

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



DISSERTAÇÃO

ENCAPSULAÇÃO DE EXTRATO DE BAGAÇO DE UVA RICO EM
ANTOCIANINAS POR FIBRAS ULTRAFINAS DE ZEÍNA PRODUZIDAS
PELA TÉCNICA DE *ELECTROSPINNING*

Estefani Tavares Jansen

Engenheira Química

Pelotas, 2022.

Estefani Tavares Jansen

**Encapsulação de extrato de bagaço de uva rico em antocianinas por
fibras ultrafinas de zeína produzidas pela técnica de *electrospinning***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do Título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Comitê de orientação:

Prof^a. Dr^a. Elessandra da Rosa Zavareze – UFPel

Prof. Dr. Alvaro Renato Guerra Dias – UFPel

Dr^a. Laura Martins Fonseca – UFPel

Pelotas, 2022.

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

J35e Jansen, Estefani Tavares

Encapsulação de extrato de bagaço de uva rico em antocianinas por fibras ultrafinas de zeína produzidas pela técnica de *electrospinning* / Estefani Tavares Jansen ; Elessandra da Rosa Zavareze, orientadora ; Alvaro Renato Guerra Dias, Laura Martins Fonseca, coorientadores. — Pelotas, 2022.

124 f.

Dissertação (Mestrado) — Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, 2022.

1. Alimentos. 2. Antioxidante. 3. Compostos fenólicos. 4. Embalagem ativa. 5. Embalagem inteligente. I. Zavareze, Elessandra da Rosa, orient. II. Dias, Alvaro Renato Guerra, coorient. III. Fonseca, Laura Martins, coorient. IV. Título.

CDD : 664

Elaborada por Gabriela Machado Lopes CRB: 10/1842

Banca examinadora

Prof^a. Dr^a. Elessandra da Rosa Zavareze (Orientadora) – UFPel

Prof. Dr. Eliezer Avila Gandra - UFPel

Prof. Dr. Ricardo Peraça Toralles – IFSul

Dr^a. Marjana Radünz - UFPel

Dedicatória

Dedico esse trabalho aos meus pais, Aldesir e Tereza.

Agradecimentos

À Deus;

Aos meus pais, Aldesir Martins Jansen e Santa Tereza Tavares Jansen, pela torcida durante a seletiva de mestrado e pelo apoio incondicional para que fosse possível a realização desse trabalho, principalmente em tempos de uma pandemia mundial causada pelo Covid-19. Obrigada por entenderem todas as minhas ausências e por me consolarem nos dias de choro e tristeza durante essa trajetória. E também por comemorarem comigo os dias de felicidade, com boas coletas de fibras e análises com resultados satisfatórios.

Ao meu amor, Rafael Camacho Garcia, pelo carinho, companheirismo e apoio durante o último ano do mestrado, pela curiosidade e inúmeras tentativas de tentar entender minhas conversas sobre o meu maravilhoso mundo das nanofibras e antocianinas e por fazer os nossos 114 km de distância se tornarem menores a cada reencontro.

A minha orientadora, Prof^a. Dr^a. Elessandra da Rosa Zavareze, por ter me acolhido tão bem no Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos (PPGCTA), por não medir esforços para tornar esse momento de distanciamento social mais leve e sem perder o contato com o meio acadêmico, por todos os ensinamentos durante esses dois anos de mestrado e por toda dedicação para me auxiliar desde a idealização do projeto até a execução das atividades no laboratório.

Ao meu coorientador, Prof. Dr. Alvaro Renato Guerra Dias, por também ter me acolhido tão bem no PPGCTA, por estar preocupado com seus orientados durante a pandemia, pelas trocas de conhecimento e observações sobre o projeto e a execução desse e por todas as conversas sobre os mais diversos temas, como hortas e peixes.

A minha coorientadora, Dr^a Laura Martins Fonseca, por ter se tornado meu “manual de consultas” sobre o PPGCTA desde a primeira reunião virtual, por sempre me incentivar nos dias ruins e por todos os conselhos na vida pessoal e profissional durante o período que convivemos no mestrado.

Aos demais professores do PPGCTA, que de alguma forma contribuíram para o meu desenvolvimento e crescimento como pesquisadora.

A banca avaliadora, composta pelo Prof. Dr. Eliezer, Prof. Dr. Ricardo e pela Dr^a. Marjana, pelas contribuições e conselhos sobre o meu trabalho. Com certeza, esses novos olhares ajudaram no enriquecimento e crescimento do meu tema de pesquisa.

Aos meus colegas de laboratório, com quem dividi praticamente todos os meus dias, obrigada pelo auxílio nas análises, pelas trocas de conhecimento e pelos cafés, bolos e conversas diárias.

Um agradecimento especial ao meu colega Elder Pacheco da Cruz, que me acolheu desde meu primeiro dia no laboratório 709. Obrigada por dividir esse trajeto comigo, o que com certeza o tornou mais leve, por me ensinar a usar o *electrospinning* e fazer tantas outras análises, por encarar 12 h diárias de laboratório, principalmente aos finais de semana e feriados, pelas infinitas conversas sobre temas profissionais e pessoais, mas principalmente, obrigada pela linda e sincera amizade que temos hoje.

A Pós-doc Helen Hackbart, por todos os conselhos, por estar sempre disponível para ajudar os alunos do PPGCTA, principalmente na área de química e estatística e por tornar os dias de convívio mais “cheio de gatinhos”.

Aos meus colegas de trabalho do Instituto de Biologia – IB/UFPel, por sempre me apoiarem e incentivarem desde o início do mestrado até a sua conclusão.

A Universidade Federal de Pelotas e ao PPGCTA pela oportunidade de desenvolvimento e conclusão do mestrado e também de ampliar minha qualificação pessoal e profissional.

E a todos que de alguma forma contribuíram para realização desse trabalho e puderam tornar a caminhada mais leve, muito obrigada pelo carinho!

“Os químicos são uma estranha classe de mortais, impelidos por um impulso quase insano a procurar seus prazeres em meio a fumaça e vapor, fuligem e chamas, venenos e pobreza, e no entanto, entre todos esses males, tenho a impressão de viver tão agradavelmente que preferiria morrer a trocar de lugar com o rei da Pérsia.”

Johann Joachim Becher

RESUMO

JANSEN, Estefani Tavares. **Encapsulação de extrato de bagaço de uva rico em antocianinas por fibras ultrafinas de zeína produzidas pela técnica de *electrospinning***. Orientadora: Elessandra da Rosa Zavareze. 2022. 124 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2022.

Diversos fatores são capazes de ocasionar ou acelerar a deterioração de um alimento embalado. Assim, buscando garantir mais segurança e qualidade ao consumidor, surgiram os sistemas de embalagens ativas e inteligentes para alimentos. As antocianinas são moléculas bioativas com potencial para serem aplicadas nessas embalagens em razão de suas características, como apresentar atividades antioxidante e antimicrobiana, além de alta sensibilidade as mudanças de pH do meio, alterando sua cor. Uma importante fonte de extração de antocianinas é o bagaço de uva tinta, um subproduto da indústria vinícola. Assim, objetivou-se com esse trabalho encapsular diferentes concentrações de extrato de bagaço de uva Bordô (*Vitis Labrusca* L.) (5, 10 e 15% (m/m)) em fibras ultrafinas de zeína produzidas pela técnica de *electrospinning*. Uma solução polimérica de zeína 30% (m/v, em etanol 80%) foi utilizada para a incorporação do extrato e obtenção das fibras ultrafinas. O extrato apresentou teor de compostos fenólicos totais e antocianinas totais iguais a 5.396,97 e 865,02 mg/100 g de bagaço de uva, respectivamente. O extrato demonstrou capacidade de mudança de cor ao longo do espectro de pH na faixa de 1 a 14. As fibras ultrafinas apresentaram morfologia lisa, contínua e uniforme, com diâmetros médios que variaram entre 431 e 495 nm, eficiência de encapsulação acima de 85% e resistência térmica até, aproximadamente, 130 °C. O aumento na concentração de extrato tornou as membranas de fibras mais hidrofílicas, com valores de ângulos de contato médios com a água iguais a 30,17 e 27,50°, para fibras com 0 e 15% (m/m) de extrato, respectivamente. As fibras ultrafinas de zeína com extrato encapsulado exibiram atividade antioxidante frente aos radicais livres ABTS, DPPH, ON e OH. Além disso, as fibras ultrafinas de zeína com 15% (m/m) de extrato apresentaram maior atividade antimicrobiana frente as bactérias *E. coli* e *S. aureus*, comparadas aos demais materiais encapsulados. Esses dados indicam potencial aplicação para as fibras ultrafinas de zeína com extrato de bagaço de uva na elaboração de sistemas de embalagens ativa e inteligente destinadas a proteger os alimentos.

Palavras-chave: alimentos; antioxidante; compostos fenólicos; embalagem ativa; embalagem inteligente.

ABSTRACT

JANSEN, Estefani Tavares. **Encapsulation of anthocyanin-rich grape pomace extract in ultrafine zein fibers produced by electrospinning technique.** Orientadora: Elessandra da Rosa Zavareze. 2022. 124 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2022.

Several factors are capable of causing or accelerating the deterioration of a packaged food product. Thus, active and intelligent food packaging systems have emerged in order to ensure more safety and quality for the consumer. Anthocyanins are bioactive molecules with potential application in these packages due to their characteristics, such as antioxidant and antimicrobial activities. In addition, anthocyanins present high sensitivity to pH changes in the medium, changing its color. Red grape pomace is an important source of anthocyanins recovery being a by-product of the wine industry. Thus, the objective of this study was to encapsulate different concentrations of Bordô grape pomace extract (*Vitis Labrusca* L.) (5, 10 and 15% (w/w)) in ultrafine zein fibers produce by electrospinning. A polymeric solution of zein 30% (w/v, in 80% ethanol) was used to incorporate the extract and obtain the ultrafine fibers. The extract showed total phenolic compounds and total anthocyanins content of 5,396.97 and 865.02 mg/100 g grape pomace, respectively. The extract demonstrated ability to change its color within the pH spectrum in the range of 1 to 14. The ultrafine fibers presented smooth, continuous and uniform morphology, with average diameters that varied between 431 and 495 nm. Also, presented high encapsulation efficiency (above 85%) and thermal resistance up to approximately 130 °C. The increase in the concentration of extract made the fibers membranes more hydrophilic, with values of average contact angles with water equal to 30.17 and 27.50°, for the fibers with 0 and 15 % (w/w) of extract, respectively. The ultrafine zein fibers with encapsulated extract exhibited antioxidant activity against ABTS, DPPH, ON, and OH free radicals. In addition, ultrafine zein fibers with 15% (w/w) extract demonstrated the best antimicrobial activity against *E. coli* and *S. aureus* food grade bacteria compared to the other encapsulated materials. These results indicate potential application for ultrafine fibers based on zein and grape pomace extract in the development of active and intelligent packaging systems, designed to protect food products.

Keywords: foods; antioxidant; phenolic compounds; active packaging; intelligent packaging.

Lista de Figuras

Figura 1 - Representação esquemática dos sistemas emissores e absorvedores em embalagens ativas para alimentos.	29
Figura 2 - Representação esquemática de uma embalagem inteligente para alimentos com sensor colorimétrico de pH, capaz de indicar, através de mudança de cor de verde para amarelo, a deterioração do produto.	32
Figura 3 - Configuração estrutural base das antocianidinas.	36
Figura 4 - Mudança de cor das antocianinas de diferentes fontes botânicas frente ao espectro de pH.	38
Figura 5 - Transformações da estrutura química e respectivas cores das antocianinas frente ao espectro de pH.	39
Figura 6 - Aparato experimental de uma estação de <i>electrospinning</i>	43
Figura 7 - Bagaço de uva Bordô (<i>Vitis Labrusca</i> L.) de vinho tinto - safra 2020/2021.	48
Figura 8 - Cores das soluções de extrato de bagaço de uva, rico em antocianinas, ao longo da escala de pH (a resolução da tela ou a qualidade da impressão em papel podem influenciar na percepção de cor de cada solução).	70
Figura 9 - Espectro de absorção (faixa de comprimento de onda do visível) do extrato de bagaço de uva rico em antocianinas ao longo da escala de pH.	70
Figura 10 - Morfologia das fibras ultrafinas de zeína com (a) 0, (c) 5, (e) 10 e (g) 15 % (m/m) de extrato de bagaço de uva e distribuição de tamanho das fibras ultrafinas de zeína com (b) 0, (d) 5, (f) 10 e (h) 15% (m/m) de extrato de bagaço de uva.	76
Figura 11 – Espectros FTIR do extrato de bagaço de uva não encapsulado, do polímero zeína e das fibras ultrafinas de zeína com diferentes concentrações de extrato de bagaço de uva.	79

Figura 12 – Termogramas de DSC do extrato de bagaço de uva não encapsulado, do polímero zeína e das fibras ultrafinas de zeína com diferentes concentrações de extrato de bagaço de uva.....	84
Figura 13 - Curvas de perda de massa por TGA do extrato de bagaço de uva não encapsulado, do polímero zeína e das fibras ultrafinas de zeína com diferentes concentrações de extrato de bagaço de uva.	88
Figura 14 - Ângulo de contato com a água das membranas das fibras ultrafinas de zeína com concentrações de extrato de bagaço de uva iguais a 0 (a, b, c), 5 (d, e ,f), 10 (g, h, i) e 15 % (j, k, l) em tempos iguais a 0 (a, d, g, j), 25 (b, e, h, k) e 50 (c, f, i, l) segundos após a queda da gota de água.....	92

Lista de Tabelas

Tabela 1 – Ligantes das antocianidinas pelargonidina, cianidina, delphinidina, peonidina, petunidina e malvidina nas posições R ₁ , R ₂ e R ₃	37
Tabela 2 – Delineamento experimental para produção e caracterização das fibras ultrafinas de zeína contendo diferentes concentrações de extrato do bagaço da uva rico em antocianinas.	47
Tabela 3 - Composição das soluções poliméricas de zeína e extrato de bagaço de uva para produção de fibras ultrafinas por <i>electrospinning</i>	53
Tabela 4 - Parâmetros para a produção de fibras ultrafinas de zeína com diferentes concentrações de extrato de bagaço de uva por <i>electrospinning</i>	54
Tabela 5 - Identificação das moléculas de antocianinas presentes no extrato de bagaço de uva bordô (<i>Vitis Labrusca</i> L.) por HPLC acoplado ao MS.	67
Tabela 6 - Condutividade elétrica e viscosidade aparente das soluções poliméricas de zeína com diferentes concentrações de extrato de bagaço de uva.	73
Tabela 7 - Eficiência de encapsulação após o processo de <i>electrospinning</i> para as fibras ultrafinas de zeína com diferentes concentrações de extrato de bagaço de uva.....	77
Tabela 8 – Bandas de absorção do extrato de bagaço de uva não encapsulado, do polímero zeína e das fibras ultrafinas de zeína com diferentes concentrações de extrato de bagaço de uva.....	80
Tabela 9 - Temperaturas e entalpias, pela análise de DSC, do extrato de bagaço de uva não encapsulado, do polímero zeína e das fibras ultrafinas de zeína com diferentes concentrações de extrato de bagaço de uva.....	85
Tabela 10 - Temperaturas e perdas de massa, pela análise de TGA, do extrato de bagaço de uva liofilizado e não encapsulado, do polímero zeína e das fibras ultrafinas de zeína com diferentes concentrações de extrato de bagaço de uva.	89

Tabela 11 - Ângulo de contato médio das membranas de fibras ultrafinas de zeína com diferentes concentrações de extrato de bagaço de uva.....	93
Tabela 12 - Atividades antioxidantes do extrato de bagaço de uva não encapsulado e encapsulado em fibras ultrafinas de zeína em diferentes concentrações frente aos radicais ABTS, DPPH, ON e OH.....	95
Tabela 13 - Halos de inibição por difusão em ágar frente as bactérias <i>E. coli</i> e <i>S. aureus</i> para o extrato de bagaço de uva não encapsulado e encapsulado em fibras ultrafinas de zeína em diferentes concentrações	101
Tabela 14 – CIM e CBM frente as bactérias <i>E. coli</i> e <i>S. aureus</i> para o extrato de bagaço de uva não encapsulado e encapsulado em fibras ultrafinas de zeína em diferentes concentrações.....	103

Lista de Abreviações e Siglas

%	Porcentagem
δa	Deformação angular assimétrica
νa	Deformação axial assimétrica
δs	Deformação angular simétrica
νs	Deformação axial simétrica
>	Maior
$\geq$	Maior ou igual
μL	Microlitro
μm	Micrômetro
μS	microSiemens
ABS	Absorbância
ABTS	2,2-azino-bis(3-ethylbenzo thiazoline-6-sulfonic acid)
b	Caminho óptico da cubeta
BHI	<i>Brain heart infusion</i>
C	Carbono
CBM	Concentração bactericida mínima
CIM	Concentração inibitória mínima
cm	Centímetro
Comp. fenólicos nas fibras	Concentração de compostos fenólicos totais presentes nas fibras ultrafinas de zeína
Comp. fenólicos no extrato	Concentração de compostos fenólicos totais presentes no bagaço de uva não encapsulado

cP	Centipoise
DA	Difusão em ágar
DPPH	2,2-difenil-1-picril-hidrazil
DSC	<i>Differential scanning calorimetry</i>
E. coli	<i>Escherichia coli</i>
EE	Eficiência de encapsulação
EROS	Espécies reativas de oxigênio
FD	Fator de diluição
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
Fibras 0%	Nomenclatura das fibras ultrafinas de zeína sem adição de extrato de bagaço de uva
Fibras 5%	Nomenclatura das fibras ultrafinas de zeína com adição de 5 % (m/m) de extrato de bagaço de uva
Fibras 10%	Nomenclatura das fibras ultrafinas de zeína com adição de 10 % (m/m) de extrato de bagaço de uva
Fibras 15%	Nomenclatura das fibras ultrafinas de zeína com adição de 15 % (m/m) de extrato de bagaço de uva
FTIR	<i>Fourier transform infrared spectroscopy</i>
g	Gramma
GAE	Equivalente ao ácido gálico
GRAS	Geralmente reconhecido como seguro para alimentos
h	Hora
H	Hidrogênio
HCl	Ácido clorídrico
HPLC	<i>High performance liquid chromatography</i>

J	Joule
kV	Kilovolt
L	Litro
m/m	massa/ massa
m/v	massa/volume
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
mg	Miligrama
MH	Ágar Mueller-Hinton
Min	Minuto
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mmol	Milimol
MS	<i>Mass spectrometry</i>
ms	Milisegundo
N	Normalidade
N	Nitrogênio
nd	Não detectado
nm	Nanômetro
O	Oxigênio
°	Ângulo em graus
° C	Graus Celsius
OH	Hidroxila

ON	Óxido nítrico
PCA	<i>Plate count agar</i>
pH	Potencial hidrogeniônico
PM	Peso molecular
ppm	Parte por milhão
rpm	Rotação por minuto
s	Segundo
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
TGA	<i>Thermogravimetric analysis</i>
Tp ₀	Temperatura inicial
Tp _x	Temperatura de pico
TSB	<i>Tryptic soy broth</i>
UFC	Unidade formadora de colônia
UFPEl	Universidade Federal de Pelotas
v/v	volume/volume
ΔH_x	Entalpia
Δm_R	Massa do resíduo
Δm_T	Variação de massa total
Δm_x	Variação de massa
ΔT_x	Variação de temperatura
ϵ	Absortividade molar

