-mate apresentaram capacidade antioxidante e potencial para aplicação como antioxidantes naturais, principalmente para liberação em embalagens de alimentos.

5.3.2.5 Cinética de liberação *in vitro*

As fibras de zeína carregadas com 1%, 3% e 5% de extrato de erva-mate foram estudadas quanto ao sua cinética de liberação em meio simulante de alimentos (Figura

21). O meio escolhido para simulação foi 10% de etanol, que simula alimentos hidrofílicos (Regulamento da Comissão UE, 2011).

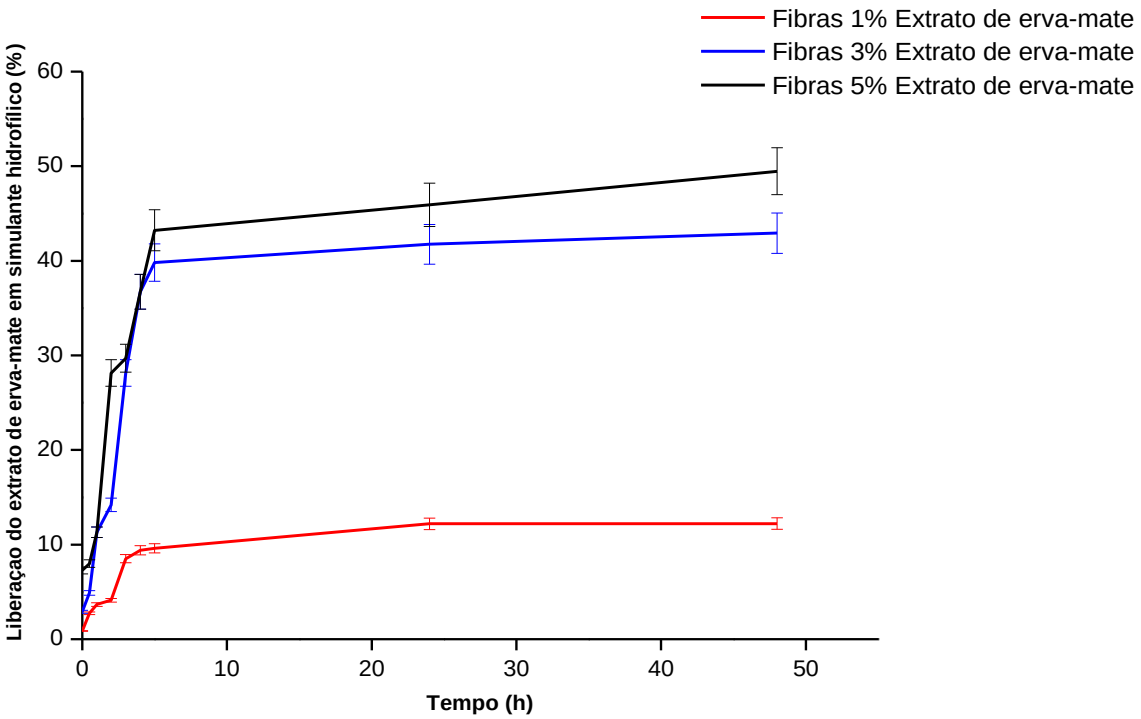


Figura 21- Liberação *in vitro* de extrato de erva-mate de fibras de zeína carregadas com diferentes concentrações de extrato de erva-mate (0%, 1%, 3% e 5%).

Basicamente, observou-se um aumento na liberação de extrato de erva-mate, uma vez que a concentração de extrato de erva-mate aumentou nas fibras de zeína. Além disso, uma liberação inicial marcada seguida por liberação prolongada de extrato de erva-mate foi observada. Na liberação de matrizes poliméricas, os mecanismos mais importantes que regulam o perfil de liberação de um composto ativo são a difusão e a pressão osmótica (POTHAKAMURY; BARBOSA-CÁNOVAS, 1995). A relevância de cada um dependerá em grande parte da composição da matriz polimérica e do fluido circundante através do qual o composto ativo será liberado (LÓPEZ-CÓRDOBA; DELADINO; MARTINO, 2014).

A técnica de *electrospinning*, quando aplicada ao encapsulamento de compostos bioativos, além de melhorar a estabilidade química e térmica, também proporciona benefícios para a saúde através da proteção e liberação controlada de compostos bioativos (BAZANA; CODEVILLA; MENEZES, 2019). Portanto, a partir desse resultado é possível sugerir que as fibras de zeína carregadas com diferentes concentrações de extrato de erva-mate, especialmente as fibras carregadas com 5%, podem ser utilizadas

em embalagens de alimentos para liberação controlada de agentes bioativos ricos em compostos fenólicos como é o caso de extrato de erva-mate.

5.4 Conclusão

As fibras de zeína com extrato de erva-mate produzidas através do processo de *electrospinning* foram obtidas com sucesso. As soluções poliméricas utilizadas para a produção das fibras apresentaram um comportamento newtoniano. As fibras e zeína sem adição do extrato de erva-mate apresentaram morfologia semelhante a fitas, a qual houve modificações pela adição do extrato de erva-mate, porém apresentaram morfologia homogênea. O extrato de erva-mate foi incorporado com sucesso nas fibras de zeína, fato pelo qual foi comprovado através das análises de propriedades térmicas e FT-IR. A atividade antioxidante foi maior com o aumento da concentração de extrato de erva-mate nas fibras. De acordo com a cinética de liberação em meio simulante de alimentos hidrofílicos, o extrato de erva-mate, independente da concentração, apresentou liberação sustentada, no entanto as fibras contendo 5% de extrato de erva-mate apresentaram maior liberação do extrato (~50%) em 50 horas de estudo. As fibras de zeína carregadas com extrato de erva-mate apresentaram alta atividade antioxidante, mostrando grande potencial para aplicação na produção de embalagens ativas para alimentos.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

No presente estudo foi utilizada a técnica de *electrospinning* para elaboração de fibras de isolado proteico de soja e zeína para encapsulação de β-caroteno e extrato de erva-mate, respectivamente. Foi possível verificar que o β-caroteno quando encapsulado em fibras de isolado proteico de soja através do preparo de emulsões estáveis alcança uma eficiência de encapsulação de 51%. Também foi verificado que o extrato de erva-mate quando encapsulado em fibras de zeína, apresenta alta atividade antioxidante. O desenvolvimento desse estudo fornece dados quantitativos e qualitativos para a aplicação dessas proteínas como matrizes de encapsulação de compostos bioativos para usos industriais, principalmente na indústria de embalagens para alimentos. Além disso, os resultados obtidos podem auxiliar em estudos futuros na área de embalagens para alimentos.

REFERÊNCIAS

ABDELHEDI, O.; JEMIL, I.; NASRI, R.; MORA, L.; JRIDI, M.; MBAREK, A.; NASRI, M. Molecular forces study and microstructure and gelling properties of smooth hound protein gels prepared by heat-induced gelation process: Effect of pH variation on textural and functional properties. **Process Biochemistry**, v. 51, p.1511-1520, 2016.

ALEHOSSEINI, A.; GÓMEZ-MASCARAQUE, L. G.; MARTÍNEZ-SANZ, M.; LÓPEZ-RUBIO, A. Electrospun curcumin-loaded protein nanofiber mats as active/bioactive coatings for food packaging applications. **Food Hydrocolloids**, v. 87, p. 758-771, 2019.

ALTAN, A.; AYTAC, Z.; UYAR, T. Carvacrol loaded electrospun fibrous films from zein and poly (lactic acid) for active food packaging. **Food Hydrocolloids**, v. 81, p. 48-59, 2018.

ALVES, C.Q.; DAVID, J.M.; DAVID, J.P.; BAHIA, M.V.; AGUIAR, R.M. Methods for determination of in vitro antioxidant activity for extracts and organic compounds. **Química Nova**, v. 33, p. 2202–2210, 2010.

AMBRÓSIO, C. L. B.; DE ARRUDA CAMARA, F.; CAMPOS, S.; DE FARO, Z. P. A Carotenoids as an alternative against hypovitaminosis A. **Revista de Nutrição**, v. 19, p. 233-243, 2006.

ANTUNES, M. D.; DA SILVA DANNENBERG, G.; FIORENTINI, Â. M.; PINTO, V. Z.; LIM, L. T.; ZAVAREZE, E. R.; DIAS, A. R. G. Antimicrobial electrospun ultrafine fibers from zein containing eucalyptus essential oil/cyclodextrin inclusion complex. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 104, p. 874-882, 2017.

ANU BHUSHANI, J.; ANANDHARAMAKRISHNAN, C. Electrospinning and electrospraying techniques: Potential food based applications. **Trends in Food Science & Technology**, v. 38, p. 21–33, 2014.

ARRIETA, M. P.; PEPONI, L.; LÓPEZ, D.; FERNÁNDEZ-GARCÍA, M. Recovery of yerba mate (Ilex paraguariensis) residue for the development of PLA-based bionanocomposite films. **Industrial Crops and Products**, v. 111, p. 317-328, 2018.

ATAY, E.; FABRA, M. J.; MARTÍNEZ-SANZ, M.; GOMEZ-MASCARAQUE, L. G.; ALTAN, A.; LOPEZ-RUBIO, A. Development and characterization of chitosan/gelatin electrosprayed microparticles as food grade delivery vehicles for anthocyanin extracts. **Food Hydrocolloids**, v. 77, p. 699-710, 2018.

AYTAC, Z.; KESKIN, N. O. S.; TEKINAY, T.; UYAR, T. Antioxidant α-tocopherol/γ-cyclodextrin–inclusion complex encapsulated poly (lactic acid) electrospun nanofibrous web for food packaging. **Journal of Applied Polymer Science**, v.134, p. 44858, 2017.

BABITHA, S.; RACHITA, L.; KARTHIKEYAN, K.; SHOBA, E.; JANANI, I.; POORNIMA, B.; SAI, K. P. Electrospun protein nanofibers in healthcare: A review. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 523, p. 52-90, 2017.

BAZANA, M.; CODEVILLA, C. F.; MENEZES, C. R. Nanoencapsulation of Bioactive Compounds: Challenges and Perspectives. **Current Opinion in Food Science**, v. 26, p. 47-56, 2019.

BHARDWAJ, N.; KUNDU, S. C. Electrospinning: a fascinating fiber fabrication technique. **Biotechnology Advances**, v. 28, p. 325–34, 2010.

BHUSHANI, J. A.; ANANDHARAMAKRISHNAN, C. Electrospinning and electrospraying techniques: Potential food based applications. **Trends in Food Science & Technology**, v. 38, p. 21-33, 2014.

BIESALSKI, H. K.; DRAGSTED, L. O.; ELMADFA, I.; GROSSKLAUS, R.; MÜLLER, M.; SCHRENK, D.; WEBER, P. Bioactive compounds: definition and assessment of activity. **Nutrition**, v. 25, p. 1202-1205, 2009.

BIJI, K. B.; RAVISHANKAR, C. N.; MOHAN, C. O.; GOPAL, T. S. Smart packaging systems for food applications: a review. **Journal of Food science and Tec**hnology, v. 52, p. 6125-6135, 2015.

BRACESCO, N.; SANCHEZ, A. G.; CONTRERAS, V.; MENINI, T.; GUGLIUCCI, A. Recent advances on Ilex paraguariensis research: minireview. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 136, p 378-384, 2011.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity., **LWT - Food Science and Technology** v. 28, n. 1, p. 25-30, 1995.