Sumário

RESUMO.....	9
ABSTRACT	10
Lista de Figuras.....	11
Lista de Tabelas	13
Lista de Abreviações e Siglas	15
1. Introdução.....	22
1.1 Hipótese	25
1.2 Objetivos	25
1.2.1 Objetivo geral.....	25
1.2.2 Objetivos específicos	25
2. Revisão bibliográfica.....	27
2.1 Embalagem para alimentos.....	27
2.2 Embalagens ativas.....	28
2.3 Embalagens inteligentes	31
2.4 Compostos bioativos naturais	34
2.5 Antocianinas.....	35
2.6 Bagaço de uva	40
2.7 Encapsulação de compostos bioativos	42
2.8 Nanoencapsulação por <i>electrospinning</i>	42
2.9 Zeína.....	45
3. Materiais e métodos.....	46
3.1 Materiais.....	46
3.2 Delineamento experimental para produção e caracterização das fibras ultrafinas	46
3.3 Coleta e preparo do bagaço de uva	48
3.4 Obtenção do extrato de bagaço de uva rico em antocianinas.....	49

3.5	Caracterização do extrato de bagaço de uva.....	49
3.5.1	Compostos fenólicos totais por espectrofotometria CURVA.....	49
3.5.2	Antocianinas totais por espectrofotometria.....	50
3.5.3	Identificação de antocianinas por HPLC-MS	51
3.5.4	Perfil de cor do extrato de bagaço de uva em diferentes pH	52
3.6	Produção de fibras ultrafinas pela técnica de <i>electrospinning</i>	52
3.6.1	Preparo das soluções poliméricas	52
3.6.2	Processo de <i>electrospinning</i>	53
3.7	Caracterização das soluções poliméricas de zeína e extrato de bagaço de uva	54
3.7.1	Condutividade elétrica das soluções poliméricas	54
3.7.2	Viscosidade aparente das soluções poliméricas	54
3.8	Caracterização das fibras ultrafinas de zeína e extrato do bagaço de uva.....	55
3.8.1	Morfologia e distribuição de tamanhos das fibras ultrafinas	55
3.8.2	Eficiência de encapsulação	55
3.8.3	Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier .	56
3.8.4	Propriedades térmicas.....	56
3.8.4.1	Calorimetria Diferencial de Varredura	56
3.8.4.2	Análise de Termogravimetria	57
3.8.5	Ângulo de contato.....	57
3.8.6	Atividades antioxidante	58
3.8.6.1	Atividade de eliminação de radicais ABTS.....	58
3.8.6.2	Atividade de eliminação de radicais DPPH	59
3.8.6.3	Atividade de eliminação de radicais ON.....	59
3.8.6.4	Atividade de eliminação de radicais OH.....	60
3.8.7	Atividade antimicrobiana.....	60
3.8.7.1	Reativação dos microrganismos	61

3.8.7.2	Difusão em ágar	61
3.8.7.3	Concentração inibitória mínima.....	62
3.8.7.4	Concentração bactericida mínima.....	62
3.9	Análise estatística	63
4.	Resultados e discussão	64
4.1.	Caracterização do extrato de bagaço de uva.....	64
4.1.1.	Compostos fenólicos totais por espectrofotometria	64
4.1.2.	Antocianinas totais por espectrofotometria.....	65
4.1.3.	Identificação de antocianinas por HPLC-MS	66
4.1.4.	Perfil de cor do extrato de bagaço de uva em diferentes pH	70
4.2.	Caracterização das soluções poliméricas	72
4.2.1.	Condutividade elétrica e viscosidade aparente das soluções poliméricas de zeína e extrato de bagaço de uva.....	72
4.3.	Caracterização das fibras ultrafinas de zeína com extrato do bagaço de uva.....	75
4.3.1.	Morfologia e distribuição de tamanho das fibras ultrafinas	75
4.3.2.	Eficiência de encapsulação	77
4.3.3.	Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier .	78
4.3.4.	Propriedades térmicas.....	83
4.3.4.1	Calorimetria Diferencial de Varredura	83
4.3.4.2	Análise de Termogravimetria	87
4.3.5.	Ângulo de contato.....	91
4.3.6.	Atividade antioxidante.....	94
4.3.7.	Atividade antimicrobiana.....	100
5.	Considerações finais.....	106
6.	Referências bibliográficas.....	108

1. Introdução

Uma embalagem destinada a conter alimentos deve preservar o produto embalado durante toda sua vida útil, garantindo a segurança e qualidade do mesmo. Porém, exigindo-se cada vez mais das embalagens em relação a conservação e monitoramento dos produtos, surgem novos sistemas, denominados de embalagens ativas e embalagens inteligentes (FIROUZ; MOHI-ALDEN; OMID, 2021; LATOS-BROZIO; MASEK, 2020).

A embalagem ativa é conceituada como um sistema que interage com o alimento ou o ambiente interno da embalagem a fim de proporcionar extensão da vida útil e preservação da qualidade do produto embalado. Essa interação ocorre por meio de absorvedores ou emissores, a exemplo dos emissores de dióxido de carbono, de dióxido de enxofre e de compostos bioativos com atividades antioxidante, antimicrobiana e/ou antifúngica (FIROUZ; MOHI-ALDEN; OMID, 2021; GÓMEZ-ESTACA et al., 2014; KUAI et al., 2021).

A embalagem inteligente é o sistema destinado a monitorar em tempo real e detectar as mudanças ocorridas no alimento ou no ambiente interno ou externo da embalagem e comunicar esses atributos ao consumidor, fornecendo continuamente informações sobre a qualidade e o estado de conservação dos produtos embalados. Essa comunicação é realizada através de indicadores, como os indicadores de temperatura-tempo, de umidade, de maturação, de presença de gases, de frescor, entre outros (BHARGAVA et al., 2020; LATOS-BROZIO; MASEK, 2020; YONG; LIU, 2020).

Os indicadores de frescor, por exemplo, utilizam-se da alteração colorimétrica de alguns corantes para exibir informações sobre o frescor do alimento embalado. Diversos pigmentos sintéticos já foram utilizados para o desenvolvimento de embalagens, porém, esses compostos podem ser potencialmente tóxicos e mutagênicos. Como alternativa, pode-se utilizar corantes de origem natural, extraídos de alimentos ou de seus resíduos, os quais estão disponíveis na natureza, são atóxicos, seguros e confiáveis. Alguns desses pigmentos naturais são as betalaínas, curcuminas, alizarinas e antocianinas (BHARGAVA et al., 2020; LATOS-BROZIO; MASEK, 2020; ROY et al., 2022).

As antocianinas são compostos bioativos que possuem atividades antioxidante, antimicrobiana, anti-inflamatória e anticancerígena. Ainda, atuam como corantes naturais, sendo altamente sensíveis as alterações de pH do meio, o que provoca mudanças em sua coloração, devido a modificações na estrutura química dessas moléculas. As antocianinas pertencem ao grupo dos compostos fenólicos e podem ser extraídas de diferentes fontes, como o bagaço de uva tinta, que vem atraindo atenção nos últimos anos (PEIXOTO et al., 2018; RUBIO et al., 2020; YONG; LIU, 2020).

O bagaço de uva tinta é um resíduo da indústria vinícola, gerado em grandes quantidades após a prensagem das uvas inteiras, e constitui uma importante fonte para extração de antocianinas. A recuperação dessas biomoléculas a partir do bagaço de uva é importante na valorização de subprodutos da agroindústria, bem como contribui para minimizar o problema ambiental gerado pelo descarte de enormes volumes desse resíduo (GOULA; THYMIATIS; KADERIDES, 2016; RUBIO et al., 2020).

Como aplicação, essas antocianinas podem ser empregadas para formar uma embalagem ativa e inteligente, que proporcione extensão da vida útil do alimento e, simultaneamente, seja capaz de acompanhar a deterioração do produto embalado devido a alterações no pH do mesmo. Entretanto, em razão da sensibilidade das antocianinas a diversos fatores ambientais (como luminosidade, temperatura, oxigênio, ataques enzimáticos, entre outros) é fundamental a aplicação de tecnologias capazes de proteger essas moléculas, como a nanoencapsulação (ROSTAMABADI et al., 2020; RUBIO et al., 2020; YONG; LIU, 2020).

Um exemplo de técnica de nanoencapsulação é o *electrospinning*, um processo que produz fibras em escala nanométrica e é atraente em razão da fácil operação, flexibilidade e elevada capacidade de carregamento de compostos bioativos. Além disso, um dos fatores mais importante sobre essa técnica, é que essas fibras são produzidas em temperatura ambiente, evitando o uso de altas temperaturas. Como material de parede dessas nanoestruturas comumente são utilizados polissacarídeos e proteínas, como amido, quitosana, pectina, acetato de celulose, gelatina, colágeno, proteína de soja e zeína (ÇANGA; DUDAK, 2019; MENDES; STEPHANSEN; CHRONAKIS, 2017; ROSTAMABADI et al., 2020; SOUZA et al., 2021).

A zeína é uma proteína de origem vegetal, extraída do milho, que apresenta principalmente resíduos de aminoácidos hidrofóbicos. Esse biopolímero é geralmente reconhecido como seguro para uso com alimentos (pela *Food and Drug Administration* - FDA). Ainda, apresenta vantagens, como ser biodegradável, atóxico, biocompatível e possuir adequada capacidade para encapsular compostos bioativos pela técnica de *electrospinning* (CETINKAYA et al., 2022; GITERU; ALI; OEY, 2021; KASAAI, 2018; TAN et al., 2022).

Deste modo, fibras ultrafinas de zeína incorporadas com extrato rico em antocianinas do bagaço de uva Bordô (*Vitis Labrusca* L.), provenientes do processo de vinificação, constituem potencial sistema emissor de compostos bioativos e indicador de frescor para elaboração de uma embalagem ativa e inteligente para a indústria de alimentos.

1.1 Hipótese

O bagaço de uva de vinho tinto possui compostos bioativos, como as antocianinas, que são sensíveis a variação de pH do meio e apresentam atividade antioxidante e antimicrobiana. Assim, a produção de fibras ultrafinas de zeína, pela técnica de *electrospinning*, para encapsulação de diferentes concentrações do extrato do bagaço de uva, é capaz de preservar esses compostos. E, a estrutura nanométrica formada apresenta potencial para utilização como sistema emissor de compostos bioativos e sensor de mudança de pH em uma embalagem ativa e inteligente destinada a conter alimentos.

1.2 Objetivos

1.2.1 Objetivo geral

Produzir, pela técnica de *electrospinning*, fibras ultrafinas de zeína incorporadas com extrato rico em antocianinas do bagaço de uva Bordô (*Vitis Labrusca* L.), obtido após a produção de vinho tinto, para potencial aplicação em embalagem ativa e inteligente de alimentos.

1.2.2 Objetivos específicos

- Extrair e quantificar os compostos fenólicos totais e as antocianinas totais oriundos do bagaço de uva de vinho tinto;
- Avaliar a sensibilidade de mudança de cor das antocianinas do bagaço de uva frente a variação de pH do meio;
- Produzir fibras ultrafinas de zeína com diferentes concentrações de extrato de bagaço de uva, rico em antocianinas, pela técnica de *electrospinning*;
- Caracterizar e avaliar as diferenças entre as fibras ultrafinas de zeína produzidas com diferentes concentrações de extrato do bagaço quanto à

morfologia, distribuição de tamanho, eficiência de encapsulação, grupos funcionais, propriedades térmicas e ângulo de contato com a água;

- Avaliar as atividades antioxidante e antimicrobiana do extrato não encapsulado e das fibras ultrafinas de zeína com diferentes concentrações de extrato do bagaço de uva.

2. Revisão bibliográfica

2.1 Embalagem para alimentos

Atualmente, a urbanização e globalização do mundo, aliada ao notável crescimento da preocupação com a qualidade de vida e saúde observado na sociedade, ocasionou um aumento na demanda por alimentos seguros e de qualidade. Deste modo, o emprego de uma embalagem facilita para que os produtos cheguem até o consumidor com estas características adequadas (CHENG et al., 2022a; FEI et al., 2021; KALPANA et al., 2019).

Além disso, os alimentos embalados evitam contato com agentes químicos, físicos e biológicos durante o preparo, transporte e armazenamento e apresentam maior durabilidade, comparados aos alimentos não embalados, cujo tempo de vida útil varia conforme a composição do alimento e condições externas. Assim, a embalagem tornou-se indispensável na cadeia produtiva de gêneros alimentícios e deve cumprir algumas funções básicas, simultaneamente, como contenção, proteção, comunicação e conveniência/venda (AGGARWAL; LANGOWSKI, 2020; BHARGAVA et al., 2020; ZHENG et al., 2022).

A contenção está relacionada a conter uma quantidade desejada pelo consumidor (função que indiretamente auxilia a diminuir o desperdício). A proteção é a função de proteger o alimento frente a danos mecânicos e adulterações e ainda ser barreira contra a contaminação do ambiente externo, fatores que poderiam ocasionar e/ou acelerar a deterioração do conteúdo embalado ou a perda de compostos do próprio alimento para o meio externo (CHENG et al., 2022a; KALPANA et al., 2019; PERERA; JAISWAL; JAISWAL, 2022).

Outra função da embalagem é a comunicação com o consumidor, apresentando o produto e informações como dados nutricionais, modo de uso e armazenamento, lote e data de fabricação, prazo de validade, entre outros dados. A embalagem também é ferramenta de *marketing* e otimização de venda, capaz de identificar o produto no momento da comprar e conectar-se ao consumidor através de diferentes apelos devido a características do público

alvo, como idade, sexo, cultura e outros fatores (CHENG et al., 2022a; KALPANA et al., 2019; PERERA; JAISWAL; JAISWAL, 2022).

As características de contenção e proteção de uma embalagem também são fundamentais do ponto de vista ambiental, pois são estas que influenciam na segurança, qualidade e vida útil do produto contido na embalagem e evitam um possível desperdício do alimento antes do consumo final (AGGARWAL; LANGOWSKI, 2020).

Além dos componentes do próprio produto, a temperatura de armazenamento, a concentração de gases, como gás oxigênio, gás carbônico, gás sulfeto de hidrogênio e gás etileno, a presença de odores, de poeiras, de microrganismos deteriorantes ou patógenos (ou seus metabólitos), a umidade relativa, entre outras variáveis, influenciam no tempo de vida útil de um alimento. O conjunto desses fatores demonstra a necessidade de interação e monitoramento em tempo real das características do alimento embalado (ALIZADEH-SANI et al., 2020; KALPANA et al., 2019; PERERA; JAISWAL; JAISWAL, 2022).

Essa necessidade levou ao desenvolvimento de novas embalagens, com componentes incorporados propositalmente de modo a estender a vida útil, exibir informações sobre o alimento e garantir maior segurança e qualidade ao mesmo. Essas embalagens, com novas funções, além das quatro básicas pré-existentes, são denominadas de embalagens ativas e inteligentes, conforme sua interação com o produto, ambiente interno ou externo da embalagem ou com o consumidor (ALIZADEH SANI et al., 2022; BHARGAVA et al., 2020).

2.2 Embalagens ativas

A embalagem ativa é conceituada como a tecnologia capaz de interagir de modo intencional com o alimento ou ambiente interno da embalagem, através de sistemas absorvedores ou emissores, objetivando estender a vida útil do produto embalado (Figura 1). Assim, a embalagem ativa garante ao alimento maior segurança e qualidade, além de preservar as características

sensoriais do mesmo (FIROUZ; MOHI-ALDEN; OMID, 2021; HANANI; YEE; NOR-KHAIZURA, 2019; SHARMA et al., 2021).

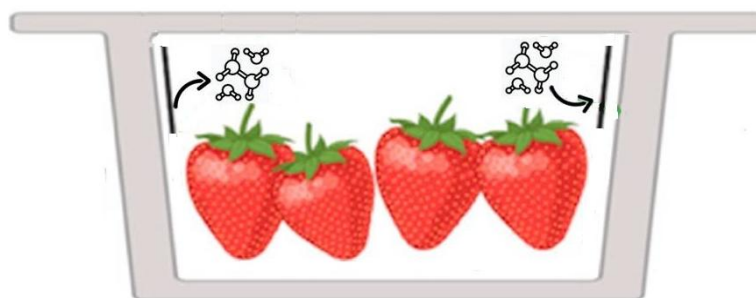


Figura 1 - Representação esquemática dos sistemas emissores e absorvedores em embalagens ativas para alimentos.

Fonte: Adaptado de Flórez et al., 2022.

Os sistemas absorvedores são utilizados nas embalagens quando deseja-se capturar alguma substância química que interfira e possivelmente tenha capacidade de reduzir a vida útil do alimento. São exemplos dessa classe os absorvedores de umidade, de etileno, de gás oxigênio, de gás carbônico, entre outros. Em sentido oposto, os sistemas emissores são empregados para liberarem substâncias ativas, as quais irão interagir dentro da embalagem a fim de retardar ou inibir a deterioração do produto. São exemplos desses sistemas, os emissores de dióxido de carbono, de dióxido de enxofre e de compostos com atividades antioxidante, antimicrobiana e/ou antifúngica (FIROUZ; MOHI-ALDEN; OMID, 2021; KUAI et al., 2021; TOPUZ; UYAR, 2020).

Os emissores de compostos antioxidantes são uma ferramenta que visa limitar a oxidação dos alimentos, uma importante causa de deterioração, que provoca a degradação de constituintes da matriz alimentícia. Por exemplo, a degradação de vitaminas e ácidos graxos essenciais, acarreta em perdas nutricionais e alteração das características sensoriais dos produtos, devido a mudanças na cor e sabor dos alimentos, além da percepção pelo consumidor do odor desagradável a ranço (HANANI; YEE; NOR-KHAIZURA, 2019; KUAI et al., 2021; UMARAW et al., 2020).

Assim, o emprego de uma embalagem ativa com emissores de agentes antioxidantes possibilita prolongar a vida útil do produto embalado e constitui uma alternativa à aplicação direta de agentes antioxidantes nos alimentos.

Técnica que, embora seja amplamente utilizada no contexto atual, apresenta limitações, como, por exemplo, a redução ou inibição da atividade antioxidante do composto adicionado devido a interações com o próprio alimento e o rápido consumo do agente antioxidante (KUAI et al., 2021).

Outro tipo de substância ativa utilizada em sistemas emissores são os compostos antimicrobianos, empregados para retardar ou inibir o crescimento de microrganismos nos alimentos. Sabe-se que esses microrganismos são responsáveis pela deterioração dos produtos e, ainda, que algumas espécies podem transmitir doenças ao consumidor. Assim, o emprego de uma embalagem ativa antimicrobiana possibilita preservar o alimento, estendendo sua vida útil e garantindo maior segurança e qualidade ao produto que será adquirido pelo consumidor (HANANI; YEE; NOR-KHAIZURA, 2019; LI et al., 2021b; SHARMA et al., 2021; TOPUZ; UYAR, 2020).

Outrossim, a adição de compostos antimicrobianos em embalagens ativas é uma alternativa que possibilita liberação lenta e gradual, mantendo uma concentração adequada de compostos que seja capaz de evitar o crescimento dos microrganismos por mais tempo. Em comparação, a adição direta de agentes antimicrobianos em alimentos apresenta as mesmas limitações supracitadas para agentes antioxidantes, como, por exemplo, a perda de parte da atividade antimicrobiana devido a interações com a matriz alimentar (FIROUZ; MOHI-ALDEN; OMID, 2021; LI et al., 2021b).

Inúmeros estudos são relatados na literatura com o objetivo de desenvolver potenciais sistemas de embalagens ativas com agentes antioxidantes e/ou antimicrobianos. Por exemplo, Li et al. (2021a) produziram uma estrutura bicamada composta por um filme de poli(ácido láctico) que foi utilizado como suporte para fibras ultrafinas de gelatina incorporadas com eugenol. Esse material demonstrou atividade antioxidante frente ao radical livre DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil) e, também, efeito antimicrobiano *in vitro*, inibindo o crescimento das bactérias Gram-positivas *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) e Gram-negativas *Escherichia coli* (*E. coli*).

Esse mesmo polímero, a gelatina, foi utilizado por Tang et al. (2019) para a produção de fibras ultrafinas e encapsulação, em conjunto, dos óleos essenciais de hortelã-pimenta e de camomila. O material nanométrico obtido por esses autores foi capaz de inibir o crescimento *in vitro* de ambas as

bactérias Gram-positivas e Gram-negativas supracitadas. Além de exibir atividade antioxidante frente ao radical livre DPPH.

No estudo de Aydogdu, Sumnu e Sahin (2019), hidroxipropilmetilcelulose e poli(óxido de etileno) foram utilizados como materiais de parede para a produção de fibras ultrafinas incorporadas com ácido gálico. Essas estruturas demonstraram capacidade de eliminar o radical DPPH. E, quando aplicadas na análise *in situ*, como parte de uma embalagem para nozes, as fibras foram capazes de reduzir a oxidação lipídica do alimento durante armazenamento por um período de vinte dias

Outro composto bioativo isolado, o carvacrol, foi utilizado por Altan, Aytac e Uyar (2018) para encapsulação em dois diferentes polímeros, a zeína e o poli(ácido láctico). Ambas as fibras ultrafinas formadas demonstraram atividade antioxidante frente ao DPPH. Além disso, os dois tipos de estruturas também foram capazes de inibir o crescimento de bactérias mesófilas aeróbicas, bolores e leveduras em amostras de pães elaborados com farinha de trigo integral e sem a adição de conservantes durante o armazenamento por sete dias.

Cita-se ainda o estudo de Li et al. (2020), no qual os pesquisadores obtiveram fibras ultrafinas de zeína e gelatina incorporadas com resveratrol. Essas estruturas demonstraram atividade antimicrobiana *in vitro*, inibindo o crescimento de *S. aureus* e *E. coli*. Ademais, ao serem avaliadas *in situ*, para a preservação de carne suína a 4 °C. As fibras com resveratrol foram capazes de reduzir a oxidação lipídica e o crescimento de microrganismos, como *Staphylococcus*, *L. monocytogenes* e *Enterobacteriaceae*, prolongando a vida útil do produto por mais três dias, conforme o padrão para consumo de carne suína na China (local onde foi realizado o estudo).

2.3 Embalagens inteligentes

A embalagem inteligente é definida como aquela capaz de monitorar, detectar e informar em tempo real os atributos do alimento embalado ou do ambiente interno ou externo da própria embalagem, a fim de comunicar ao consumidor a adequabilidade do alimento. Ainda, dependendo da tecnologia

utilizada na embalagem, é possível rastrear o histórico do produto ao longo de toda cadeia produtiva. Para fornecer tais informações, as embalagens inteligentes utilizam sistemas indicadores com sensores baseados em condições como tempo, temperatura, gases, umidade, pH, entre outros (Figura 2) (ALIZADEH-SANI et al., 2020; ALIZADEH SANI et al., 2022; KALPANA et al., 2019; ZHENG et al., 2022).

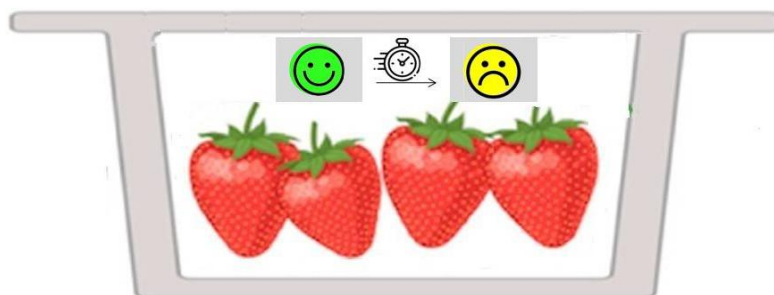


Figura 2 - Representação esquemática de uma embalagem inteligente para alimentos com sensor colorimétrico de pH, capaz de indicar, através de mudança de cor de verde para amarelo, a deterioração do produto.

Fonte: Adaptado de Flórez et al., 2022.

Os indicadores funcionam por meio de condições específicas, como a presença ou ausência de determinada substância química no meio ou a concentração dessa substância, para informar dados importantes, como temperatura de exposição fora da faixa tolerada pelo alimento, alterações na umidade relativa no interior da embalagem, crescimento de microrganismos e/ou produção de seus metabólitos, danos a integridade da embalagem, maturação e frescor dos alimentos, entre outros (BHARGAVA et al., 2020; CHENG et al., 2022a; KALPANA et al., 2019).

Os indicadores de frescor são considerados indicadores diretos da qualidade dos alimentos, pois são capazes de avaliar o grau de degradação desses produtos e reportar diretamente ao consumidor. Isso é possível porque durante a deterioração dos alimentos ocorrem reações químicas que alteram as características da matriz alimentar, por exemplo, através da modificação da concentração de certas substâncias ou pela liberação de gases para o *headspace* da embalagem. Essas alterações são detectadas pelo sensor do indicador de frescor e informadas, através de sinal visual, para o consumidor,

caracterizando em tempo real o estado de deterioração do alimento (BHARGAVA et al., 2020; SHAO et al., 2021; ZHENG et al., 2022).

O sinal visual utilizado nos indicadores de frescor pode ser desenvolvido por meio de técnicas colorimétricas com o uso de reagentes responsivos ao pH, uma tecnologia simples, de baixo custo e confiável. De forma genérica, os sensores de pH são constituídos de uma base sólida que suporta o corante sensível as mudanças de pH. No caso dos alimentos, essas alterações no pH são provocadas pelas substâncias químicas envolvidas no processo da degradação (ALIZADEH-SANI et al., 2020; CHENG et al., 2022a; KALPANA et al., 2019; ZHENG et al., 2022).

Por exemplo, a degradação de alimentos ricos em proteínas, como carnes e pescado, altera o pH do meio em função da produção de compostos voláteis de nitrogênio (amônia, trimetilamina, dimetilamina, entre outros) durante o processo de deterioração desses alimentos. No caso de frutas, vegetais, leite e seus derivados, a alteração do pH ocorre em função de modificações na concentração de ácidos orgânicos durante o período de armazenamento. Assim, os sensores de pH refletem diretamente essas alterações e, conseqüentemente, permitem indicar visualmente o frescor do alimento através de mudanças de cor do corante utilizado (BHARGAVA et al., 2020; SHAO et al., 2021; ZHENG et al., 2022).

Diversos estudos são relatados na literatura objetivando o desenvolvimento desses sensores colorimétricos de pH para potencial aplicação em embalagens inteligentes para alimentos. Cita-se, por exemplo, o trabalho de Moreira et al. (2018), no qual foi desenvolvido fibras ultrafinas de poli(ácido láctico) e poli(óxido de etileno) incorporadas com ficocianina extraída das microalgas *Spirulina*. Essas estruturas demonstraram mudança de cor perceptível ao longo da faixa de pH 1 a 10. E, segundo os autores, apresentam potencial para serem aplicadas em embalagens que visem monitorar a qualidade de sucos cítricos e carnes.

Em outro estudo, Prietto et al. (2018) utilizaram zeína como material de parede para produzir fibras ultrafinas e encapsular antocianinas extraídas de repolho roxo. As membranas de fibras foram analisadas na faixa de pH entre 1 a 10 e exibiram mudanças de cor perceptível em função da variação desse

parâmetro, indicando possível aplicação como sensor visual de mudança de pH em embalagens para alimentos.

Duan et al. (2021) reportaram a produção de fibras de pululano e quitina que foram utilizadas para encapsular, em conjunto, antocianinas e curcumina e apresentaram mudança de coloração responsiva a variação do pH do meio (entre pH 2 – 11). Além disso, ao serem avaliadas *in situ*, para monitorar a qualidade do peixe *Plectorhynchus cinctus*, durante armazenamento em temperatura ambiente por 72 h, a membrana de fibras demonstrou mudança de cor perceptível, passando de rosa, quando o alimento estava fresco, para azul, quando o mesmo se apresentou em estado de deterioração.

Embora corantes sintéticos como vermelho de metila, azul de bromotimol, verde de bromocresol, entre outros, possam ser utilizados como sensores de pH, principalmente em função de suas características, como estabilidade, intensidade de cor e baixo custo. Em função do potencial de toxicidade e mutagênese, esses compostos não são os mais adequados para aplicações em embalagens de alimentos (ALIZADEH-SANI et al., 2020; BHARGAVA et al., 2020; CHENG et al., 2022a).

Assim, uma alternativa para as embalagens inteligentes de alimentos é o emprego de compostos naturais, que apresentam baixa ou nenhuma toxicidade e também possuem a capacidade de atuarem como pigmentos responsivos ao pH. Ainda, alguns compostos são bioativos e apresentam a vantagem de atuarem, simultaneamente, também como agentes antioxidantes e antimicrobianos (ALIZADEH-SANI et al., 2020; BHARGAVA et al., 2020; CHENG et al., 2022a).

2.4 Compostos bioativos naturais

Os compostos bioativos naturais têm atraído grande atenção dentro da indústria de alimentos em razão de suas atividades biológicas e características, como serem amplamente disponíveis na natureza, biodegradáveis, renováveis, ecologicamente corretos, seguros e de baixa (ou nula) toxicidade. Ainda, esses compostos podem ser extraídos de diversas fontes vegetais, bem como de

resíduos da indústria de alimentos, contribuindo para agregar valor e diminuir a quantidade de resíduos gerada (ALIZADEH-SANI et al., 2020; BHARGAVA et al., 2020; NIU et al., 2020a).

Duas são as principais aplicações desses compostos dentro da indústria de alimentos: o emprego como ingrediente de formulações com propriedades benéficas a saúde do consumidor e o desenvolvimento de sistemas de embalagens. Nesta última, os compostos bioativos podem estar em contato direto com a superfície do alimento ou com a atmosfera ao redor do mesmo, podendo ser incorporado em diferentes partes da embalagem, como rótulos, tampas ou estruturas multicamadas (BÖHMER-MAAS et al., 2020; NIU et al., 2020a).

A incorporação de compostos bioativos naturais, que possuem a capacidade de mudar de cor frente ao espectro de pH e podem ser aplicados como indicadores colorimétricos do frescor, merece especial atenção no momento de escolha de qual composto será utilizado nas embalagens inteligentes de alimentos. Para isso, alguns requisitos devem ser atendidos pelo composto que exercerá essa função, como: forte reação entre o corante e o analito que se deseja identificar ou quantificar no alimento ou no *headspace* da embalagem, mudança visível de coloração após essa reação e resultados confiáveis e reprodutíveis (ALIZADEH-SANI et al., 2020).

Deste modo, são exemplos de compostos naturais bioativos com potencial para serem aplicados em embalagens inteligentes a curcumina e as antocianinas (SHAO et al., 2021; WU et al., 2021; ZHENG et al., 2022).

2.5 Antocianinas

As antocianinas (do grego, *anthos* = flor e *kianos* = azul) são moléculas pertencentes ao grupo dos compostos fenólicos e são os maiores e mais importantes pigmentos solúveis em água existentes na natureza, sendo responsáveis por cores como roxo, azul, vermelho e laranja. Estima-se que mais de quinhentos tipos de antocianinas já tenham sido identificadas, sendo amplamente distribuídas em flores, frutas, vegetais e cereais (ALIZADEH-SANI et al., 2020; CASTAÑEDA-OVANDO et al., 2009; CHENG et al., 2022b; YONG; LIU, 2020).

A configuração molecular básica das antocianinas é a forma aglicosilada denominada de antocianidina (Figura 3), estrutura derivada do cátion flavílio (ou 2-fenilbenzopirílio), composta por dois anéis aromáticos (representados na Figura 3 pelas letras “A” e “B”) separados por um anel heterocíclico, composto por cinco átomos de carbono e o oxigênio como heteroátomo (representado na Figura 3 pela letra “C”) (TARONE; CAZARIN; MAROSTICA JUNIOR, 2020; YONG; LIU, 2020; ZHENG et al., 2022).

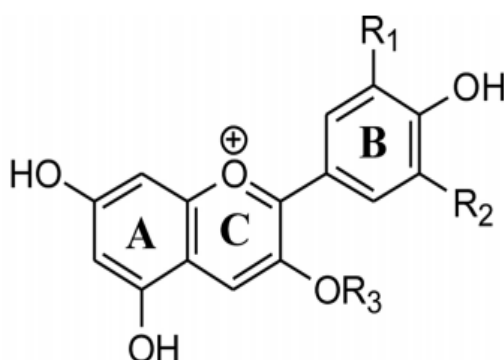


Figura 3 - Configuração estrutural base das antocianidinas.

Fonte: Yong e Liu, 2020.

Conforme são os grupos ligantes nas posições R_1 , R_2 e R_3 da molécula base de antocianidina, dá-se o nome da estrutura química completa. As seis formas estruturais mais comuns de antocianidinas são as pelargonidina, cianidina, delphinidina, peonidina, petunidina e malvidina, que estão reportadas na Tabela 1 com seus respectivos ligantes em cada posição (ALIZADEH-SANI et al., 2020; ALIZADEH SANI et al., 2022; TARONE; CAZARIN; MAROSTICA JUNIOR, 2020; YONG; LIU, 2020; ZHENG et al., 2022).

Em razão da instabilidade das antocianidinas livres, essas moléculas geralmente ocorrem na natureza em forma glicosilada ou acilada (forma estrutural denominada de antocianina). As estruturas mais comuns de antocianinas são as 3-O-glicosídeo e 3,5-diglicosídeo, sendo a glicose o monossacarídeo mais observado como substituinte. Outros açúcares, como a galactose, ramnose, arabinose, xilose, rutinose, além de di e tri-glicosídeos, também podem ser encontrados ligados a molécula base. Ainda, as antocianinas podem ser aciladas por ácidos aromáticos e alifáticos, como p-cumárico, ferúlico, caféico, gálico, malônico, acético, succínico e oxálico

(ALVAREZ-SUAREZ et al., 2021; BECERRIL; NERÍN; SILVA, 2021; YONG; LIU, 2020).

Tabela 1 – Ligantes das antocianidinas pelargonidina, cianidina, delphinidina, peonidina, petunidina e malvidina nas posições R₁, R₂ e R₃.

Antocianidina	Ligante de cada posição		
	R ₁	R ₂	R ₃
Pelargonidina	H	H	H
Cianidina	OH	H	H
Delfinidina	OH	OH	H
Peonidina	OCH ₃	H	H
Petunidina	OCH ₃	OH	H
Malvidina	OCH ₃	OCH ₃	H

Fonte: Adaptado de Yong e Liu, 2020.

As antocianinas possuem diversas funções biológicas, como atividades antioxidante, antimicrobiana, anti-inflamatória, antiproliferativa, anticancerígena e antidiabética. Ainda, apresentam alta sensibilidade as mudanças de pH do meio, demonstrando diferentes colorações em função da variação deste parâmetro e, consequentemente, diferentes picos de absorção máxima no espectro UV-visível (ALIZADEH-SANI et al., 2020; BECERRIL; NERÍN; SILVA, 2021; BHARGAVA et al., 2020; TARONE; CAZARIN; MAROSTICA JUNIOR, 2020; YONG; LIU, 2020).

Todavia, o tipo e as condições edafoclimáticas sob as quais as plantas foram cultivadas, a composição qualitativa e quantitativa das antocianinas presentes nessa fonte, a metodologia e as condições de extração, como o tipo de solvente, tempo e temperatura utilizados, entre outras variáveis, influenciam na intensidade e estabilidade da cor frente as mudanças de pH. Isto acontece devido as diferenças nas estruturas químicas dessas biomoléculas e suas consequentes interações com as moléculas do meio ao qual estão expostas

(ALIZADEH-SANI et al., 2020; ALVAREZ-SUAREZ et al., 2021; BECERRIL; NERÍN; SILVA, 2021; BHARGAVA et al., 2020; PRIETTO et al., 2017).

Assim, é possível que tons esverdeados observados em pH básico de antocianinas extraídas de repolho roxo não sejam observados quando a fonte das biomoléculas for um fruto, como a ameixa preta, que apresenta coloração em tons vermelho-rosado a roxo escuro, conforme o pH desloca-se da zona ácida para básica (Figura 4) (YONG; LIU, 2020).

Fontes	pH 2	pH 3	pH 4	pH 5	pH 6	pH 7	pH 8	pH 9	pH 10	pH 11	pH 12
Berinjela preta											
Beringela roxa											
Ameixa preta											
Farelo de arroz negro											
Lycium ruthenicum Murr.											
Amora											
Batata doce roxa											
Repolho roxo											
Rabanete											
Roselle											

Figura 4 - Mudança de cor das antocianinas de diferentes fontes botânicas frente ao espectro de pH.

Fonte: Adaptado de Yong & Liu, 2020.

As mudanças de cores das soluções de antocianinas ocorrem em razão das transformações estruturais que essas moléculas sofrem ao longo do espectro de pH e do equilíbrio químico entre as diferentes estruturas que coexistem em solução. Assim, em pH ácido, as antocianinas existem predominantemente sob a forma de cátion flavílio, de cor avermelhada. Posteriormente, com a elevação do pH até a zona de neutralidade, ocorre a formação das estruturas denominadas de pseudo-bases de carbinol, que são incolores, e das bases quinodais, as quais possuem coloração de roxo a azul. Em zona alcalina, ou seja, $\text{pH} > 8$, as antocianinas existem principalmente sob

a forma de chalconas, de coloração amarela. A Figura 5 ilustra essas transformações (CASTAÑEDA-OVANDO et al., 2009; OLIVEIRA FILHO et al., 2021; TARONE; CAZARIN; MAROSTICA JUNIOR, 2020; YONG; LIU, 2020; ZHENG et al., 2022).

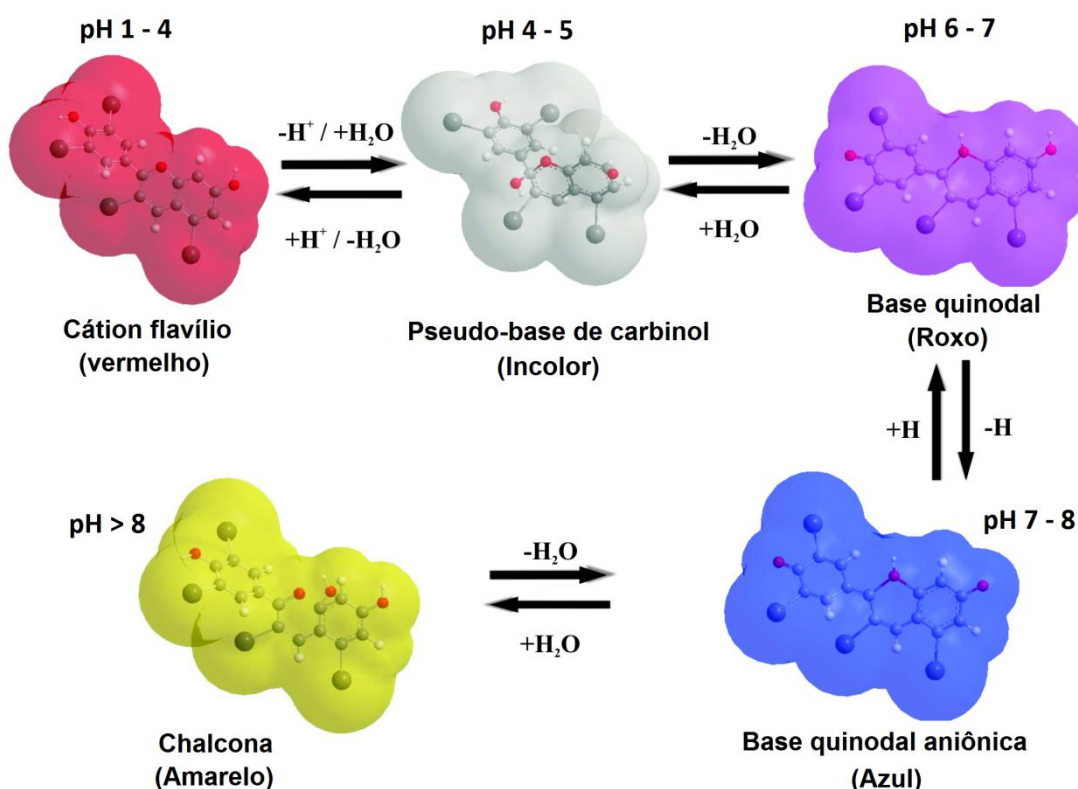


Figura 5 - Transformações da estrutura química e respectivas cores das antocianinas frente ao espectro de pH.