BROCKGREITENS, J.; ABBAS, A. Responsive food packaging: recent progress and technological prospects. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 15, p. 3-15, 2016.

BURRIS, K. P.; HARTE, F. M.; DAVIDSON, P. M.; STEWART JR, C. N.; ZIVANOVIC, S. Composition and bioactive properties of yerba mate (Ilex paraguariensis A. St.-Hil.): a review. **Chilean Journal of Agricultural Research**, v. 72, p.268-274, 2012.

CHEN, F.; ZHANG, J. A new approach for morphology control of poly (butylene adipate-co-terephthalate) and soy protein blends. **Polymer**, v. 50, p. 3770-3777, 2009.

CHEN, X.; XU, X.; LIU, D.; ZHOU, G.; HAN, M.; WANG, P. Rheological behavior, conformational changes and interactions of water-soluble myofibrillar protein during heating. **Food Hydrocolloids**, v. 77, p. 524-533, 2018.

CHEN, Z.; CHEN, Z.; ZHANG, A.; HU, J.; WANG, X.; YANG, Z. Electrospun nanofibers for cancer diagnosis and therapy. **Biomaterials Science**, v. 4, p. 922-932, 2016.

CHO, D.; NETRAVALI, A. N.; JOO, Y. L. Mechanical properties and biodegradability of electrospun soy protein isolate/PVA hybrid nanofibers. **Polymer Degradation and Stability**, v. 97, p. 747-754, 2012.

CHO, D.; NNADI, O.; NETRAVALI, A.; JOO, Y. L. Electrospun hybrid soy protein/PVA fibers. **Macromolecular Materials and Engineering**, v. 295, p. 763-773, 2010.

COMMISSION REGULATION (EU) No 10/2011 of 14 January 2011 on plastic materials and articles intended to come into contact with food. 2011. 10/2011/EC.

CÓRDOBA, A. L.; DELADINO, L.; MARTINO, M. Effect of starch filler on calcium-alginate hydrogels loaded with yerba mate antioxidants. **Carbohydrate Polymers**, v. 95, p. 315-323, 2013.

COSTAMAGNA, M. S.; GÓMEZ-MASCARAQUE, L. G.; ZAMPINI, I. C.; ALBERTO, M. R.; PÉREZ, J.; LÓPEZ-RUBIO, A.; ISLA, M. I. Microencapsulated chañar phenolics: A potential ingredient for functional foods development. **Journal of Functional Foods**, v. 37, p. 523-530, 2017

DAMODARAN, S.; PARKIN, K. L.; FENNEMA, O. R. **Química de Alimentos,** v. 4, p. 900, 2010.

DE CAMPOS, R. M. L.; HIERRO, E.; ORDÓÑEZ, J. A.; BERTOL, T. M.; TERRA, N. N.; DE LA HOZ, L. Fatty acid and volatile compounds from salami manufactured with yerba mate (Ilex paraguariensis) extract and pork back fat and meat from pigs fed on diets with partial replacement of maize with rice bran. **Food Chemistry**, v. 103, 1159-1167, 2007.

DELADINO, L.; ANBINDER, P. S.; NAVARRO, A. S.; & MARTINO, M. N. Encapsulation of natural antioxidants extracted from Ilex paraguariensis. **Carbohydrate Polymers**, v. 71, p.126-134, 2008.

DELADINO, L.; ANBINDER, P. S.; NAVARRO, A. S.; MARTINO, M. N. Co-crystallization of yerba mate extract (Ilex paraguariensis) and mineral salts within a sucrose matrix. **Journal of Food Engineering**, v. 80. p. 573-580, 2007.

DELADINO, L.; NAVARRO, A. S.; MARTINO, M. N. Carrier systems for yerba mate extract (Ilex paraguariensis) to enrich instant soups. Release mechanisms under different pH conditions. **LWT-Food Science and Technology**, v. 53. p. 163-169, 2013.

DENG, L.; KANG, X.; LIU, Y.; FENG, F.; ZHANG, H. Characterization of gelatin/zein films fabricated by electrospinning vs solvent casting. **Food Hydrocolloids**, v. 74, p. 324-332, 2018

DESAI, K. G. H.; JIN PARK, H. Recent developments in microencapsulation of food ingredients. **Drying technology**, v. 23, p.1361-1394, 2005.

DIAS, M. I.; FERREIRA, I. C. F. R.; BARREIRO, M. F. Microencapsulation of bioactives for food applications. **Food & Function**, v. 6, p. 1035–1052, 2015.

DONHOWE, E. G.; FLORES, F. P.; KERR, W. L.; WICKER, L.; KONG, F. Characterization and in vitro bioavailability of β-carotene: Effects of microencapsulation method and food matrix. **LWT-Food Science and Technology**, 57, 42-48, 2014.

ESFANJANI, A. F.; ASSADPOUR, E.; JAFARI, S. M. Improving the bioavailability of phenolic compounds by loading them within lipid-based nanocarriers. **Trends in Food Science & Technology**, v. 76, p. 56-66, 2018.

EVANGELHO, J. A.; CRIZEL, R. L.; CHAVES, F. C.; PRIETTO, L.; PINTO, V. Z.; MIRANDA, M. Z.; DA ROSA ZAVAREZE, E. Thermal and irradiation resistance of folic acid encapsulated in zein ultrafine fibers or nanocapsules produced by electrospinning and electrospraying. **Food Research International,** In Press, 2018.

EZHILARASI, P. N.; KARTHIK, P., CHHANWAL, N.; ANANDHARAMAKRISHNAN, C. Nanoencapsulation techniques for food bioactive components: A review. **Food and Bioprocess Technology**, v. 6, p. 628–647, 2013.

FABRA, M. J.; LÓPEZ-RUBIO, A.; LAGARON, J. M. Biopolymers for food packaging applications. **In Smart polymers and their applications**, p. 476-509, 2014.

FABRA, M. J.; LÓPEZ-RUBIO, A.; AMBROSIO-MARTÍN, J.; LAGARON, J. M. Improving the barrier properties of thermoplastic corn starch-based films containing bacterial cellulose nanowhiskers by means of PHA electrospun coatings of interest in food packaging. **Food Hydrocolloids**, v. 61, p. 261-268, 2016.

FABRA, M. J.; LÓPEZ-RUBIO, A.; LAGARON, J. M. Use of the electrohydrodynamic process to develop active/bioactive bilayer films for food packaging applications. **Food Hydrocolloids**, v, 55, p.11-18, 2016.

FANG, Q.; ZHU, M.; YU, S.; SUI, G.; YANG, X. Studies on soy protein isolate/polyvinyl alcohol hybrid nanofiber membranes as multi-functional eco-friendly filtration materials. **Materials Science and Engineering: B**, v. 214, p.1-10, 2016.

FONG, H.; CHUN, I.; RENEKER, D. H. Beaded nanofibers formed during electrospinning. **Polymer**, v. 40, p. 4585-4592, 1999.

FONSECA, L. M.; DA SILVA, F. T.; ANTUNES, M. D. EL HALAL, S. L. M; LIM, L. T.; DIAS, A. R. G. Aging Time of Soluble Potato Starch Solutions for Ultrafine Fibers Formation by Electrospinning. **Starch-Stärke**, v.71, p.1800089, 2019.

FONSECA, L. M.; DE OLIVEIRA, J. P.; OLIVEIRA, P.; ZAVAREZE, E. R.; DIAS, A. R. G.; LIM, L. T. Electrospinning of native and anionic corn starch fibers with different amylose contents. **Food Research International**, v. 116, p.1 318-1326 2019.

GALE, C.R.; ASHURST, H.E.; POWERS, H.J.; MARTYN, C.N. Antioxidant vitamin status and carotid atherosclerosis in the elderly. **The American Journal of Clinical nutrition**, v.74, p. 402-408, 2001.

GE, W.; LI, D.; CHEN, M.; WANG, X.; LIU, S.; SUN, R. Characterization and antioxidant activity of β-carotene loaded chitosan-graft-poly (lactide) nanomicelles. **Carbohydrate Polymers**, v. 117, p. 169-176, 2015.

GHORANI, B.; TUCKER, N. Fundamentals of electrospinning as a novel delivery vehicle for bioactive compounds in food nanotechnology. **Food Hydrocolloids**, v.51, p. 227–240, 2015.

GHOSAL, K.; AGATEMOR, C.; ŠPITÁLSKY, Z.; THOMAS, S.; KNY, E. Electrospinning tissue engineering and wound dressing scaffolds from polymer–titanium dioxide nanocomposites**. Chemical Engineering Journal**. V. 358, p. 1262-1278, 2018.

GNOATTO, S.C.B.; SCHENKEL, E.P.; BASSANI, V.L. HPLC method to assay total saponins in Ilex paraguariensis aqueous extract. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v.16, p. 723-726, 2005

GÓMEZ-MASCARAQUE, L. G.; LAGARÓN, J. M.; LÓPEZ-RUBIO, A. Electrosprayed gelatin submicroparticles as edible carriers for the encapsulation of polyphenols of interest in functional foods. **Food Hydrocolloids**, v.49, p. 42-52, 2015.

GÓMEZ-MASCARAQUE, L. G.; LÓPEZ-RUBIO, A. Protein-based emulsion electrosprayed micro-and submicroparticles for the encapsulation and stabilization of thermosensitive hydrophobic bioactives. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 465, p. 259-270, 2016.

GÓMEZ-MASCARAQUE, L. G.; PÉREZ-MASIÁ, R.; GONZÁLEZ-BARRIO, R.; PERIAGO, M. J.; LÓPEZ-RUBIO, A. Potential of microencapsulation through emulsion-electrospraying to improve the bioaccesibility of β-carotene. **Food Hydrocolloids**, v. 73, p. 1-12, 2017a.

GÓMEZ-MASCARAQUE, L. G.; SIPOLI, C. C.; DE LA TORRE, L. G.; LÓPEZ-RUBIO, A. Microencapsulation structures based on protein-coated liposomes obtained through electrospraying for the stabilization and improved bioaccessibility of curcumin. **Food Chemistry**, v. 233, p. 343-350, 2017b.

GÜÇBILMEZ, Ç.M.; YEMENICIOĞLU, A.; ARSLANOĞLU, A. Antimicrobial and antioxidant activity of edible zein films incorporated with lysozyme, albumin proteins and disodium EDTA**. Food Research International** v. 40, p. 80–91, 2007.

GUGLIUCCI, A.; BASTOS, D. H. Chlorogenic acid protects paraoxonase 1 activity in high density lipoprotein from inactivation caused by physiological concentrations of hypochlorite. **Fitoterapia**, v.80, p. 138–142, 2009.

GULLÓN, B.; EIBES, G.; MOREIRA, M. T.; HERRERA, R.; LABIDI, J.; GULLÓN, P. Yerba mate waste: A sustainable resource of antioxidant compounds. **Industrial Crops and Products**, v.113, p. 398-405, 2018.

GUO, Y.; LIU, Z.; AN, H.; LI, M.; HU, J. Nano-structure and properties of maize zein studied by atomic force microscopy. **Journal of Cereal Science**. 41, 277–281, 2005.

HECK, C. I.; GONZÁLEZ DE MEJÍA, E. Yerba mate tea (Ilex paraguariensis): A comprehensive review on chemistry, health implications, and technological considerations. **Journal of Food Science**, v. 72, p. R138-R151, 2007.