Fonte: Adaptado de Ananga et al., 2013.

Em razão da sensibilidade as mudanças de pH e das propriedades supracitadas, principalmente as atividades antioxidante e antimicrobiana, as antocianinas podem ser empregadas em embalagens ativas e inteligentes. Atuando, simultaneamente, de modo a estender a vida útil e monitorar a qualidade e o frescor dos alimentos, como produtos ricos em proteínas (por exemplo, peixes, frango, suínos, entre outros) (BHARGAVA et al., 2020; SHAO et al., 2021; ZHENG et al., 2022).

Em virtude das diferentes aplicações nas quais as antocianinas já são empregadas na indústria alimentícia, farmacêutica e cosmética, associado ao desenvolvimento de embalagens de alimentos com antocianinas incorporadas,

percebe-se que a demanda por essas biomoléculas está em crescimento, demonstrando a necessidade de ampliar-se os meios dos quais as mesmas são extraídas. Aliado a este fato, nota-se um crescente interesse pela valorização dos subprodutos das agroindústrias como fonte natural de compostos bioativos. Assim, pode-se, por exemplo, realizar a extração de antocianinas do bagaço de uva obtido como resíduo do processo de produção de vinho tinto (BELWAL et al., 2020; RUBIO et al., 2020).

2.6 Bagaço de uva

A uva é uma importante cultura produzida ao redor do mundo. Essa fruta é rica em macro e micronutrientes, como proteínas, lipídeos, carboidratos, vitaminas, fibras, minerais e compostos bioativos, e pode ser consumida tanto *in natura* quanto processada, por exemplo, na forma de passas, geleias, sucos e vinhos. O seu beneficiamento pelo processo de vinificação gera uma quantidade considerável de subprodutos (em torno de milhões de toneladas ao ano), em especial cascas, polpa e sementes, constituindo o resíduo denominado de bagaço de uva (MILINČIĆ et al., 2021; MONTEIRO et al., 2021; PERTUZATTI et al., 2020; PINTAĆ et al., 2018).

O bagaço de uva é um sólido biodegradável, que corresponde a cerca de 20 - 25% (m/m) em peso das uvas. É um subproduto rico em compostos bioativos, como compostos fenólicos e taninos. Enquanto que nas sementes destaca-se a presença de celulose e pectina, nas cascas (que correspondem a aproximadamente 75% do total de resíduo) observa-se concentrações mais elevadas de antocianinas, principalmente malvidina, petunidina, delphinidina, cianidina e peonidina, na forma de 3-O-glicosídeo (MILINČIĆ et al., 2021; MONTEIRO et al., 2021; PERTUZATTI et al., 2020; PEŠIĆ et al., 2019; PINTAĆ et al., 2018; SIROHI et al., 2020).

Os compostos bioativos extraídos do bagaço de uva possuem propriedades relevantes, como atividades antioxidante, antimicrobiana, anti-inflamatória, anticancerígena e antidiabética. Também são cardio e neuroprotetores e podem prevenir o envelhecimento. Essas características benéficas dos compostos bioativos têm atraído atenção e tornaram-se importantes pontos de pesquisa na última década, visto que, em torno de 60 a

65% do conteúdo fenólico da uva permanecem no bagaço após a produção de suco ou vinho tinto (PEIXOTO et al., 2018; PEŠIĆ et al., 2019; RIBEIRO et al., 2015; ROMANINI et al., 2021; SIROHI et al., 2020).

A extração de compostos bioativos do bagaço de uva é uma forma de minimizar o problema ambiental gerado a partir do descarte de um enorme volume desse resíduo no solo, que pode causar mau cheiro, atrair pragas e modificar o pH do solo. Embora, também possa ser utilizado para ração animal ou encaminhado a destilaria para obtenção de etanol, o reaproveitamento do bagaço de uva para obtenção de compostos bioativos visa atender a crescente preocupação dos consumidores com práticas agrícolas sustentáveis, que busquem diferentes formas para se reaproveitar os resíduos agroindustriais (DREVELEGKA; GOULA, 2020; MONTEIRO et al., 2021; PINTAĆ et al., 2018; RIBEIRO et al., 2015; ROCKENBACH et al., 2011; ROMANINI et al., 2021)

Após a extração, a composição química dos compostos bioativos presentes no bagaço de uva, em termos qualitativos e quantitativos, bem como o rendimento obtido após essa etapa são influenciados por numerosas variáveis. São exemplos: a cultivar de uva utilizada, o tipo e condição do solo, a localização geográfica da plantação, o modo de produção, as condições climáticas sob as quais a planta foi exposta, o estágio de maturação na época da colheita, a tecnologia de vinificação, a metodologia e o tipo de solvente de extração, entre outros (DREVELEGKA; GOULA, 2020; MILINČIĆ et al., 2021; PINTAĆ et al., 2018; RIBEIRO et al., 2015).

Os compostos bioativos obtidos a partir do bagaço de uva são sensíveis a diversos fatores ambientais (como, por exemplo, luminosidade, gás oxigênio, ataque enzimático e temperatura). Portanto, é importante a aplicação de tecnologias que mantenham a estabilidade desses compostos e preservem suas funções biológicas e sensibilidade ao pH. Um exemplo de tecnologia que pode ser utilizada com esse objetivo é a encapsulação (AHMED; FERNÁNDEZ-GONZÁLEZ; GARCÍA, 2020; ROMANINI et al., 2021; ROSTAMABADI et al., 2020; RUBIO et al., 2020)

2.7 Encapsulação de compostos bioativos

A técnica de encapsulação de compostos bioativos, resumidamente, consiste em aprisionar essas moléculas em uma matriz. Diversas são as metodologias que podem ser empregadas para executar esse aprisionamento, como secagem por pulverização, extrusão, microemulsificação, aprisionamento lipossômico, entre outras (CETINKAYA et al., 2022; GARAVAND et al., 2019, 2021; WEN et al., 2017).

Entretanto, as técnicas de nanoencapsulação eletrohidrodinâmicas têm despertado bastante interesse, em razão de suas funcionalidades exclusivas, como aumento da estabilidade dos compostos encapsulados, alta eficiência de encapsulação e ausência de emprego de altas temperaturas. Posto isso, a aplicação da tecnologia de nanoencapsulação por *electrospinning* permite proteger os compostos bioativos extraídos do bagaço de uva e preservar suas características (CETINKAYA et al., 2022; GARAVAND et al., 2019, 2021; SHISHIR et al., 2018; WEN et al., 2017).

2.8 Nanoencapsulação por *electrospinning*

O *electrospinning* ou, em português, eletrofiação, é uma técnica de encapsulação simples, versátil, controlável, reproduzível e de custo reduzido, empregada para produzir, a partir de soluções poliméricas, fibras contínuas, em escala nanométrica (COELHO; ESTEVINHO; ROCHA, 2021; ROSTAMI et al., 2019; WEN et al., 2017).

O processo de obtenção das fibras consiste primeiramente na produção de uma solução polimérica formadora de fibras, que será utilizada na estação de *electrospinning* (Figura 6). Essa é composta de uma seringa, para armazenar a solução polimérica, uma agulha metálica acoplada a seringa, para realizar a dispersão da solução, um anteparo metálico coletor de fibras e uma fonte de alta tensão, a qual é responsável por promover a diferença de potencial entre a ponta da agulha e o coletor, gerando um campo elétrico que age sobre a solução polimérica (ECHEGOYEN et al., 2017; MENDES; STEPHANSEN; CHRONAKIS, 2017; ROSTAMI et al., 2019; WEN et al., 2017).

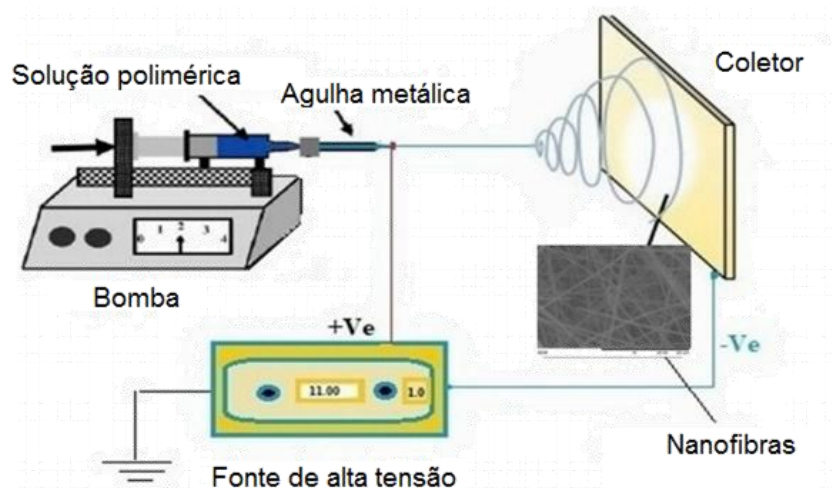


Figura 6 - Aparato experimental de uma estação de *electrospinning*.

Fonte: Adaptado de Wsoo et al., 2020.

O processo divide-se em três etapas, iniciando pela aplicação de alta voltagem no sistema, seguido do alongamento das gotículas da solução polimérica que estão na ponta da agulha (devido a formação de cone de Taylor) e ejeção do jato contínuo de polímero, culminando na coleta das fibras sólidas no coletor, devido a evaporação do solvente durante o trajeto que essas percorrem (PREMJIT et al., 2022; ROSTAMABADI et al., 2020; ROSTAMI et al., 2019; WEN et al., 2017).

A morfologia e o diâmetro das fibras eletrofiadas estão diretamente ligados aos parâmetros da solução (condutividade, viscosidade, concentração e peso molecular do polímero, emaranhamento das cadeias poliméricas, volatilidade do solvente utilizado, entre outros fatores), as variáveis ambientais (umidade, temperatura e fluxo de ar) e as variáveis do processo (taxa de fluxo de alimentação, tensão aplicada pela fonte, distância entre a ponta da agulha e o anteparo de coletor). Assim, a manipulação correta desses fatores permite produzir fibras com características otimizadas para a aplicação a qual serão destinadas e sem a presença de *beads* (pequenos defeitos nas fibras formados por aglomerados de solução polimérica) (COELHO; ESTEVINHO; ROCHA, 2021; ECHEGOYEN et al., 2017; ROSTAMABADI et al., 2020; ROSTAMI et al., 2019; WEN et al., 2017).

As fibras produzidas por *electrospinning* possuem diversas vantagens, como alta área superficial em relação ao volume, pequenos diâmetros, alta

porosidade, elevada eficiência para carregamento de compostos bioativos e propriedades mecânicas reforçadas. Além disso, uma das características mais importantes para a encapsulação de compostos bioativos por fibras produzidas por *electrospinning* é a ausência do uso de calor, visto que todo processo é executado em temperatura ambiente. Assim, esse fator é crucial para evitar a degradação e volatilização dos compostos que são termossensíveis (COELHO; ESTEVINHO; ROCHA, 2021; MENDES; STEPHANSEN; CHRONAKIS, 2017; ROSTAMI et al., 2019; WEN et al., 2017).

Diante de tais características, o processo de nanoencapsulação por *electrospinning* é adequado para encapsular compostos bioativos, tornando-os mais estáveis, visto que protege esses compostos de fatores ambientais e preserva suas funções biológicas. Ainda, essa técnica aumenta a biodisponibilidade das moléculas, tem capacidade de mascarar os odores e sabores indesejáveis (característicos de alguns compostos bioativos) e possibilita uma liberação controlada para o meio dos compostos incorporados nas fibras (ECHEGOYEN et al., 2017; NIU et al., 2020a; PREMJI et al., 2022; ROSTAMABADI et al., 2020; ROSTAMI et al., 2019).

Em relação a estrutura de parede das fibras eletrofiadas, diversos materiais podem ser utilizados para esse fim, incluindo polímeros sintéticos e naturais. Além disso, é possível a combinação de dois ou mais componentes na solução polimérica, a fim de obter-se fibras com morfologia, diâmetro e funcionalidade adequados para sua aplicação (ECHEGOYEN et al., 2017; MENDES; STEPHANSEN; CHRONAKIS, 2017; PREMJI et al., 2022; WEN et al., 2017).

Entretanto, para a área de ciência de alimentos, os biopolímeros são considerados mais adequados, por serem atóxicos e biodegradáveis. Polissacarídeos e proteínas, como quitosana, celulose, amido, proteína de soro de leite, gelatina, caseína e zeína são alguns exemplos de materiais de parede para fibras compatíveis com alimentos (MENDES; STEPHANSEN; CHRONAKIS, 2017; PREMJI et al., 2022; WEN et al., 2017).

2.9 Zeína

A zeína é uma proteína de origem vegetal, extraída do milho, que possui resíduos de aminoácidos, principalmente de caráter hidrofóbico, derivados da leucina, prolina e alanina. No entanto, é pobre em aminoácidos essenciais, tais como lisina e triptofano. Apresenta-se em quatro formas conformacionais, denominadas α (alfa), β (beta), γ (gama) e δ (delta)-zeína. Sendo a primeira de maior ocorrência na natureza (75 – 85% do total) (GHORANI; TUCKER, 2015; GITERU; ALI; OEY, 2021; GLUSAC; FISHMAN, 2021; TAN et al., 2022).

Em virtude de suas cargas superficiais, a zeína interage com outras moléculas predominantemente por ligações de hidrogênio, atrações eletrostáticas e interações de Van der Waals. Além disso, é uma proteína insolúvel em água, mas pode ser solubilizada em tensoativos aniônicos, álcalis fortes ($\text{pH} \geq 11$) e alguns solventes orgânicos misturados a água, como etanol, metanol e acetona (CETINKAYA et al., 2022; GITERU; ALI; OEY, 2021; GLUSAC; FISHMAN, 2021; TAN et al., 2022).

Ainda, a zeína é atóxica, renovável, abundante, biodegradável e biocompatível e pode ser aplicada como alternativa ao uso de polímeros sintéticos. É um biopolímero geralmente reconhecido como seguro para alimentos (GRAS pela *Food and Drug Administration* - FDA) e apresenta boas propriedades para formar fibras nanométricas por *electrospinning* e atuar como material de parede para encapsulação de diversos compostos (CETINKAYA et al., 2022; KASAAI, 2018; NIU et al., 2020b; SHISHIR et al., 2018).

Assim, as fibras eletrofiadas de zeína são capazes de preservar os compostos bioativos frente a condições ambientais adversas, atuando, por exemplo, como barreira ao oxigênio e à degradação térmica, além de garantirem uma liberação controlada desses compostos. Deste modo, podem ser utilizadas para encapsular compostos bioativos e serem aplicadas em embalagens ativas e inteligentes para alimentos (COLUSSI et al., 2021; KASAAI, 2018).

3. Materiais e métodos

3.1 Materiais

Ácido tricloroacético p.a. (CAS 76-03-9), etanol p.a. (CAS 64-17-5), nitroprussiato de sódio p.a. (CAS 13755-38-9), peróxido de hidrogênio p.a. (CAS 7722-84-1) e sulfato de ferro II p.a. (CAS 7782-63-0) foram adquiridos de Dinâmica Química Contemporânea. Padrão ácido gálico (CAS 149-91-7) e etanol grau HPLC (CAS 64-17-5) foram adquiridos da Vetec. Ácido salicílico p.a. (CAS 69-72-7) foi adquirido da Êxodo Científica. Ácido clorídrico p.a. (CAS 7647-01-0), ácido fosfórico 85% (CAS 7664-38-2), carbonato de sódio p.a. (CAS 497-19-8), cloreto de sódio p.a. (CAS 7647-14-5) e persulfato de potássio p.a. (CAS 7727-21-1) foram adquiridos da Synth. Folin-Ciocalteu foi adquirido da Próton Química. Acetonitrila grau HPLC (CAS 75-05-8) foi adquirida da J. T. Baker. Padrão cromatográfico Malvidina (CAS 643-84-5) foi adquirido da Extrasynthese. Ácido fórmico grau HPLC (CAS 64-18-6), biopolímero zeína (CAS 9010-66-6), radical livre ABTS (CAS 30931-67-0) e radical livre DPPH (CAS 1898-66-4) foram adquiridos de Sigma-Aldrich. Caldo soja tripticaseína, ágar Baird-Parker e ágar Mueller-Hinton foram adquiridos da Kasvi. Ágar Eosina Azul de Metileno foi adquirido da Acumedia. Caldo Infusão Cérebro-coração foi adquirido da Himedia. Ágar padrão para contagem foi adquirido da Lab. M Limited.

Todos os reagentes utilizados foram empregados sem qualquer purificação prévia. Água ultrapura foi preparada pelo sistema de purificação de água MegaPurity® (MecLab, Brasil).

3.2 Delineamento experimental para produção e caracterização das fibras ultrafinas

O experimento foi realizado com três tratamentos, proveniente da combinação de um tipo de material de parede e três diferentes concentrações de extrato de bagaço de uva rico em antocianinas, de acordo com o delineamento experimental inteiramente casualizado apresentado na Tabela 2.

Tabela 2 – Delineamento experimental para produção e caracterização das fibras ultrafinas de zeína contendo diferentes concentrações de extrato do bagaço da uva rico em antocianinas.

Tratamentos	Variável independente	Variáveis dependentes **
	Extrato * (% m/m)	
Controle	0	Extrato rico em antocianinas:
1	5	Fenóis totais
		Antocianinas totais
2	10	Identificação de antocianinas por
		HPLC-MS
3	15	Perfil de cor em diferentes pH
		Soluções poliméricas:
		Viscosidade
		Condutividade
		Fibras ultrafinas:
		Morfologia (MEV)
		Distribuição de tamanhos
		Eficiência de encapsulação
		Grupos funcionais (FTIR)
		Propriedades térmicas (DSC e
		TGA)
		Ângulo de contato
		Atividade antioxidante
		Atividade antimicrobiana

* Concentração de extrato de bagaço de uva em % (m/m, em zeína na solução polimérica);

** HPLC (High Performance Liquid Chromatography); MS (Mass Spectrometry); MEV (Microscopia Eletrônica de Varredura); FTIR (Fourier Transform Infrared Spectroscopy); DSC (Differential Scanning Calorimetry); TGA (Thermogravimetric analysis).

3.3 Coleta e preparo do bagaço de uva

O bagaço da uva Bordô (*Vitis labrusca* L.), gerado a partir do processo de produção do vinho tinto (safra 2020/2021), inicialmente era constituído de cascas, polpa e sementes (Figura 7). Esse material foi fornecido por uma vinícola situada no município de Morro Redondo (-31,6222 S; -52,7820 O), interior do Rio Grande do Sul (Brasil).



Figura 7 - Bagaço de uva Bordô (*Vitis Labrusca* L.) de vinho tinto - safra 2020/2021.

Durante o transporte do bagaço até o Laboratório de Biopolímeros e Nanotecnologia em Alimentos (Faculdade de Agronomia “Eliseu Maciel”/UFPeI), o material foi acondicionado em caixas térmicas com gelo e posteriormente armazenado em *ultrafreezer* a - 80 °C (Indrel Scientific, IULT – 86°, Brasil). Após a separação das sementes manualmente, o bagaço de uva (cascas e polpa) foi liofilizado (Liobras, Liotop K 108, Brasil) e transformado em um pó através da moagem em moinho analítico (Oster, OMDR-100, Estados Unidos da América), a velocidade máxima, por tempo igual a 40 s.