HOMAYONI, H.; RAVANDI, S. A. H.; VALIZADEH, M. Electrospinning of chitosan nanofibers: processing optimization. **Carbohydrate Polymers**, v. 77, p. 656–661, 2009.

HOU, Z.; ZHANG, M.; LIU, B.; YAN, Q.; YUAN, F.; XU, D.; GAO, Y. Effect of chitosan molecular weight on the stability and rheological properties of β-carotene emulsions stabilized by soybean soluble polysaccharides. **Food Hydrocolloids**, v. 26, p. 205-211, 2012.

HUANG, Z. M.; ZHANG, Y. Z.; KOTAKI, M.; RAMAKRISHNA, S. A review on polymer nanofibers by electrospinning and their applications in nanocomposites. **Composites science and technology**, v.63, p. 2223-2253, 2003.

HUDSON, S.M. The spinning of silk-like proteins into fibers. In K. McGrath, D. Kaplan, (Eds.), **Protein-based Materials**, v. 10, 1997.

JAIN, A.; THAKUR, D.; GHOSHAL, G.; KATARE, O. P.; SHIVHARE, U. S. Characterization of microcapsulated β-carotene formed by complex coacervation using casein and gum tragacanth. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 87, p. 101-113, 2016.

JAISWAL, R.; SOVDAT, T.; VIVAN, F.; KUHNERT, N. Profiling and characterization by LC-MS n of the chlorogenic acids and hydroxycinnamoylshikimate esters in mate (Ilex paraguariensis). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, p. 5471-5484, 2010.

JAISWAL, R.; SOVDAT, T.; VIVAN, F.; KUHNERT, N. Profiling and characterization by LC-MSn of the chlorogenic acids and hydroxycinnamoylshikimate esters in maté (Ilex paraguariensis). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 58, 5471, 2010.

JARAMILLO, C. M.; GUTIÉRREZ, T. J.; GOYANES, S.; BERNAL, C.; FAMÁ, L. Biodegradability and plasticizing effect of yerba mate extract on cassava starch edible films. **Carbohydrate Polymers**, v.151, p.150-159, 2016.

JAWOREK, A. Micro-and nanoparticle production by electrospraying. **Powder Technology**, v. 176, p. 18-35, 2007.

JIN, E.; POLLE, J. E. W.; LEE, H. K.; HYUN, S. M.; CHANG, M. Xanthophylls in microalgae: from biosynthesis to biotechnological mass production and application. **Journal of Microbiology and Biotechnology,** v.13, p.165, 2003.

KAUR, S.; BARHATE, R.; SUNDARRAJAN, S.; MATSUURA, T.; RAMAKRISHNA, S. Hot pressing of electrospun membrane composite and its influence on separation performance on thin film composite nanofiltration membrane. **Desalination**, v. 279, p. 201-209, 2011.

KHADKA, D. B.; HAYNIE, D.T. Protein- and peptide-based electrospun nanofibers in medical biomaterials. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v.8, p. 1242-1262, 2012.

KONG, B.; XIONG, L.YO. Antioxidant Activity of Zein Hydrolysates in a Liposome System and the Possible Mode of Action. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.54, p. 6059–6068, 2006.

KONG, L.; BHOSALE, R.; ZIEGLER, G. R. Encapsulation and stabilization of β-carotene by amylose inclusion complexes. **Food Research International**, v. 105, p. 446-452, 2018

KONG, L.; BHOSALE, R.; ZIEGLER, G. R. Encapsulation and stabilization of β-carotene by amylose inclusion complexes. **Food Research International**, v. 105, p. 446-452, 2018.

KOOMBHONGSE, S.; LIU, W.; RENEKER, D. H. Flat polymer ribbons and other shapes by electrospinning. **Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics**, v. 39, p. 2598-2606, 2001.

KOSARAJU, S. L.; LABBETT, D.; EMIN, M.; KONCZAK, I.; LUNDIN, L. Delivering polyphenols for healthy ageing. **Nutrition & Dietetics**, v.65, p. S48-S52, 2008.

LEIDY, R.; XIMENA, Q. C. M. Use of electrospinning technique to produce nanofibres for food industries: A perspective from regulations to characterisations. **Trends in Food Science & Technology**, v. 85, p.92-106, 2019.

LI, K. K.; YIN, S. W.; YIN, Y. C.; TANG, C. H.; YANG, X. Q.; WEN, S. H. Preparation of water-soluble antimicrobial zein nanoparticles by a modified antisolvent approach and their characterization. **Journal of Food Engineering**, v.119, p. 343-352, 2013.

LI, L.; HASHAIKEH, R.; ARAFAT, H. A. Development of eco-efficient micro-porous membranes via electrospinning and annealing of poly (lactic acid). **Journal of Membrane Science**, v.436, p. 57-67, 2013.

LI, X.; CHENG, Y.; YI, C.; HUA, Y.; YANG, C.; CUI, S. Effect of ionic strength on the heat-induced soy protein aggregation and the phase separation of soy protein aggregate/dextran mixtures. **Food Hydrocolloids**, v. *23*, p.1015-1023, 2009.

LI, Y.; BAO, T.; CHEN, W. Comparison of the protective effect of black and white mulberry against ethyl carbamate-induced cytotoxicity and oxidative damage. **Food Chemistry**, v. 243, p. 65–73, 2018.

LI, Z.; WANG, C. Effects of working parameters on electrospinning. **One-dimensional nanostructures**, p.15-28, 2013.

LIU, P.; XU, H.; ZHAO, Y.; YANG, Y. Rheological properties of soy protein isolate solution for fibers and films. **Food Hydrocolloids**, v. 64, p. 149-156, 2017.