3.4 Obtenção do extrato de bagaço de uva rico em antocianinas

Para obtenção do extrato de bagaço de uva, o processo de extração foi realizado segundo metodologia descrita por Prietto et al. (2018), com adaptações. Um volume de 900 mL da solução extratora de etanol 75% (v/v, em água destilada) acidificada com ácido clorídrico (1% v/v) foi adicionado a 30,0 g de bagaço de uva liofilizado e moído e a mistura foi submetida a agitação mecânica constante (IKA, RW-20D Digital, Alemanha) em 230 rpm por 2 h a 25 °C e ao abrigo de luz. Após, realizou-se a centrifugação em tubos de centrifuga com rosca (Sorvall Instruments, RC5C, Estados Unidos da América) por 10 min com rotação igual a 5000 rpm.

O sobrenadante da etapa anterior foi retirado e armazenado ao abrigo da luz, enquanto 600 mL de solução de etanol acidificada foi adicionada a mesma massa de bagaço de uva, mantendo-se novamente em agitação constante por 2 h, à temperatura de 25 °C e ao abrigo da luz. Repetiu-se a etapa de centrifugação (utilizando as mesmas condições) e os sobrenadantes de cada centrifugação foram homogeneizados para a obtenção de um único extrato etanólico de bagaço de uva de vinho tinto rico em antocianinas.

Esse extrato foi submetido ao processo de concentração por rotaevaporação (Heidolph, Laborota 4000, Alemanha), em temperatura igual a 50 °C e rotação de 120 rpm por período de 20 min. Posteriormente, o extrato concentrado foi liofilizado (Liobras, Liotop K 108, Brasil) e armazenado em *freezer* (Consul, CVU20, Brasil), protegido da luz, até a sua utilização.

3.5 Caracterização do extrato de bagaço de uva

3.5.1 Compostos fenólicos totais por espectrofotometria

O teor de compostos fenólicos totais presente no extrato de bagaço de uva foi avaliado pelo método colorimétrico de Singleton e Rossi (1965), utilizando uma curva padrão de ácido gálico ($y = 3,388x - 0,069$), com resultados expressos em mg equivalente de ácido gálico por 100 g de amostra (mgGAE/100 g).

Para a determinação de compostos fenólicos totais na amostra de extrato de bagaço de uva liofilizado, 5 mg do mesmo foram diluídos em 800 µL

de etanol 80% (v/v, em água destilada). Posteriormente, em uma microplaca de 96 poços, 15 µL dessa solução foi adicionada de 240 µL de água destilada e 15 µL de solução de Folin-Ciocalteu 1 N e a mistura foi agitada por 10 s. Após 3 min de reação ao abrigo da luz, 30 µL de carbonato de sódio 1 N foram adicionados ao meio, procedendo-se nova agitação. Deixou-se em repouso por 2 h e 30 min (no escuro) e a leitura foi realizada em espectrofotômetro (Molecular Devices, SpectraMax 190, Estados Unidos da América) a 725 nm.

3.5.2 Antocianinas totais por espectrofotometria

O teor de antocianinas totais presente no extrato de bagaço de uva liofilizado foi avaliado segundo Francis (1982), conforme descrito em Prietto et al. (2018). Assim, para a determinação de antocianinas totais no extrato de bagaço de uva, 5 mg do mesmo foram diluídos em 800 µL de etanol 80% (v/v, em água destilada). Após, empregou-se o método colorimétrico de pH único, procedendo a leitura direta em espectrofotômetro (Jenway, Model 6705 Scanning UV/Visible Spectrophotometers, Estados Unidos da América) da solução obtida a partir da diluição do extrato, em comprimento de onda igual a 520 nm.

As leituras foram realizadas em triplicata e o teor de antocianinas totais foi quantificado por meio da Equação 1, com resultados expressos em mg equivalente de malvidina por 100 g de amostra (mg/100 g).

$$\text{Antocianinas totais} = \frac{\text{ABS} \cdot \text{PM} \cdot \text{FD}}{b \cdot \epsilon} \quad (1)$$

Onde *ABS* é a absorbância da amostra, *PM* é o peso molecular da antocianina majoritária (malvidina = 493,3 g.mol⁻¹), *FD* é o fator de diluição da solução, *b* é o caminho óptico da célula (1 cm) e *ε* é o coeficiente de absortividade molar da antocianina majoritária (28.000 L.(mol.cm)⁻¹ em solvente etanol acidificado com HCl a 1% (v/v) e mensurado em uma célula com caminho óptico de 1 cm).

3.5.3 Identificação de antocianinas por HPLC-MS

A análise qualitativa para identificação de antocianinas individuais foi realizada a partir do sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (do inglês, *High Performance Liquid Chromatography* - HPLC) (Shimadzu, Japão) acoplado ao espectrômetro de massas (do inglês, *Mass Spectrometry* - MS) (Bruker Daltonics, Maxis Impact, Alemanha).

Para essa análise, uma amostra de 5 mg extrato de bagaço de uva liofilizado foi dispersa em 1490 μL de etanol 80% (v/v, em água destilada). Após, adicionou-se 10 μL de ácido tricloroacético saturado, realizou-se agitação em vórtex por 1 min e procedeu-se a centrifugação (Eppendorf, Centrifuge 5430R, Alemanha) por 10 min a 20 °C e 6000 rpm.

A amostra foi então filtrada em filtro hidrofílico de nylon 22 μm e um volume igual a 10 μL dessa solução foi injetado no sistema HPLC com coluna C18 Cogent Bidentate (100 mm x 2,1 mm x 2,2 μm ID, MicroSolv Technology Corporation, Estados Unidos da América) utilizando-se como fases móveis a água ultra pura acidificada com 0,1% de ácido fórmico (fase A) e a acetonitrila acidificada com 0,1% de ácido fórmico (fase B). O gradiente de eluição foi executado como: 0-1 min, 10% B; 1-10 min, 100% B; 10-11 min, 100% B; 11-11,05 min, 10% B; 11,05-15 min, 10% B.

A identificação dos compostos foi realizada através do espectrômetro de massas de alta resolução (tipo quadrupolo-tempo de voo) (Bruker Daltonics, Maxis Impact, Alemanha) calibrado com formiato de sódio (10 mmol.L⁻¹).

O modo de ionização negativo foi operado utilizando-se os parâmetros: voltagem do capilar em 3,5 kV, fluxo do gás de secagem igual a 8,0 L.min⁻¹, temperatura igual a 180 °C, pressão do gás de nebulização (nitrogênio - N₂) em 2 bar, colisão de RF de 500 Vpp, tempo de transferência de 120 ms e armazenamento pré-pulso de 8 μS .

Para o modo positivo foram definidos como parâmetros: voltagem do capilar em 4,5 kV, fluxo do gás de secagem em 9,0 L.min⁻¹ e temperatura igual a 200 °C, pressão do gás de nebulização (N₂) em 2 bar, colisão de RF de 500 Vpp, tempo de transferência 60 ms e armazenamento pré-pulso de 5 μS .

A análise e processamento de dados foi efetuada utilizando o *software DataAnalysis* versão 4.2 (Bruker Daltonics, Alemanha).

3.5.4 Perfil de cor do extrato de bagaço de uva em diferentes pH

O espectro de cores na região do visível para o extrato de bagaço de uva, rico em antocianinas, foi avaliado após a etapa de extração descrita na seção 3.4, conforme a metodologia adaptada de Chen et al. (2020b).

Para a análise dos espectros em diferentes pH, utilizou-se 5,0 mL de extrato de bagaço de uva diluídos em 10,0 mL de água destilada. Em seguida, soluções de ácido clorídrico (concentração igual a $1,5 \text{ mol.L}^{-1}$) e de hidróxido de sódio (concentrações iguais a 0,5 e $1,5 \text{ mol.L}^{-1}$) foram utilizadas para alterar o pH do extrato nas regiões ácida e básica, respectivamente. Após ajuste do pH (Kasvi, K39-1420A, Brasil) e agitação magnética constante por 1 min ao abrigo da luz, as soluções de extrato de pH 1 a pH 14 foram avaliadas por espectrofotometria (Molecular Devices, SpectraMax 190, Estados Unidos da América) na faixa de comprimentos de onda de 390 – 810 nm para a obtenção dos espectros de cores na região do visível de cada solução.

Para cada valor de pH, as soluções de extrato de bagaço de uva foram fotografadas (Samsung, Galaxy A51, Japão) em fundo branco, mantendo-se as mesmas condições de luminosidade, ângulo e distância entre a câmera e a solução. As quatorze imagens fotográficas foram reunidas e utilizadas para montar o perfil colorimétrico do extrato.

3.6 Produção de fibras ultrafinas pela técnica de *electrospinning*

3.6.1 Preparo das soluções poliméricas

As soluções poliméricas utilizadas para incorporação do extrato de bagaço de uva foram preparadas utilizando o biopolímero zeína como material de parede das fibras ultrafinas, conforme descrito por Bruni et al. (2020), com adaptações. Uma concentração de 30% (m/v) de zeína foi diluída em solvente etanol 80% (v/v, em água destilada) e essa solução foi agitada durante 1 h em agitador magnético (Velp Scientifica, Multistirrer 6, Itália). Posteriormente, o extrato de bagaço de uva liofilizado foi adicionado à solução polimérica nas proporções descritas na Tabela 3, permanecendo a solução sob agitação e ao abrigo da luz por mais 10 min, para proporcionar homogeneização completa do extrato na solução polimérica.

Tabela 3 - Composição das soluções poliméricas de zeína e extrato de bagaço de uva para produção de fibras ultrafinas por *electrospinning*.

Tratamento	Zeína (% m/v) *	Extrato (% m/m) **	Nomenclatura das fibras
Controle	30	0	Fibras 0%
1	30	5	Fibras 5%
2	30	10	Fibras 10%
3	30	15	Fibras 15%

* Concentração de zeína expressa em % (m/v, em etanol 80% (v/v));

** Concentração de extrato expressa em % (m/m, em zeína na solução polimérica).

3.6.2 Processo de *electrospinning*

As soluções poliméricas de zeína, sem ou com extrato de bagaço de uva, foram transferidas para uma seringa plástica acoplada a uma agulha de aço inoxidável. Esse conjunto foi utilizado em uma estação horizontal de *electrospinning*, contendo uma bomba de infusão (KD Scientific, Model 100, Inglaterra), uma fonte de alta tensão com corrente contínua (Faíscas, FA+30kV, Brasil) e um coletor metálico revestido com papel alumínio. Os parâmetros adotados durante o processo de produção das fibras ultrafinas de zeína com diferentes concentrações de extrato estão dispostos na Tabela 4. Os mesmos foram obtidos a partir de testes preliminares que visaram a obtenção de fibras com morfologia lisa, uniforme, contínua e sem a presença de *beads*.

As soluções poliméricas foram submetidas ao processo de *electrospinning* em ambiente com temperatura e umidade controladas, iguais a 20 ± 2 °C e 47 ± 2 %, respectivamente, utilizando ar condicionado (Electrolux, EcoTurbo, Brasil) e desumidificador de ar (Quimis, Q831M 20, Brasil).

Tabela 4 - Parâmetros para a produção de fibras ultrafinas de zeína com diferentes concentrações de extrato de bagaço de uva por *electrospinning*.

Parâmetro	Condição
Volume da seringa	3 mL
Diâmetro da agulha	0,8 mm
Fluxo de alimentação	0,6 mL.h ⁻¹
Distância da agulha até o coletor metálico	20 cm
Tensão elétrica	20 kV

3.7 Caracterização das soluções poliméricas de zeína e extrato de bagaço de uva

3.7.1 Condutividade elétrica das soluções poliméricas

As soluções poliméricas com as diferentes concentrações de extrato de bagaço de uva foram caracterizadas quanto a condutividade elétrica, utilizando um condutivímetro (Simpla, Medidor EC150, China). Para essa análise, utilizou-se 10 mL de cada solução polimérica, com medidas realizadas em triplicata a temperatura ambiente (22 ± 1 °C).

3.7.2 Viscosidade aparente das soluções poliméricas

As soluções poliméricas com as diferentes concentrações de extrato de bagaço de uva foram caracterizadas quanto a viscosidade aparente com auxílio de um viscosímetro digital (Brookfield, DV-II, Estados Unidos da América). Para essa análise, utilizou-se o *spindle* nº 18 acoplado ao equipamento e, aproximadamente, 10 mL de cada solução polimérica, com medidas realizadas em triplicata a temperatura ambiente (22 ± 1 °C).

3.8 Caracterização das fibras ultrafinas de zeína e extrato do bagaço de uva

3.8.1 Morfologia e distribuição de tamanhos das fibras ultrafinas

A avaliação das morfologias das fibras ultrafinas produzidas com zeína e extrato de bagaço de uva foi realizada por meio de microscópio eletrônico de varredura (MEV) (Jeol, JSM - 6610LV, Japão). As amostras de fibras foram dispostas em *stubs*, metalizadas com ouro por meio de um metalizador (Sputtering, Denton Vacuum Desk V, Estados Unidos da América) e analisadas com voltagem de aceleração de 10 kV. Foram capturadas micrografias em magnitudes de ampliações de 1.000x e 6.000x. O *software ImageJ* (versão 1.53n7 – 2021) foi utilizado para avaliar o diâmetro médio e a distribuição de tamanho da cada amostra a partir de medição aleatória de 50 fibras ultrafinas.

3.8.2 Eficiência de encapsulação

A eficiência de encapsulação (EE) do extrato de bagaço de uva nas três diferentes concentrações incorporadas em fibras ultrafinas de zeína (5, 10 e 15% m/m, em zeína na solução polimérica) foi avaliada conforme descrito por Radünz et al. (2021), através do método colorimétrico de Singleton e Rossi (1965), com pequenas adaptações. Uma amostra de 5 mg de cada fibra foi adicionada de 800 µL de etanol 80% (v/v, em água destilada). Após, seguiu-se a metodologia já descrita na seção 3.5.1, para a determinação de compostos fenólicos totais, através de leitura realizada em espectrofotômetro (Molecular Devices, SpectraMax 190, Estados Unidos da América) a 725 nm.

A eficiência de encapsulação foi calculada utilizando a Equação 2 e expressa em porcentagem.

$$EE (\%) = \frac{\text{Comp. fenólicos no extrato} - \text{Comp. fenólicos nas fibras}}{\text{Comp. fenólicos no extrato}} .100 \quad (2)$$

Onde *Comp. fenólicos no extrato* é a concentração de compostos fenólicos totais presentes no bagaço de uva não encapsulado e *Comp. fenólicos nas fibras* é a concentração de compostos fenólicos totais encapsulada nas fibras

ultrafinas de zeína com extrato nas proporções 5, 10 e 15% (m/m, em zeína na solução polimérica).

3.8.3 Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier

A zeína, o extrato de bagaço de uva liofilizado e as fibras ultrafinas de zeína incorporadas com diferentes concentrações de extrato de bagaço de uva (0, 5, 10 e 15% m/m, em zeína na solução polimérica) foram analisadas em relação aos grupos funcionais com o auxílio de um espectrofotômetro com transformada de Fourier (do inglês, *Fourier Transform Infrared Spectroscopy* - FTIR) (Shimadzu, FTIR IRAffinity-1, Japão). Após a adição de uma quantidade de amostra suficiente para cobrir o cristal do equipamento, realizou-se 60 leituras na região de 400 - 4000 cm^{-1} . A análise e processamento de dados foi efetuada utilizando o *software* IR Solution versão 1.60 (Shimadzu Corporation, Japão).

3.8.4 Propriedades térmicas

3.8.4.1 Calorimetria Diferencial de Varredura

A zeína, o extrato de bagaço de uva liofilizado e as fibras ultrafinas de zeína incorporadas com diferentes concentrações de extrato de bagaço de uva (0, 5, 10 e 15% m/m, em zeína na solução polimérica) foram avaliadas utilizando o equipamento Calorímetro Diferencial de Varredura (do inglês, *Differential Scanning Calorimetry* – DSC) (TA Instruments, DSC-60, Estados Unidos da América). Aproximadamente 3 mg de cada amostra foram acondicionadas em células herméticas de alumínio seladas e aquecidas (juntamente com uma célula de referência vazia) a taxa de 10 $^{\circ}\text{C}.\text{min}^{-1}$, entre a temperatura inicial de 30 $^{\circ}\text{C}$ e temperatura final de 300 $^{\circ}\text{C}$, sob fluxo de nitrogênio de 50 $\text{mL}.\text{min}^{-1}$. Previamente, o equipamento foi calibrado de acordo com as especificações do fabricante e verificado com padrão de Índio. A análise e processamento de dados foi efetuada utilizando o *software* TA-60WS versão 2.20 (Shimadzu Corporation, Japão).

3.8.4.2 Análise de Termogravimetria

As propriedades termogravimétricas das amostras de zeína, de extrato de bagaço de uva liofilizado e das fibras ultrafinas de zeína incorporadas com diferentes concentrações de extrato de bagaço de uva (0, 5, 10 e 15% m/m, em zeína na solução polimérica) foram mensuradas utilizando-se um Analisador Termogravimétrico (do inglês, *Thermogravimetric Analysis* - TGA) (Shimadzu, TGA TA-60WS, Japão). Aproximadamente 5 mg de cada amostra foi acondicionada em uma cápsula de platina e aquecida entre as temperaturas de 30 e 600 °C, a taxa de 10 °C.min⁻¹ e fluxo de nitrogênio igual a 50 mL.min⁻¹. Uma cápsula de platina vazia foi aquecida sob as mesmas condições e utilizada como referência. A análise e processamento de dados foi efetuada utilizando o *software* TA-60WS versão 2.20 (Shimadzu Corporation, Japão).

3.8.5 Ângulo de contato

A hidrofiliicidade/hidrofobicidade das fibras ultrafinas de zeína incorporadas com diferentes concentrações de extrato de bagaço de uva (0, 5, 10 e 15% m/m, em zeína na solução polimérica) foi analisada com o auxílio de um goniômetro (Labometric, LB-DX, Estados Unidos da América) para avaliação do ângulo de contato médio de cada amostra.

As membranas de fibras de zeína, sem e com extrato de bagaço de uva encapsulado, foram coletadas sobre lâminas de vidro recobertas com papel alumínio. Posteriormente, uma gota de água destilada com volume igual a 7 µL foi colocada sobre a amostra e o tempo de absorção da gota foi contabilizado desde o tempo zero, momento de queda da gota, até 60 s de contato entre a gota e a membrana de fibras ultrafinas. Para os tempos iguais a 0, 25 e 50 s, o material foi fotografado pela câmera digital do equipamento, mantendo-se as mesmas condições de luminosidade e distância da câmera para cada amostra.

3.8.6 Atividades antioxidante

A atividade antioxidante *in vitro* do extrato de bagaço de uva não encapsulado e das fibras ultrafinas de zeína com diferentes concentrações de extrato (5, 10 e 15% (m/m, em zeína na solução polimérica)) foi avaliada por meio de quatro métodos distintos, conforme as seções 3.8.6.1 a 3.8.6.4. Sendo dois radicais livres comerciais, a saber, ABTS (2,2-azino-bis(3-ethylbenzo thiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt) e DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil), amplamente relatados na literatura e, dois radicais livres avaliados que são espécies reativas de oxigênio, o ON (óxido nítrico) e a OH (hidroxila), produzidos por organismos vivos e com potencial para causar sérios danos a esses sistemas.

3.8.6.1 Atividade de eliminação de radicais ABTS

A capacidade de eliminação dos radicais ABTS foi avaliada segundo método espectrofotométrico descrito por Fonseca et al. (2019), com algumas adaptações. Uma solução mãe composta por 5 mL da solução estoque de ABTS 7,4 mmol.L⁻¹ e 88 µL da solução de persulfato de potássio 140 mmol.L⁻¹ foi mantida ao abrigo da luz por 16 h em temperatura ambiente (20 ± 2 °C). Após, 1 mL dessa solução foi diluída em etanol 80% (v/v, em água destilada) até a absorbância da mesma atingir valor de 0,70 ± 0,05 em comprimento de onda igual a 734 nm.

Para preparar as soluções contendo as amostras, pesou-se 15 mg de extrato liofilizado não encapsulado e das fibras ultrafinas de zeína incorporadas com 0, 5, 10 e 15% (m/m, em zeína na solução polimérica) de extrato de bagaço de uva e diluiu-se cada uma dessas amostras em volume igual a 750 µL de etanol 80% (v/v, em água destilada). Uma alíquota de 20 µL de cada uma dessas soluções foi adicionada de 280 µL de solução de ABTS com absorbância corrigida. A mistura foi agitada por 30 s e deixada em repouso durante 6 min em temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Posteriormente, foi realizada a leitura em espectrofotômetro (Molecular Devices, SpectraMax 190, Estados Unidos da América) em comprimento de onda igual a 734 nm. Os resultados foram expressos em porcentagem de inibição dos radicais ABTS, conforme Equação 3.

$$\text{Inibição do radical livre (\%)} = \frac{ABS_{\text{branco}} - ABS_{\text{amostra}}}{ABS_{\text{branco}}} \cdot 100 \quad (3)$$

Onde ABS_{branco} é a absorbância do branco (etanol 80% v/v, em água destilada) e ABS_{amostra} é a absorbância de cada amostra.

3.8.6.2 Atividade de eliminação de radicais DPPH

A capacidade de eliminação dos radicais DPPH foi avaliada segundo método espectrofotométrico de Brand-Williams, Cuvelier e Berset (1995), com algumas adaptações. Assim, 15 mg das fibras ultrafinas de zeína incorporadas com 0, 5, 10 e 15% (m/m, em zeína na solução polimérica) de extrato de bagaço de uva foram diluídas em 750 μL de etanol 80% (v/v, em água destilada). Para o extrato não encapsulado, também se utilizou 15 mg do material liofilizado para diluição em 750 μL de etanol 80% (v/v, em água destilada). Uma alíquota de 25 μL de cada amostra foi adicionada de 250 μL de solução de DPPH 0,6 mmol.L^{-1} . A mistura foi agitada por 10 s e deixada em repouso durante 30 min em temperatura ambiente e, posteriormente, foi realizada a leitura em espectrofotômetro (Molecular Devices, SpectraMax 190, Estados Unidos da América) em comprimento de onda igual a 515 nm. Os resultados foram expressos em porcentagem de inibição dos radicais DPPH, de acordo com a Equação 3 (seção 3.8.6.1).

3.8.6.3 Atividade de eliminação de radicais ON

A capacidade de eliminação dos radicais de ON foi avaliada de acordo com o método espectrofotométrico descrito por Vinholes et al. (2011), com algumas modificações. Uma amostra de 15 mg de extrato liofilizado não encapsulado e das fibras ultrafinas de zeína incorporadas com 0, 5, 10 e 15% (m/m, em zeína na solução polimérica) de extrato de bagaço de uva foram diluídas em 750 μL de etanol 80% (v/v, em água destilada).

Uma alíquota de 50 μL de cada amostra foi adicionada de 50 μL de solução de nitroprussiato de sódio 20 mmol.L^{-1} . A mistura foi deixada em

repouso, em temperatura ambiente e exposta a luz direta por período de 1 h. Após, foram adicionados 50 µL de ácido fosfórico 2% e 50 µL de reagente de Griess e o meio foi mantido por 10 min em repouso e ao abrigo da luz. Posteriormente, foi realizada a leitura em espectrofotômetro (Molecular Devices, SpectraMax 190, Estados Unidos da América) em comprimento de onda igual a 562 nm. Os resultados foram expressos em porcentagem de inibição dos radicais ON, conforme Equação 3 (seção 3.8.6.1).

3.8.6.4 Atividade de eliminação de radicais OH

A capacidade de eliminação dos radicais de OH foi avaliada de acordo com o método espectrofotométrico descrito por Radünz et al. (2021). Uma amostra de 15 mg das fibras de zeína incorporadas com 0, 5, 10 e 15% (m/m, em zeína na solução polimérica) de extrato de bagaço de uva foi diluída em 750 µL de etanol 80% (v/v, em água destilada). Para o extrato não encapsulado, utilizou-se 15 mg do extrato liofilizado diluído em 750 µL de etanol 80 % (v/v, em água destilada).

Para essa análise, 25 µL de cada amostra, 110 µL de sulfato de ferro II hepta-hidratado 8 mmol.L⁻¹, 50 µL de peróxido de hidrogênio 7,18 mmol.L⁻¹ e 74,2 µL de ácido salicílico 3 mmol.L⁻¹ foram misturados, agitados por 30 s e incubados a 37 °C em um espectrofotômetro (Molecular Devices, SpectraMax 190, Estados Unidos da América) por 30 min. Após, a leitura foi realizada em comprimento de onda igual a 515 nm. Os resultados foram expressos em porcentagem de inibição dos radicais OH, conforme Equação 3 (seção 3.8.6.1).

3.8.7 Atividade antimicrobiana

A atividade antimicrobiana *in vitro* do extrato de bagaço de uva não encapsulado e das fibras ultrafinas de zeína com extrato em concentrações iguais a 0, 5, 10 e 15% (m/m, em zeína na solução polimérica) foi explorada por meio das metodologias de difusão em ágar (DA), concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) contra cepas de microrganismos relevantes para a indústria de alimentos, como a bactéria Gram-negativa *Escherichia coli* (ATCC 25922) e a bactéria Gram-positiva *Staphylococcus aureus* (ATCC 14458), conforme seções 3.8.7.1 a 3.8.7.4.

3.8.7.1 Reativação dos microrganismos

A reativação das cepas bacterianas ocorreu de modo similar para os dois microrganismos. Uma alçada de cada bactéria, *Escherichia coli* (*E. coli*) ou *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), foi transferida para tubos individuais que continham caldo Soja Trypticaseína (do inglês, *Tryptic Soy Broth* - TSB) e incubadas em estufa (DeLeo, Estufa para Cultura Bacteriológica, Brasil) a 37 °C por período de 24 h. Uma alçada de cada crescimento foi estriada em placas de Petri com meios seletivos para cada microrganismo, sendo o ágar Eosina Azul de Metileno para a *E. coli* e ágar Baird-Parker para a *S. aureus*. Ambos foram incubados em estufa (DeLeo, Estufa para Cultura Bacteriológica, Brasil) a 37 °C por período de 24 h.

Após o crescimento bacteriano, uma alçada de cada microrganismo foi ressuspensa em solução salina 0,85% (m/v, em água destilada) e padronizado por turbidimetria como 1,0 na escala de McFarland ($3,0 \times 10^8$ UFC.mL⁻¹).

3.8.7.2 Difusão em ágar

A análise de difusão em ágar (DA) foi realizada conforme metodologia descrita pelo Instituto de Padrões Clínicos e Laboratoriais (do inglês, *Clinical and Laboratory Standards Institute* - CLSI, 2015) para mensurar o halo de inibição de crescimento para ambas as bactérias. Assim, uma alçada da solução salina padronizada contendo *E. coli* ou *S. aureus* foi estriada em placas com meio de cultura ágar Mueller-Hinton (MH), nas quais foram feitos três poços de diâmetro igual a 0,4 mm. Em seguida, 15 µL de extrato de bagaço de uva não encapsulado ou 2 mg de fibras ultrafinas de zeína com extrato em diferentes concentrações foram colocados em dois poços. Água destilada estéril foi utilizada como controle, no terceiro poço.

Após incubação em estufa (DeLeo, Estufa para Cultura Bacteriológica, Brasil) a 37 °C por período de 24 h, os diâmetros dos halos de inibição observados na superfície do ágar MH foram mensurados com o auxílio de um paquímetro e os resultados expressos em milímetros.

3.8.7.3 Concentração inibitória mínima

A análise de concentração inibitória mínima (CIM) foi realizada conforme metodologia descrita por Cabral et al. (2009), com pequenas modificações. Em uma microplaca de 96 poços, adicionou-se 180 µL de caldo Infusão Cérebro-coração (do inglês, *Brain Heart Infusion* - BHI), 20 µL de solução salina padronizada com inóculo de cada bactéria e diferentes concentrações de extrato de bagaço de uva não encapsulado ou fibras ultrafinas de zeína com extrato encapsulado.

Em seguida, as placas foram lidas em um espectrofotômetro (Molecular Devices, SpectraMax 190, Estados Unidos da América) em comprimento de onda igual a 620 nm e incubadas em estufa (DeLeo, Estufa para Cultura Bacteriológica, Brasil) a 37 °C por período de 24 h. Após a incubação, as placas foram novamente avaliadas por espectrofotometria, sob as mesmas condições. Água destilada estéril foi utilizada como controle.

A CIM foi considerada como a menor concentração de extrato não encapsulado ou encapsulado em fibras ultrafinas de zeína em que não foi observado crescimento bacteriano no meio BHI (densidade óptica da amostra menor ou igual a leitura inicial, obtida a partir da comparação, em cada poço, das leituras inicial e após a incubação da placa em estufa), sendo os resultados expressos em mg.mL⁻¹.

3.8.7.4 Concentração bactericida mínima

A análise de concentração bactericida mínima (CBM) foi realizada conforme metodologia descrita por Cabral et al. (2009), com pequenas modificações. Após a análise de CIM, dos poços da microplaca que apresentaram inibição do crescimento bacteriano para *E. coli* ou *S. aureus*, foram retiradas alíquotas de 100 µL, as quais foram estriadas em placas de Petri contendo ágar Padrão para Contagem (do inglês, *Plate Count Agar* - PCA), sendo essas incubadas em estufa (DeLeo, Estufa para Cultura Bacteriológica, Brasil) a 37 °C por período de 24 h.

A CBM foi considerada como a menor concentração de extrato não encapsulado ou encapsulado em fibras ultrafinas de zeína em que não foi

observado crescimento bacteriano no meio PCA, sendo os resultados expressos em mg.mL⁻¹.

3.9 Análise estatística

A análise estatística dos dados foi realizada através da aplicação de análise de variância (ANOVA) e comparação de médias por teste de Tukey ($p < 0,05$). Ambas foram desenvolvidas através da utilização do *software Statistica* (versão 7.0).

4. Resultados e discussão

4.1. Caracterização do extrato de bagaço de uva

4.1.1. Compostos fenólicos totais por espectrofotometria

O teor de compostos fenólicos totais encontrado no bagaço de uva de vinho tinto (*Vitis labrusca* L.) foi de 5.396,97 ($\pm$ 299,29) mgGAE/100 g de bagaço liofilizado. Esses dados são semelhantes aos resultados apresentados por Rockenbach et al. (2011) para os bagaços das uvas Cabernet Sauvignon (*Vitis vinifera* L.), Merlot (*Vitis vinifera* L.) e Bordeaux (*Vitis labrusca* L.), produzidas no Brasil e extraídas com uma solução metanólica acidificada (0,1% v/v de HCl) (teor de compostos fenólicos totais entre 4.623 a 7.475 mgGAE/100 g de bagaço).

Outros pesquisadores, porém, mencionaram resultados inferiores. Ribeiro et al. (2015) avaliaram bagaço das uvas Cabernet Sauvignon, Merlot, Mix (Bordeaux - 65%, Isabel - 25% e BRS Violet -10%, *Vitis labrusca* L.) e Terci (*Vitis labrusca* L.), produzidas no Brasil e extraídas com solvente etanol (40% v/v) e relataram teor de compostos fenólicos totais entre 2.490 a 4.124 mgGAE/100 g. Milinčić et al. (2021) mencionaram teor de compostos fenólicos de aproximadamente 3.900 mgGAE/100 g após estudarem o bagaço de uva tinta Prokupac produzido na Sérvia e extraído com metanol 80% (acidificado com HCl 1%, v/v).

A discrepância observada entre os dados obtidos no presente estudo e os dados já relatados na literatura provavelmente ocorreram em razão das diferentes variedades de uva analisadas, do estágio de maturação das frutas durante a colheita e das condições edafoclimáticas sob as quais a videira foi cultivada. Ainda, são variáveis interferentes na concentração de compostos fenólicos totais, a tecnologia de vinificação aplicada para a produção do vinho tinto, a composição química desse resíduo, o tratamento dado a amostra antes da extração e o método e solvente utilizados nessa etapa (PEŠIĆ et al., 2019; PINTAĆ et al., 2018; RIBEIRO et al., 2015).

4.1.2. Antocianinas totais por espectrofotometria

O bagaço de uva tinta Bordô (*Vitis labrusca* L.) obtido após o processo de vinificação e constituído por polpa e cascas apresentou teor de antocianinas totais igual a 865,02 ($\pm$ 146,62) mg (equivalente a malvidina)/100 g de bagaço de uva liofilizado. Esse teor de antocianinas totais corrobora com os dados relatados por Rockenbach et al. (2011) para extrato metanólico dos bagaços das uvas *Vitis vinifera* L. (Cabernet Sauvignon) (702 mg equivalente a malvidina/100 g de bagaço) e *Vitis labrusca* L. (Bordeaux) (1.122 mg equivalente a malvidina/100 g de bagaço), produzidas no sul do Brasil.

Ao utilizar o mesmo solvente de extração empregado nesse trabalho, porém em concentração distinta (etanol 40% v/v, em água destilada), Ribeiro et al. (2015) avaliaram o teor de antocianinas totais de quatro diferentes bagaços de uva cultivadas no Brasil e relataram valores variando de 75,64 a 414,95 mg equivalente a cianidina/100 g bagaço seco, dados inferiores aos resultados relatados neste estudo.

Ao encontro dos resultados obtidos para compostos fenólicos totais por espectrofotometria, a discrepância entre os dados relatados na literatura e os obtidos nesse estudo para teor de antocianinas totais provavelmente ocorreram em função de diferenças relacionadas a uva e seu cultivo, ao modo de produção do vinho, ao preparo de amostra, a metodologia de extração, entre outras variáveis (conforme supracitado na discussão da seção 4.1.1).

A metodologia de extração sólido-líquido por solvente é um método tradicionalmente empregado para extração de compostos de interesse presentes nas frutas. Moléculas polares, como as antocianinas, geralmente são extraídas a partir de misturas aquosas de solventes orgânicos acidificados, como o metanol e o etanol, com concentrações entre 60 - 80% (v/v, em água destilada), sendo o metanol mais eficaz quando comparado ao etanol ou a água pura. Todavia, em razão da toxicidade do solvente metanol, quando deseja-se utilizar o extrato para aplicação na indústria de alimentos, o etanol é sugerido como solvente para a extração sólido-líquido de antocianinas (BONFIGLI et al., 2017; CASTAÑEDA-OVANDO et al., 2009; WANG et al., 2016).

Assim, além da metodologia de extração, o tipo e a concentração de solvente empregado nessa etapa influenciam no rendimento de extração e na composição qualitativa e quantitativa das moléculas de antocianinas recuperadas do bagaço de uva, acarretando nas discrepâncias observadas entre os dados obtidos e os resultados relatados na literatura.

4.1.3. Identificação de antocianinas por HPLC-MS

Entre os compostos fenólicos presentes na uva, as biomoléculas antocianinas constituem um dos grupos majoritários, estando distribuídas principalmente nas cascas das frutas (PINTAĆ et al., 2018). Assim, após a extração das antocianinas de bagaço de uva com uma solução de etanol 75% (v/v, em água destilada) acidificada, o extrato foi analisado por HPLC-MS e diferentes moléculas de antocianinas foram identificadas na amostra a partir da comparação entre as massas experimental e teórica de cada composto.

As antocianinas identificadas foram: malvidina-3,5-diglicosídeo, malvidina-3-glicosídeo, malvidina-3-O-acetilglicosídeo, malvidina-3-(6-coumariol)-glicosídeo, cianidina-3-glicosídeo, petunidina-3-O-glicosídeo, petunidina-3-(6-coumariol)-glicosídeo e delphinidina-3-O-trans-p-coumariol-glicosídeo, conforme demonstrado na Tabela 5.

Tabela 5 - Identificação das moléculas de antocianinas presentes no extrato de bagaço de uva Bordô (*Vitis Labrusca* L.) por HPLC acoplado ao MS.

Antocianina identificada	Fórmula química	Tempo de retenção (min)	Massa experimental do íon (m/z)	Massa teórica do íon (m/z)	Erro (ppm)	m _{sigma}	Massa dos fragmentos de íons (m/z)	Energia (eV)
Malvidina-3,5-diglicosídeo	C ₂₉ H ₃₅ O ₁₇	1,58/4,68	655,1866	655,1869	0,5	10,3	331.0807 (100) 332.0870 (17,1) 333.0870 (1,7) 493.1361 (1,3)	39,7
Malvidina-3-glicosídeo	C ₂₃ H ₂₅ O ₁₂	5,53	493,1336	493,1341	1,0	14,0	331.0809 (100) 332.0844 (20,7) 333.0871 (3,3) 167.0334 (1,8)	34,7
Malvidina-3-O-acetilglicosídeo	C ₂₅ H ₂₇ O ₁₃	6,10	535,1436	535,1436	1,9	11,1	331.0946(100) 332.0842 (13,3)	36.1
Malvidina-3-(6-coumariol)-glicosídeo	C ₃₂ H ₃₁ O ₁₄	6,58	639,1706	639,1708	0,4	6,3	331.0810 (100) 332.0841 (17,4) 333.0877 (2,2) 147.0440 (2,0) 181.0502 (1,7)	39,2
Cianidina-3-glicosídeo	C ₂₁ H ₂₁ O ₁₁	5,20	449,1071	449,1078	1,6	21,2	287	-

Petunidina-3-O - glicosídeo	C ₂₃ H ₂₅ O ₁₂	5,26	479,1176	479,1184	1,7	10,0	317.0651 (100) 318.0687 (18,3) 319.0692 (3,5) 302.0413 (1,4)	34,0
Petunidina-3-(6- coumariol)- glicosídeo	C ₃₁ H ₂₉ O ₁₄	6,40	625,1549	625,1552	0,5	14,5	317.0653 (100) 318.0685 (16,8) 319.0705 (2,2) 301.0700 (1,7) 147.0429 (1,6)	38,8
Delfinidina- 3-O- <i>trans-p</i> -coumariol- glicosídeo	C ₃₀ H ₂₇ O ₁₄	6,22	611,1391	611,1395	0,6	18,4	303.0498 (100) 304.0538 (18,6) 305.0555 (2,6) 147.0446 (0,9)	38,3

Peixoto et al. (2018) também reportaram a identificação de antocianinas derivadas de moléculas bases de malvidina, delfinidina e petunidina, em extrato hidrometanólico do bagaço de uva *Vitis vinifera* L. originária de Portugal, porém com diferentes glicosídeos ligados as antocianinas. Esses pesquisadores relataram ainda a presença da peonidina-rutinosídeo, que não foi identificada no presente estudo. Porém, não mencionaram a presença de derivados de cianidina.

Também utilizando metanol como solvente de extração, Kammerer et al. (2004) analisaram e identificaram por HLPC as antocianinas de bagaços de uva (*Vitis vinifera* cultivares Cabernet Mitos, Lemberger, Spätburgunder e Trollinger) provenientes da Alemanha. Esses autores encontraram derivados de antocianinas similares as identificadas para a uva Bordô (*Vitis Labrusca* L.), como a petunidina-3-O-glicosídeo e malvidina-3-O-acetilglicosídeo, além de outros derivados dessas duas antocianinas bases e de delfinidina, cianidina e peonidina.

Alguns compostos de antocianinas podem não terem sido extraídos devido a interações com outras frações do bagaço de uva, como fibras e proteínas ou em razão dos distintos solventes de extração empregados nos estudos da literatura relatados (metanol) e no presente trabalho (etanol).

Além disso, conforme supracitado na discussão da seção 4.1.2, as diferenças encontradas ao comparar o perfil antocianico (tipo de antocianinas e de moléculas de glicosídeos ligados as estruturas base de antocianinas) aqui obtido com dados da literatura possivelmente ocorreram em razão das mesmas justificativas já apresentadas, como, por exemplo, a cultivar de uva utilizada e o método de extração empregado no processamento da amostra de bagaço de uva.