LODHA, P.; NETRAVALI, A. N. Characterization of Phytagel® modified soy protein isolate resin and unidirectional flax yarn reinforced “green” composites. **Polymer Composites**, v. 26, 647-659, 2005.

LÓPEZ-CÓRDOBA, A.; DELADINO, L.; MARTINO, M. Corn starch-calcium alginate matrices for the simultaneous carrying of zinc and yerba mate antioxidants. **LWT-Food Science and Technology**, v. 59, p. 641-648, 2014.

LÓPEZ-RUBIO, A.; LAGARON, J. M. Whey protein capsules obtained through electrospraying for the encapsulation of bioactives. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 13, p. 200-206, 2012.

LÓPEZ-RUBIO, A.; LAGARÓN, J.M.; GIMÉNEZ, E.; CAVA, D.; HERNANDEZ-MUÑOZ, P. YAMAMOTO, T.; GAVARA, R. Morphological alterations induced by temperature and humidity in ethylene-vinyl alcohol copolymers. **Macromolecules**, v. 36, p. 9467-9476, 2003.

MARQUES, V.; FARAH, A. Chlorogenic acids and related compounds in medicinal 533 plants and infusions. **Food Chemistry**, v. 113, p.1370-1376, 2009.

MARTÍN, A.; MATTEA, F.; GUTIÉRREZ, L.; MIGUEL, F.; COCERO, M. J. Co-precipitation of carotenoids and bio-polymers with the supercritical anti-solvent process. **The Journal of Supercritical Fluids**, v.41, p.138, 2007.

MARTINS, N.; RORIZ, C. L.; MORALES, P.; BARROS, L.; FERREIRA, I. C. F. R. Food colorants: Challenges, opportunities and current desires of agroindustries to ensure consumer expectations and regulatory practices. **Trends in Food Science & Technology**, v.52, p. 1-15, 2016.

MASCHERONI, E.; FUENMAYOR, C. A.; COSIO, M. S.; DI SILVESTRO, G.; PIERGIOVANNI, L.; MANNINO, S. Encapsulation of volatiles in nanofibrous polysaccharide membranes for humidity-triggered release. **Carbohydrate Polymers**, v. 98, p. 17–25, 2013.

MATIOLI, G.; RODRIGUEZ- MAIA, D.B. Microencapsulação do Licopeno com Ciclodextrinas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos, v.** 23, p.102-105, 2003.

MCCLEMENTS, D. J.; DECKER, E. A.; WEISS, J. Emulsion-based delivery systems for lipophilic bioactive components. **Journal of Food Science**, v.72, p. 109-124, 2007.

MCCLEMENTS, D. J.; LI, Y. Structured emulsion-based delivery systems: Controlling the digestion and release of lipophilic food components. **Advances in Colloid and Interface Science**, v.159, p. 213-228, 2010.

MENDES, A. C.; STEPHANSEN, K.; CHRONAKIS, I. S. Electrospinning of food proteins and polysaccharides. **Food Hydrocolloids**, v. 68, p. 53-68, 2017

MERCANTE, L. A.; SCAGION, V. P.; MIGLIORINI, F. L.; MATTOSO, L. H.; CORREA, D. S. Electrospinning-based (bio) sensors for food and agricultural applications: A review. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 91, p. 91-103, 2017.

MESQUITA, S. S.; TEIXEIRA, C. M. L. L.; SERVULO, E. F. C. Carotenoides: Propriedades, Aplicações e Mercado, **Revista Virtual de Química**, v. 9, 2017.

MOLINA, Camila Velludo. Beta-caroteno encapsulado em micropartículas lipídicas sólidas: avaliação tecnológica e sensorial da incorporação em iogurte. 2014. **Tese de Doutorado.** Universidade de São Paulo.

MOURE, A.; CRUZ, J. M.; FRANCO, D.; DOMÍNGUEZ, J. M.; SINEIRO, J.; DOMÍNGUEZ, H.; JOSÉ NÚÑEZ, M.; PARAJÓ, J. C. Natural antioxidants from residual sources. **Food Chemistry**, v. 72, p.145-171, 2001.

MUNIN, A.; EDWARDS-LÉVY, F. Encapsulation of Natural Polyphenolic Compounds; a Review. **Pharmaceutics**, v. 3, p. 793-829, 2011.

NEO, Y. P., RAY, S., EASTEAL, A. J., NIKOLAIDIS, M. G., & QUEK, S. Y. Influence of solution and processing parameters towards the fabrication of electrospun zein fibers with sub-micron diameter. **Journal of Food Engineering**, v. 109, p. 645-651, 2012.

NEO, Y.P.; SWIFT, S.; RAY, S.; GIZDAVIC-NIKOLAIDIS, M.; JIN, J.; PERERA, C.O. Evaluation of gallic acid loaded zein sub-micron electrospun fibre mats as novel active packaging materials. **Food Chemistry** v.141, p.3192–3200, 2013.

OLIVEIRA, Luís Manuel Barroso. Automatização e controlo de um sistema de electrospinning. 2011. Tese de Doutorado.

OSGANIAN S. K.; STAMPFER, M. J.; RIMM, E.; SPIEGELMAN, D.; MANSON, J. E.; WILLETT, W.C. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v.77, p.1390-1399, 2003.

PAL, J.; WU, D.; HAKKARAINEN, M.; SRIVASTAVA, R. K. The viscoelastic interaction between dispersed and continuous phase of PCL/HA-PVA oil-in-water emulsion uncovers the theoretical and experimental basis for fiber formation during emulsion electrospinning. **European Polymer Journal**, v. 96, p. 44-54, 2017.

PALIWAL, R.; PALAKURTHI, S. Zein in controlled drug delivery and tissue engineering. **The American Journal of Clinical Nutrition,** v.189, p. 108–22, 2014.

PARRIS, N.; DICKEY, L.C.; TOMASULA, P. M.; COFFIN, D.R.; VERGANO, P.J. Films and coatings from commodity agro-proteins. **Symposium Series**, v.786, p.118-131, 2001.

PÉREZ-MASIÁ, R.; LAGARON, J. M.; LOPEZ-RUBIO, A. Morphology and stability of edible lycopene-containing micro-and nanocapsules produced through electrospraying and spray drying. **Food and Bioprocess Technology,** v. 8, p. 459-470, 2015.

PÉREZ-MASIÁ, R.; LAGARON, J. M.; LÓPEZ-RUBIO, A. Development and optimization of novel encapsulation structures of interest in functional foods through electrospraying. **Food and Bioprocess Technology**, v.7, p. 3236-3245, 2014a.

PÉREZ-MASIÁ, R.; LAGARON, J. M.; LÓPEZ-RUBIO, A. Surfactant-aided electrospraying of low molecular weight carbohydrate polymers from aqueous solutions. **Carbohydrate Polymers**, v. 101, p. 249-255, 2014b.

RAMAKRISHNA, S.; FUJIHARA, K.; TEO, W. E.; YONG, T.; MA, Z.; RAMASESHAN, R. Electrospun nanofibers: solving global issues. **Materials Today,** v. 9, p. 40-50, 2006

RAO, A. V.; RAO, L. G. Carotenoids and human health. **Pharmacological Research**, v. 55, p. 207-216, 2007.

REZAEE, O.; CHENARI, H. M.; GHODSI, F. E.; ZIYADI, H. Preparation of PVA nanofibers containing tungsten oxide nanoparticle by electrospinning and consideration of their structural properties and photocatalytic activity. **Journal of Alloys and Compounds**, v. 690, p. 864-872, 2017.

RIACHI, L. G.; DE MARIA, C. A. B. Yerba Mate: An Overview of Physiological Effects in Humans. **Journal of Functional Foods**, v. 38, p. 308-320, 2017.

RISPAIL, N.; MORRIS, P.; WEBB, K. J. Phenolic compounds extraction and analysis. In: **Lotus Japonicus Handbook**, p.349-354, 2005.

RUBIO-DIAZ, D. E.; FRANCIS, D. M.; RODRIGUEZ-SAONA, L. E. External calibration models for the measurement of tomato carotenoids by infrared spectroscopy. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 24, p. 121-126, 2011.

SCALBERT, A.; MANACH, C.; MORAND, C.; RÉMÉSY, C.; JIMÉNEZ L. Dietary polyphenols and the prevention of diseases. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition,** v.45, p. 287-306, 2005.

SCHINELLA, G. R.; TROIANI, G.; DAVILA, V.; DE BUSCHIAZZO, P. M.; TOURNIER, H. A. Antioxidant effects of an aqueous extract of Ilex paraguariensis. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 269, p. 357–360, 2000.

SELL, S. A.; WOLFE, P. S.; GARG, K.; MCCOOL, J. M.; RODRIGUEZ, I. A.; BOWLIN, G. L. The use of natural polymers in tissue engineering: a focus on electrospun extracellular matrix analogues. **Polymers**, v. 2, 522-553, 2010.

SHI, C.; XI, S.; HAN, Y.; ZHANG, H.; LIU, J.; LI, Y. Structure, rheology and electrospinning of zein and poly (ethylene oxide) in aqueous ethanol solutions. **Chinese Chemical Letters**, v. 30, p. 305-310, 2019.

SHISHIR, M. R. I.; XIE, L.; SUN, C.; ZHENG, X.; CHEN, W. Advances in micro and nano-encapsulation of bioactive compounds using biopolymer and lipid-based transporters. **Trends in Food Science & Technology**, v. 78, p. 34- 60, 2018.

SHUKLA, R.; CHERYAN, M. Zein: the industrial protein from corn. **Industrial Crops and Products,** v. 13, p. 171-192, 2001.

SILVA, F. T., CUNHA, K. F., FONSECA, L. M., ANTUNES, M. D., EL HALAL, S. L. M., FIORENTIN, Â. M., ZAVAREZE, E. R.; DIAS, A. R. G. Action of ginger essential oil (*Zingiber officinale*) encapsulated in proteins ultrafine fibers on the antimicrobial control in situ. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.118, p. 107-115, 2018.

SILVEIRA, T. F. F.; MEINHART, A. D.; BALLUS, C. A.; GODOY, H. T. The effect of the duration of infusion, temperature, and water volume on the rutin content in the preparation of mate tea beverages: an optimization study. **Food Research International**, v. 60, p. 241-245, 2014.

SOARES, R. M.; SIQUEIRA, N. M.; PRABHAKARAM, M. P.; RAMAKRISHNA, S. Electrospinning and electrospray of bio-based and natural polymers for biomaterials development. **Materials Science and Engineering: C**, v. 92, p. 969-982, 2018.

SOUSA, I. M.; MITCHELL, J. R.; LEDWARD, D. A.; HILL, S. E.; DA COSTA, M. L. B. (Differential scanning calorimetry of lupin and soy proteins. **Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung**, v. 201, p.566-569, 1995.

SURH, J.; DECKER, E. A.; MCCLEMENTS, D. J. Influence of pH and pectin type on properties and stability of sodium-caseinate stabilized oil-in-water emulsions. **Food Hydrocolloids**, v. 20, p. 607-618, 2006.

SWAIN, T.; HILLIS, W.E. The phenolic constituents of Prunus domestica. I.-The quantitative analysis of phenolic constituents. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.10, p, 63–68, 1959.

TAMPAU, A.; GONZÁLEZ-MARTÍNEZ, C.; CHIRALT, A. Release kinetics and antimicrobial properties of carvacrol encapsulated in electrospun poly-(ε-caprolactone) nanofibres. Application in starch multilayer films. **Food Hydrocolloids**, v. 79, p. 158-169, 2018.