A presença de compostos de interesse no bagaço de uva, como as antocianinas identificadas neste trabalho, demonstra potencial de aplicação desse resíduo da indústria vinícola como fonte de extração de compostos bioativos. Isso contribui, simultaneamente, para reduzir a quantidade de resíduos gerados nas vinícolas e para aumentar a renda dos produtores de vinhos. Além de oferecer mais uma opção de fonte de extração de biomoléculas às indústrias alimentícias, farmacêuticas e cosméticas.

4.1.4. Perfil de cor do extrato de bagaço de uva em diferentes pH

O perfil de cor do extrato de bagaço de uva rico em antocianinas foi avaliado ao longo da escala de pH de 1 a 14. Na Figura 8 estão demonstradas as imagens fotográficas das cores das soluções ao longo da escala de pH. Na Figura 9 está exibido o espectro de absorção dessas soluções nos comprimentos de onda da faixa do visível.

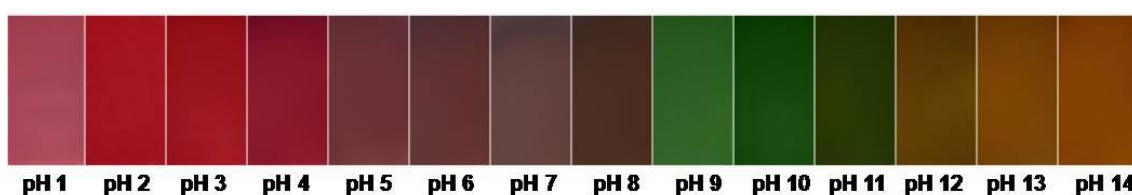


Figura 8 - Cores das soluções de extrato de bagaço de uva, rico em antocianinas, ao longo da escala de pH (a resolução da tela ou a qualidade da impressão em papel podem influenciar na percepção de cor de cada solução).

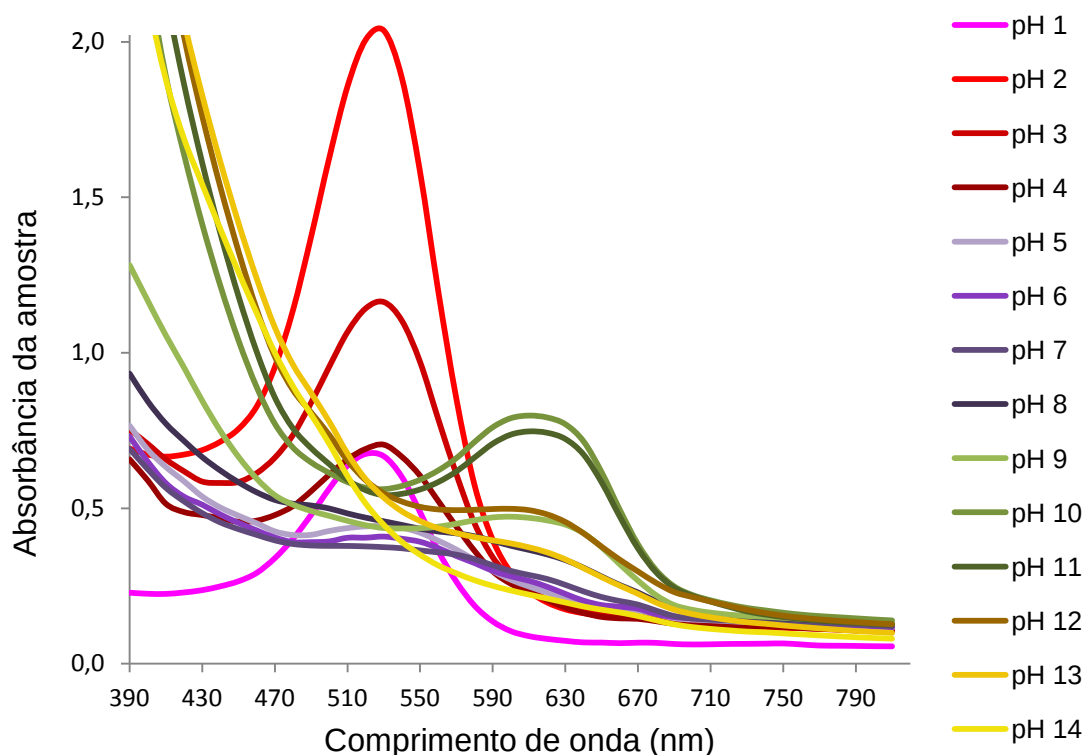


Figura 9 - Espectro de absorção (faixa de comprimento de onda do visível) do extrato de bagaço de uva rico em antocianinas ao longo da escala de pH.

Em pH extremamente ácido, ou seja, para pH igual a 1, a solução de bagaço de uva foi de cor rosa, em valores de pH de 2 a 4, a solução apresentou coloração de vermelho claro intenso a vermelho escuro. Em valores mais próximos a neutralidade, pH 5 a 7, o extrato variou de lilás claro a lilás escuro. No início da região alcalina, em pH igual a 8, a cor do extrato foi roxa escura e tornou-se verde claro em pH 9, variando o tom até verde escuro em pH 11. Em pH 12, a solução apresentou cor amarela esverdeada, tornando-se amarela em pH mais alcalino (pH 13). Finalmente, no último valor de pH da escala, pH 14, o extrato apresentou cor amarelo ouro (Figura 8).

O pico de absorção máximo das soluções com extrato rico em antocianinas também se modificou ao longo da escala de pH (Figura 9). O primeiro pico máximo de absorção foi observado em 520 nm, correspondente a solução de extrato de bagaço de uva em pH 1. Posteriormente, em pH de 2 a 7, o pico máximo de absorção foi igual a 530 nm e o mesmo diminuiu gradualmente de intensidade conforme o valor de pH aproximava-se da neutralidade (pH 7). No primeiro pH alcalino, ou seja, pH 8, o pico de absorção máxima se deslocou para 580 nm. Em pH de 9 a 10, o comprimento de onda de absorção máxima foi igual a 600 nm e o pico aumentou de intensidade em pH 10. A partir das soluções em pH de 11 até pH 14, o pico máximo deslocou-se para 610 nm e perdeu intensidade conforme o pH aumentou.

Comportamento similar para transições de cor e deslocamentos do comprimento de onda de absorção máxima para soluções de antocianinas de diferentes fontes botânicas já foram relatados na literatura, como para amora preta (ZENG et al., 2019), batata-doce roxa (CHEN et al., 2020a, 2020b), flores de *Clitoria ternatea* (KIM; ROY; RHIM, 2022), frutos de jambolão (MERZ et al., 2020) e hibisco (ZHANG et al., 2019a).

As mudanças de cor observadas nas soluções ricas em antocianinas (Figura 8) que, conseqüentemente, interferem no espectro de absorção do comprimento de onda na faixa do visível (Figura 9), ocorrem em razão das transformações na estrutura química que essas moléculas sofrem ao longo do espectro de pH e do complexo equilíbrio entre as quatro principais espécies químicas existentes, denominadas cátion flavílio, base quinodal, pseudo-base carbinol e chalcona (SINOPOLI; CALOGERO; BARTOLOTTA, 2019).

Em condições ácidas (pH 1 à 4), as antocianinas são representadas principalmente pelo cátion flavílio e apresentam cor em tons avermelhados. Com a elevação do pH até a neutralidade, ocorre a formação das pseudo-bases de carbinol (incolores) e das bases quinodais, que apresentam uma mistura de tons roxos e azuis. Em condições alcalinas (pH > 8), a estrutura denominada chalcona, de cor amarela, é a principal forma observada. Essas diferentes estruturas e a coexistências das mesmas na solução explicam as distintas colorações que as soluções assumem ao longo da escala de pH (CASTAÑEDA-OVANDO et al., 2009; OLIVEIRA FILHO et al., 2021; YONG; LIU, 2020; ZHENG et al., 2022).

A transição de cor ao longo da escala de pH também influencia a estabilidade das antocianinas, sendo essas mais estáveis em pH ácido, na forma de cátion flavílio, em relação aos pH alcalinos (BECERRIL; NERÍN; SILVA, 2021).

O comportamento de mudança de cor observado indica que as antocianinas presentes no extrato, obtido a partir do bagaço de uva, são sensíveis à mudança de pH do meio e tem potencial para serem utilizadas como corante natural responsivo ao pH em embalagens inteligentes que se comuniquem com o consumidor, atuando, por exemplo, como indicador colorimétrico de frescor dos alimentos embalados, como produtos cárneos e pescado.

4.2. Caracterização das soluções poliméricas

4.2.1. Condutividade elétrica e viscosidade aparente das soluções poliméricas de zeína e extrato de bagaço de uva

A condutividade elétrica das soluções poliméricas de zeína foi alterada após a adição de extrato de bagaço de uva nas mesmas, exibindo um aumento em relação à solução de zeína pura e, ainda, aumentando gradativamente de acordo com o aumento na concentração de extrato adicionado à solução ($p < 0,05$). Conforme reportado na Tabela 6, os valores de condutividade elétrica variaram entre 1.034,00 a 1.375,67 $\mu\text{S}.\text{cm}^{-1}$ para soluções de zeína pura e com 15% (m/m) de extrato adicionado, respectivamente. Isso possivelmente ocorreu devido à estrutura química e natureza polar das antocianinas presente no

extrato de bagaço de uva, que podem ter aumentado a quantidade de cargas elétricas presentes na solução polimérica (BECERRIL; NERÍN; SILVA, 2021).

Tabela 6 - Condutividade elétrica e viscosidade aparente das soluções poliméricas de zeína com diferentes concentrações de extrato de bagaço de uva.

Soluções poliméricas		
Extrato (% m/m)*	Condutividade elétrica ($\mu\text{S} \cdot \text{cm}^{-1}$)	Viscosidade aparente (cP)
0	$1.034,00 \pm 2,65^d$	$120,97 \pm 0,35^a$
5	$1.134,67 \pm 2,08^c$	$115,30 \pm 0,17^b$
10	$1.232,33 \pm 1,53^b$	$114,57 \pm 0,35^b$
15	$1.375,67 \pm 1,53^a$	$110,93 \pm 0,40^c$

* Concentração de extrato expressa em % (m/m, em zeína na solução polimérica);

^{a,b} Médias seguidas de letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa entre os dados pelo teste Tukey ($p < 0,05$).

A condutividade elétrica é um parâmetro da solução que pode influenciar a morfologia e distribuição de tamanhos do material formado por *electrospinning*. Esse parâmetro depende principalmente do tipo e concentração de polímero e de extrato utilizados, do solvente da solução e da quantidade de compostos ionizáveis presentes no meio. Um valor de condutividade elétrica da solução polimérica mais alto implica em aumento da mobilidade dos íons e, conseqüentemente, proporciona maior alongamento do jato de solução após a aplicação de um campo elétrico externo (como no processo de *electrospinning*), possibilitando a produção de fibras com diâmetros menores (ANTUNES et al., 2017).

A elevação da condutividade elétrica das soluções de zeína após a adição do extrato de bagaço de uva corroboram com os dados de Radünz et al. (2020), que reportaram aumento da condutividade elétrica de soluções poliméricas de zeína 9% (m/v, em etanol 70%) após a adição de diferentes

proporções de extrato de brócolis. Evangelho et al. (2019) observaram comportamento antagônico em relação a condutividade das soluções poliméricas formadas por essa proteína ao adicionar ácido fólico a soluções de zeína (30% m/v, em etanol 70%, contendo carbonato de sódio 0,01 mol.L⁻¹), as quais apresentaram decréscimo no valor de condutividade após a incorporação dos compostos.

A viscosidade é outro parâmetro no processo de *electrospinning* relacionado à solução polimérica e também afeta diretamente a morfologia e distribuição de tamanho das fibras ultrafinas. Soluções de alta viscosidade apresentam dificuldade para ejeção do jato contínuo de polímero a partir da ponta da agulha e soluções de baixa viscosidade podem não serem capazes de formar um jato estável, resultando em um material com maior diâmetro, descontínuo e com muitos *beads*. Sendo assim, existe uma faixa ideal de viscosidade para cada solução polimérica que proporciona fibras de morfologia otimizada (BHARDWAJ; KUNDU, 2010).

A adição de extrato de bagaço de uva afetou significativamente a viscosidade aparente das soluções poliméricas, tornando-as menos viscosas ($p < 0,05$). Conforme demonstrado na Tabela 6, quanto maior a concentração de extrato adicionada à solução polimérica, menor foi o valor observado para viscosidade aparente, sendo que esse parâmetro variou de 120,97 a 110,93 cP para as soluções poliméricas sem extrato e com 15% (m/m) de extrato adicionado. Esse comportamento pode ter sido observado em razão da diminuição do emaranhamento das cadeias de zeína, devido as interações polímero-extrato. No entanto, essa redução da viscosidade não foi capaz de desestabilizar a formação do jato polimérico contínuo (o que impediria a formação das fibras) ou afetar a morfologia das fibras ultrafinas produzidas (resultados apresentados na discussão da seção 4.3.1).

Dados similares foram reportados por Altan e Çayir (2020), que também observaram diminuição no valor de viscosidade aparente de soluções de zeína (34% m/v, em ácido acético glacial) após a adição do composto bioativo carvacrol. Em contraste, quando o extrato da casca de tomate, rico em carotenóides, foi incorporado em soluções de zeína a 24% (m/v, ácido acético) em diferentes proporções, Horuz e Belibağlı (2019) relataram aumento da viscosidade dessas soluções.

4.3. Caracterização das fibras ultrafinas de zeína com extrato do bagaço de uva

4.3.1. Morfologia e distribuição de tamanho das fibras ultrafinas

A morfologia e a distribuição de tamanho das fibras ultrafinas de zeína com 0, 5, 10 e 15% (m/m) de extrato de bagaço de uva estão reportadas em conjunto na Figura 10. As condições empregadas durante a execução do processo de *electrospinning* propiciaram a formação de fibras ultrafinas homogêneas, contínuas, lisas e sem *beads* (Figura 10a). A encapsulação de extrato pelas fibras de zeína produzidas não apresentou efeito sob a morfologia das mesmas, mantendo as características citadas anteriormente, conforme as micrografias obtidas (Figuras 10c, 10e e 10g). Isso demonstra que a incorporação do extrato não foi capaz de afetar negativamente o processo de *electrospinning*.

Os diâmetros médios encontrados foram levemente afetados pela adição de extrato de bagaço de uva na solução polimérica, sendo que as fibras ultrafinas de zeína pura demonstraram o maior valor para esse parâmetro, igual a 495 ± 106 nm (Figura 10b) e, as fibras com 15% (m/m) de extrato de bagaço de uva apresentaram diâmetro médio menor, igual a 431 ± 96 nm (Figura 10h). Essa redução no diâmetro médio possivelmente foi observada em função das mudanças que ocorreram nos parâmetros de condutividade e viscosidade das soluções poliméricas após a adição de extrato a essas soluções (Tabela 6), que propiciaram a redução dos diâmetros médios das fibras ultrafinas.

Esses dados corroboram com o estudo de Avila et al. (2020), que observaram redução do diâmetro médio das fibras ultrafinas de 583 nm em fibras de zeína pura para 572 nm em fibras com 3,3% (m/v) extrato da casca de jabuticaba, após as soluções poliméricas apresentarem o mesmo comportamento de queda no valor de viscosidade aparente e elevação da condutividade elétrica.

Com comportamento inverso, ou seja, elevação da viscosidade aparente da solução polimérica e decréscimo do valor de condutividade, Wang et al. (2017) obtiveram fibras ultrafinas de zeína com curcumina com diâmetro médio maior que as fibras de zeína pura, variando de $785 \pm 8,6$ a $615 \pm 8,5$ nm, respectivamente.

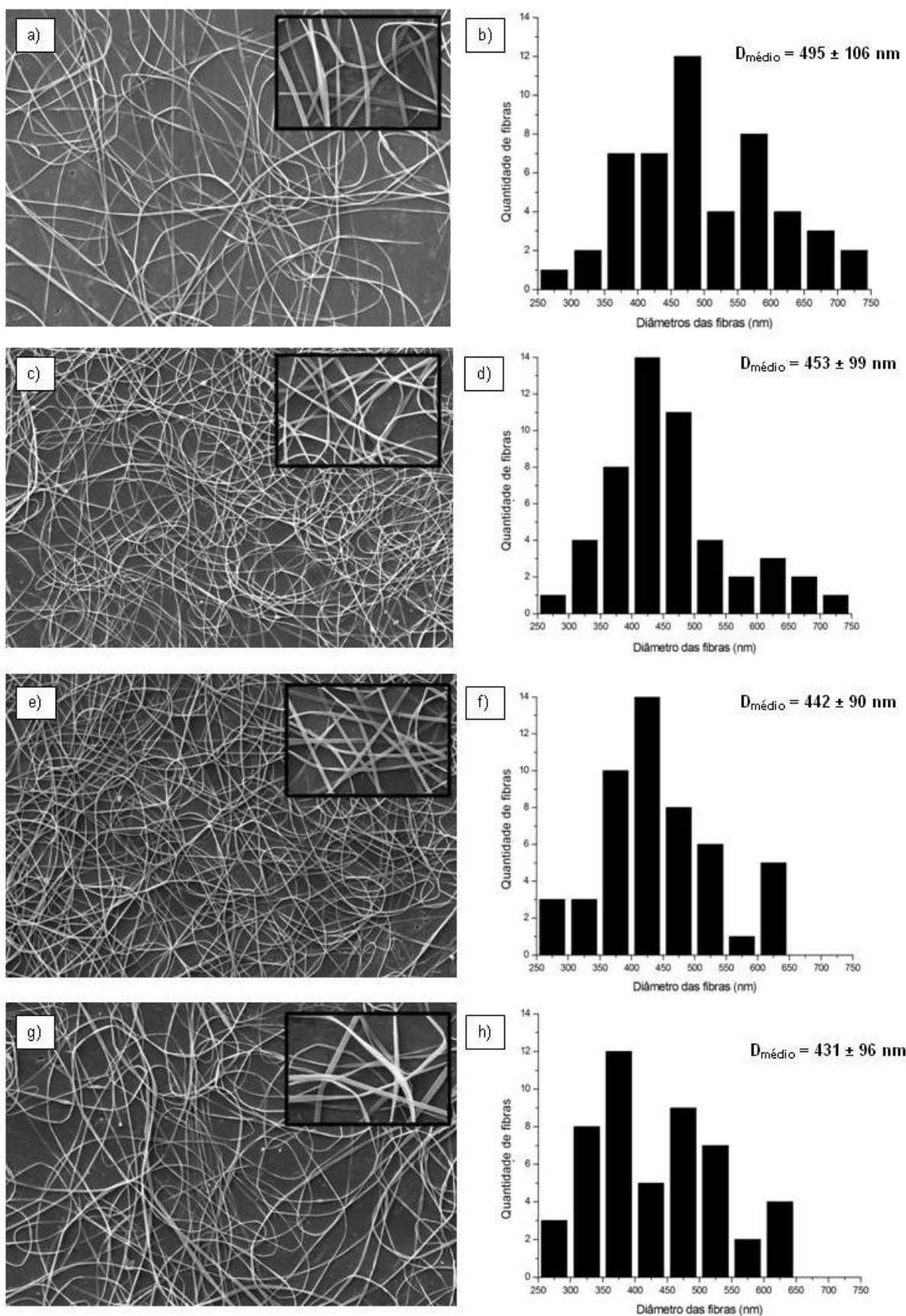


Figura 10 - Morfologia das fibras ultrafinas de zeína com (a) 0, (c) 5, (e) 10 e (g) 15 % (m/m) de extrato de bagaço de uva e distribuição de tamanho das fibras ultrafinas de zeína com (b) 0, (d) 5, (f) 10 e (h) 15% (m/m) de extrato de bagaço de uva.