TAVASSOLI-KAFRANI, E.; GOLI, S. A. H.; FATHI, M. Encapsulation of orange essential oil using cross-linked electrospun gelatin nanofibers. **Food and Bioprocess Technology**, v. 11, p. 427-437, 2018.

TIWARI, S. K.; VENKATRAMAN, S. S. Importance of viscosity parameters in electrospinning: of monolithic and core–shell fibers. **Materials Science and Engineering: C**, v.32, p.1037-1042, 2012.

TORRES-GINER, S. Electrospun nanofibers for food packaging applications. **Multifunctional and Nanoreinforced Polymers for Food Packaging,** p. 108-125, 2011.

TORRES-GINER, S.; GIMENEZ, E.; LAGARON, J. M. Characterization of the morphology and thermal properties of zein prolamine nanostructures obtained by electrospinning. **Food Hydrocolloids**, v. 22, p. 601–614, 2008.

TORRES-GINER, S.; OCIO, M. J.; LAGARON, J. M. Novel antimicrobial ultrathin structures of zein/chitosan blends obtained by electrospinning. **Carbohydrate Polymers**, v. 77, p. 261-266, 2009.

TRUJILLO-CAYADO, L. A.; ALFARO, M. C.; GARCÍA, M. C.; MUÑOZ, J. Comparison of homogenization processes for the development of green O/W emulsions formulated with N, N-dimethyldecanamide. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v. 46, p. 54-61, 2017.

UMESHA, S. S.; MONAHAR, B.; NAIDU, K. A. Microencapsulation of α-linolenic acid-rich garden cress seed oil: Physical characteristics and oxidative stability. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 115, p. 1474-1482, 2013.

VAZ C. M.; FOSSEN, M.; TUIL, R.F. Casein and soybean protein-based thermoplastics and composites as alternative biodegradable polymers for biomedical applications. **Journal of Biomedical Materials Research A**, v.65, p. 60–70, 2003.

VELIOGLU, Y.S.; MAZZA, G.; GAO, L.; OOMAH, B.D. Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables and grain products. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, p. 4113–4117, 1998.

VIEIRA, M. A.; ROVARIS, A. A.; MARASCHIN, M.; DE SIMAS, K. N.; PAGLIOSA, C. M.; PODESTÁ, R.; AMANTE, E. R. Chemical characterization of candy made of Erva-Mate (*Ilex paraguariensis A. St. Hil*.) residue. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, p. 4637–4642, 2008.

VILELA, C.; KUREK, M.; HAYOUKA, Z.; RÖCKER, B.; YILDIRIM, S.; ANTUNES, M. D. C.; FREIRE, C. S. A concise guide to active agents for active food packaging. **Trends in Food Science & Technology**, v. 80, p. 212-222, 2018.

WANG, S.; MARCONE, M. F.; BARBUT, S.; LIM, L. T. Electrospun soy protein isolate-based fiber fortified with anthocyanin-rich red raspberry (Rubus strigosus) extracts. **Food Research International**, v. 52, p. 467-472, 2013.

WEISS, J.; KANJANAPONGKUL, K.; WONGSASULAK, S.; YOOVIDHYA, T. Electrospun fibers: fabrication, functionalities and potential food industry. **Nanotechnology in the Food, Beverage and Nutraceutical Industries**, p. 362-397, 2012.

Wen, P., Zong, M. H., Linhardt, R. J., Feng, K., & Wu, H. (2017). Electrospinning: A novel nano-encapsulation approach for bioactive compounds. **Trends in Food Science & Technology**, 70, 56-68.

WEN, P.; ZONG, M. H.; LINHARDT, R. J.; FENG, K.; WU, H. Electrospinning: A novel nano-encapsulation approach for bioactive compounds. **Trends in Food Science & Technology**, v. 70, p.56-68, 2017.

XIANQUAN, S.; SHI, J.; KAKUDA, Y.; YUEMING, J. Stability of lycopene during food processing and storage. **Journal of Medicinal Food**, v. 8, p. 413-422, 2005.

XU, X.; JIANG, L.; ZHOU, Z.; WU, X.; WANG, Y. Preparation and properties of electrospun soy protein isolate/polyethylene oxide nanofiber membranes. **Applied Materials & Interfaces**, v.4, p.4331-4337, 2012.

YANG, F.; LIU, X.; REN, X. E.; HUANG, Y.; HUANG, C.; ZHANG, K. Swirling cavitation improves the emulsifying properties of commercial soy protein isolate. **Ultrasonics Sonochemistry,** v. 42, p. 471-481, 2018.

YILDIRIM, S.; RÖCKER, B.; PETTERSEN, M. K.; NILSEN-NYGAARD, J.; AYHAN, Z.; RUTKAITE, R.; COMA, V. Active packaging applications for food. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v.17, p.165-199, 2018.

ZHANG, B.; LUO, Y.; WANG, Q. Effect of acid and base treatments on structural, rheological, and antioxidant properties of α-zein**. Food Chemistry**, v.124, p. 210-220, 2011.

ZHANG, Y.; GHASEMZADEH, S.; KOTLIAR, A. M.; KUMAR, S.; PRESNELL, S.; WILLIAMS, L. D. Fibers from soybean protein and poly (vinyl alcohol). **Journal Of Applied Polymer Science**, v. 71, p. 11-19, 1999.

ZHU, F. Encapsulation and delivery of food ingredients using starch based systems**. Food Chemistry**, v.229, p.542-552, 2017.

ZUO, W.; ZHU, M.; YANG, W.; YU, H.; CHEN, Y.; ZHANG, Y. Experimental study on relationship between jet instability and formation of beaded fibers during electrospinning. **Polymer Engineering & Science**, v.45, p. 704-709, 2005.