4.3.2. Eficiência de encapsulação

A eficiência de encapsulação (EE) é um parâmetro fundamental para quantificar a concentração efetiva de compostos bioativos que foram encapsulados na matriz polimérica. Fatores como a concentração de polímero e de compostos bioativos presentes na solução polimérica são capazes de influenciar esse parâmetro e proporcionar um aumento ou redução na eficiência de encapsulação (COELHO; ESTEVINHO; ROCHA, 2021; LEIDY; MARIA XIMENA, 2019; PREMJI et al., 2022). A concentração de extrato de bagaço de uva encapsulada nas fibras ultrafinas de zeína exerceu efeito sob a eficiência de encapsulação desse polímero ($p < 0,05$), conforme a Tabela 7.

Tabela 7 - Eficiência de encapsulação após o processo de *electrospinning* para as fibras ultrafinas de zeína com diferentes concentrações de extrato de bagaço de uva.

Fibras ultrafinas *	Zeína ** (%, m/v)	Extrato*** (%, m/m)	Eficiência de encapsulação (%)
Fibras 5%	30	5	90,51 ± 2,15 ^a
Fibras 10%	30	10	89,43 ± 1,51 ^a
Fibras 15%	30	15	85,07 ± 1,01 ^b

* Nomenclatura da amostra referente à concentração de extrato encapsulado nas fibras ultrafinas;

** Concentração de zeína expressa em % (m/v, em etanol 80% (v/v));

*** Concentração de extrato nas fibras ultrafinas expressa em % (m/m, em zeína na solução polimérica);

^{a,b} Médias seguidas de letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa entre os dados pelo teste Tukey ($p < 0,05$).

As fibras ultrafinas de zeína demonstraram adequada eficiência de encapsulação para o extrato de bagaço de uva, com valores acima de 85% de eficiência para as três concentrações utilizadas nesse estudo. Pode-se observar que não houve diferença significativa ($p < 0,05$) na eficiência de encapsulação para as fibras com 5 e 10% (m/m) de extrato, com valores iguais

a, aproximadamente, 90%. Porém, para as fibras ultrafinas de zeína com a maior concentração de compostos incorporada (15% (m/m) de extrato), observou-se uma queda nesse parâmetro, pois essa amostra apresentou eficiência de encapsulação igual a 85,07%. Esse comportamento possivelmente ocorreu em virtude da saturação dos sítios ativos disponíveis na proteína zeína devido ao aumento progressivo na concentração de extrato de bagaço de uva incorporado a solução polimérica.

Os resultados observados para eficiência de encapsulação são similares aos reportados na literatura para fibras de zeína obtidas por *electrospinning* por Evangelho et al. (2019), que produziram fibras desse biopolímero incorporadas com ácido fólico (0,5 à 1,5% m/m) e relataram eficiências de encapsulação acima de 82%. Todavia, em outro estudo, Horuz e Belibağlı (2019) mencionam dados superiores para eficiência de encapsulação, acima de 92%, após a incorporação de extrato da casca do tomate, rico em carotenóides, em fibras de zeína.

Os valores obtidos para eficiência de encapsulação, pela técnica de *electrospinning*, acima de 85% (Tabela 7), são adequados para promover a preservação dos compostos bioativos presentes no extrato de bagaço de uva, como as antocianinas, garantindo a proteção dos mesmos frente a fatores ambientais (como temperatura, luminosidade, oxigênio, umidade, ataque enzimático, entre outros) e, ainda, aumentar a estabilidade química e térmica dos compostos e controlar a liberação dos mesmos para o meio.

As diversas vantagens de uma encapsulação eficiente viabilizam, por exemplo, potencial aplicação das fibras ultrafinas de zeína com extrato de bagaço de uva em embalagens ativas e inteligentes para alimentos.

4.3.3. Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier

A análise de Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) permite investigar as possíveis interações entre moléculas de diferentes materiais, após a mistura dos mesmos (DENG et al., 2018). Nesse estudo, a análise foi realizada com o intuito de observar-se os grupos funcionais do polímero zeína e do extrato de bagaço de uva, bem como as

interações entre as moléculas presentes em ambas as amostras (através de suas respectivas bandas), após o processo de *electrospinning*.

A presença de bandas na análise de FTIR pode indicar deformações das cadeias, também denominadas de deformação angular (δ) (que podem ser simétricas (δ_s) ou assimétricas (δ_a)) ou estiramento das funções, também denominadas de deformações axiais (que podem ser (ν) simétricas (ν_s) ou assimétricas (ν_a)).

Os espectros de FTIR da zeína pura (polímero em pó), do extrato de bagaço da uva não encapsulado (extrato liofilizado) e das fibras ultrafinas de zeína com extrato encapsulado nas proporções 0, 5, 10 e 15% (m/m) estão reportados em conjunto na Figura 11. Na Tabela 8, são demonstradas as respectivas bandas de absorção observadas durante a análise de grupos funcionais para cada amostra.

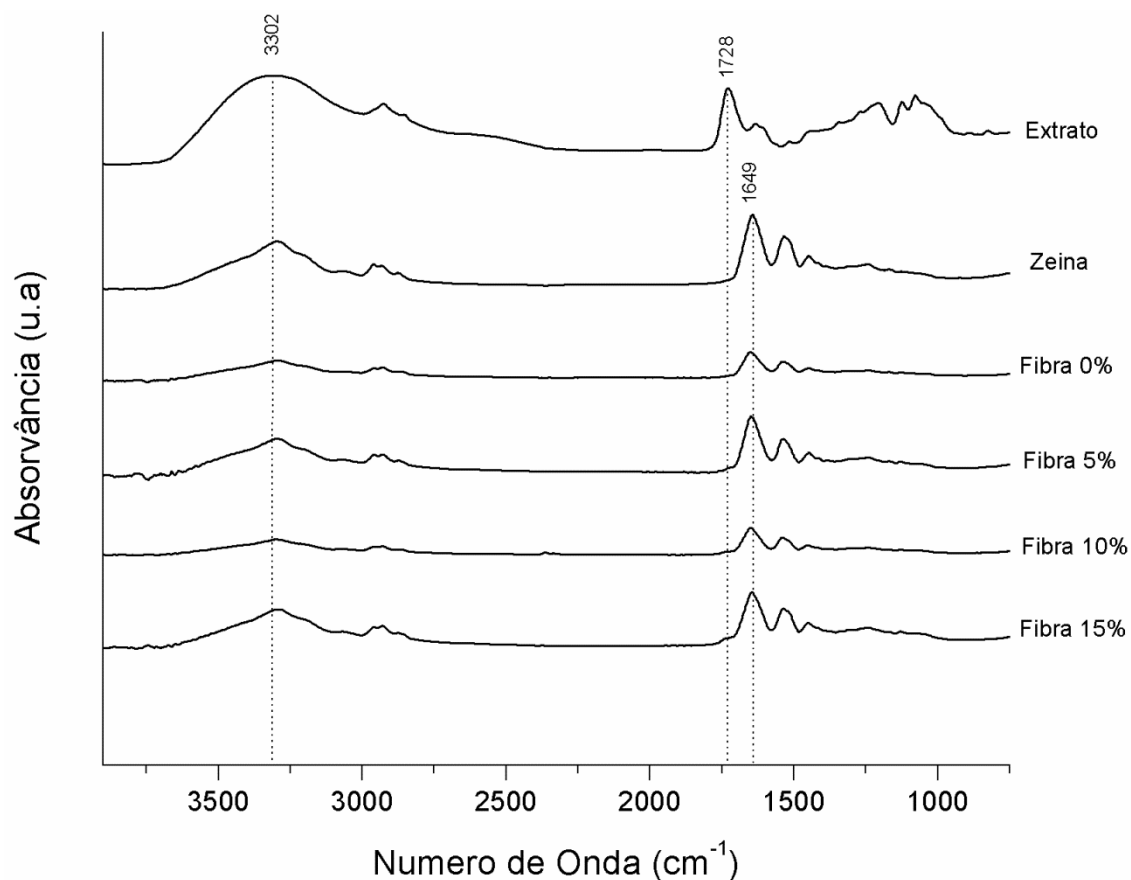


Figura 11 – Espectros FTIR do extrato de bagaço de uva não encapsulado, do polímero zeína e das fibras ultrafinas de zeína com diferentes concentrações de extrato de bagaço de uva.

Tabela 8 – Bandas de absorção do extrato de bagaço de uva não encapsulado, do polímero zeína e das fibras ultrafinas de zeína com diferentes concentrações de extrato de bagaço de uva.

Vibração	Número de onda (cm ⁻¹)					
	Extrato não encapsulado	Zeína	Fibras 0% *	Fibras 5% *	Fibras 10% *	Fibras 15% *
$\nu_{\text{OH}}/\nu_{\text{NH}}$	3302	3302	3302	3299	3302	3296
$\nu_{\text{s}}\text{CH}$	2930	2960	2965	2957	2965	2965
$\nu_{\text{a}}\text{CH}$	2857	2876	2864	2878	2879	2878
$\nu_{\text{C=O}}$	1728					
$\nu_{\text{C=O}}$	1632	1649	1651	1649	1651	1645
$\nu_{\text{C=C}}$	1605					
$\nu_{\text{C-N}}/\delta_{\text{N-H}}$		1535	1535	1533	1539	1535
$\nu_{\text{a}}\text{COO}^-$	1516					
$\delta_{\text{s}}\text{CH}_2/\nu_{\text{s}}\text{COO}^-$	1443					
$\nu(\text{C-O}/\delta_{\text{O-H}})$		1446	1445	1447	1450	1452
$\delta_{\text{s}}\text{CH}_3\text{CO}$	1342					
$\nu_{\text{a}}=\text{COC};/\delta_{\text{COH}}$	1269					
$\nu_{\text{C-O}}$	1206					
$\delta_{\text{C-N}}$		1240	1240	1240	1240	1236
$\nu_{\text{a}}\text{COC}$	1123	1128	1126	1128	1128	1126
$\nu_{\text{C-O}}$	1076					
ν_{OCC}	1049					
γ_{CH}	831					

* Nomenclatura da amostra referente à concentração de extrato encapsulado nas fibras ultrafinas expressa em % (m/m, em zeína na solução polimérica).

O extrato de bagaço de uva não encapsulado apresentou bandas características em 3302 cm^{-1} ($\nu\text{O-H}$ sobreposto a $\nu\text{N-H}$) referente à hidroxila presente em álcoois, ácidos, proteínas e fenóis, bandas em $2930 - 2857\text{ cm}^{-1}$ ($\nu_s\text{C-H}$; $\nu_a\text{C-H}$) das cadeias cíclicas e alifáticas, banda em 1728 cm^{-1} ($\nu\text{C=O}$) referente a grupos carbonila, banda em 1632 cm^{-1} ($\nu\text{C=O}$) da estrutura das carboxilas e, banda em 1605 cm^{-1} ($\nu\text{C=C}$) das ligações do anel aromático, característico em moléculas fenólicas (DONG et al., 2021; OLIVEIRA et al., 2018; SILVA et al., 2014; TARANTILIS et al., 2008; ZHAO et al., 2015).

No extrato, foram observadas também bandas em 1516 cm^{-1} ($\nu_a\text{COO}^-$), 1443 cm^{-1} ($\delta_s\text{CH}_2$), 1443 cm^{-1} ($\nu_s\text{COO}^-$), 1342 cm^{-1} ($\delta_s\text{CH}_3\text{CO}$) e 1269 cm^{-1} ($\nu_a=\text{C-O-C}$; $\delta\text{C-O-H}$ no plano) dos grupamentos ligados aos anéis aromáticos. Além disso, o espectro apresentou bandas características de vibração C-O em 1206 cm^{-1} ($\nu\text{C-O}$) de álcool, 1123 cm^{-1} ($\nu_a\text{C-O-C}$) de éter cíclico, 1076 cm^{-1} ($\nu\text{C-O}$) de éter alifático e 1049 cm^{-1} ($\nu\text{O-C-C}$) de éter cíclico. Ainda, a banda em 831 cm^{-1} ($\gamma\text{C-H}$) representa os hidrogênios adjacentes presentes nas cadeias aromáticas (DONG et al., 2021; OLIVEIRA et al., 2018; SILVA et al., 2014; TARANTILIS et al., 2008; ZHAO et al., 2015).

A zeína pura (polímero em pó) e as fibras ultrafinas de zeína sem extrato encapsulado (Fibras 0%) não apresentaram diferenças nas bandas observadas, indicando que o processo de *electrospinning* não afetou os grupos funcionais do polímero.

Ambas as amostras demonstraram bandas em 3302 cm^{-1} ($\nu\text{O-H}$ sobreposto a banda $\nu\text{N-H}$) referentes a amida A e em $2965 - 2864\text{ cm}^{-1}$ ($\nu_s\text{C-H}$; $\nu_a\text{C-H}$) dos grupos alifáticos. Bandas características de proteínas foram observadas em 1651 cm^{-1} ($\nu\text{C=O}$) e 1535 cm^{-1} ($\nu\text{C-N}$ sobreposto ao $\delta\text{N-H}$), referentes as ligações dos grupos peptídeos da amida I e da amida II, respectivamente. Ainda é observada a banda em 1445 cm^{-1} , respectiva as vibrações ($\nu\text{C-O}$ sobreposta a $\delta\text{O-H}$) e, por fim, bandas em 1240 cm^{-1} ($\delta\text{C-N}$) da amida III e 1126 cm^{-1} ($\nu_a\text{C-O-C}$) da cadeia (DENG et al., 2018, 2019; NIU et al., 2020b).

As bandas de amida I e II na região entre $1600 - 1700\text{ cm}^{-1}$ indicam a predominância de estruturas secundárias α ou β da zeína. Assim, sugere-se que há predominância do tipo α -zeína, visto que não há bandas de absorção

características de β -zeína (bandas em $\sim 1670\text{ cm}^{-1}$ referentes a β -voltas e bandas em $\sim 1610\text{ cm}^{-1}$ referentes a β -folhas) no espectro obtido (ALI et al., 2014; FORATO; BICUDO; COLNAGO, 2003; ZHIJIANG et al., 2017).

As fibras ultrafinas de zeína incorporadas com 5, 10 e 15% (m/m) de extrato de bagaço de uva apresentaram bandas similares as fibras sem extrato. O desaparecimento da banda característica de carbonila (em 1728 cm^{-1}) presente no espectro do extrato de bagaço de uva não encapsulado e o deslocamento da banda característica de carboxila, de 1632 cm^{-1} para, aproximadamente, 1650 cm^{-1} , nos espectros das fibras com extrato encapsulado sugerem que a interação do extrato com o polímero ocorreu através de grupo carbonila do primeiro com o grupamento da amida I do segundo.

Ainda, em razão de não serem observadas novas bandas para os espectros das fibras ultrafinas de zeína com extrato encapsulado (em todas as concentrações), sugere-se que ocorreram interações intermoleculares através de ligações de hidrogênio e forças de Van der Waals, sem a ocorrência de reações químicas entre as moléculas. Essas interações são confirmadas pela similaridade das regiões *fingerprint* (região do espectro de $800 < \text{cm}^{-1} < 1500$) dos espectros das fibras ultrafinas de zeína sem extrato e das fibras com 5, 10 e 15% (m/m) de extrato encapsulado.

A presença dessas interações intermoleculares nas fibras ultrafinas de zeína com adição de extrato de bagaço de uva possivelmente contribuiu para que ocorresse a encapsulação desse extrato nas estruturas nanométricas, durante o processo de *electrospinning*. Ainda, é provável que essas interações entre as moléculas do material de parede e os compostos presentes no extrato, interfiram no processo de liberação dos mesmos, sendo um importante fator a ser avaliado para determinar as taxas de difusão dos compostos bioativos em diferentes meios e as possíveis aplicações para essas nanoestruturas em embalagens ativas e inteligentes para alimentos.

4.3.4. Propriedades térmicas

4.3.4.1 Calorimetria Diferencial de Varredura

A análise de calorimetria diferencial de varredura (DSC) proporciona meios para avaliar os processos endotérmicos e exotérmicos que ocorrem na amostra em aquecimento, permitindo obter dados sobre a temperatura de transição vítrea e de degradação, além da energia necessária que deve ser absorvida para que esses eventos ocorram (DENG et al., 2018; MEHRAN; MASOUM; MEMARZADEH, 2020; REN et al., 2022). No presente trabalho, análise foi realizada com o intuito de obter-se dados sobre as temperaturas e energias de cada material. E, ainda, avaliar a influência do processo de encapsulação por *electrospinning* nos parâmetros mencionados (através da comparação entre diferentes termogramas de antes e após a encapsulação).

Os termogramas de DSC da zeína pura (polímero em pó), do extrato de bagaço da uva encapsulado (extrato liofilizado) e das fibras ultrafinas de zeína com extrato encapsulado nas proporções 0, 5, 10 e 15% (m/m) estão reportados em conjunto na Figura 12. Na Tabela 9 são demonstradas as respectivas temperaturas e entalpias observadas durante a análise térmica de cada amostra.

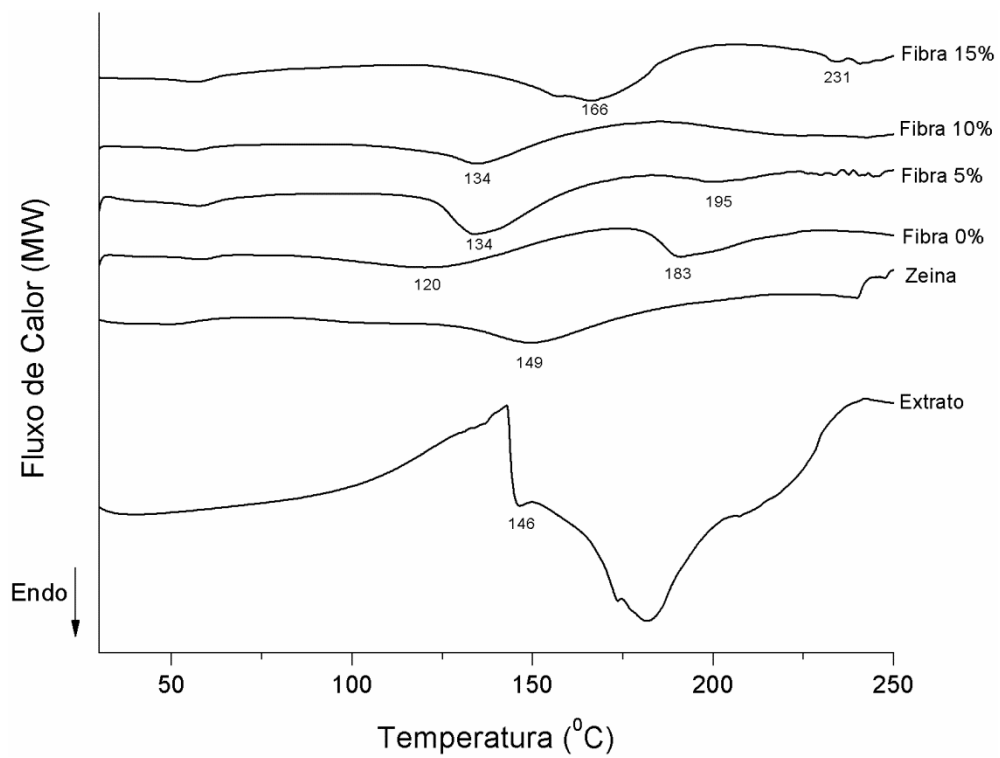


Figura 12 – Termogramas de DSC do extrato de bagaço de uva não encapsulado, do polímero zeína e das fibras ultrafinas de zeína com diferentes concentrações de extrato de bagaço de uva.

Tabela 9 - Temperaturas e entalpias, pela análise de DSC, do extrato de bagaço de uva não encapsulado, do polímero zeína e das fibras ultrafinas de zeína com diferentes concentrações de extrato de bagaço de uva.

Parâmetro *	Amostras					
	Extrato não encapsulado	Zeína	Fibras 0% **	Fibras 5% **	Fibras 10% **	Fibras 15% **
Tp ₀	143,2	131,2	51,3	49,4	51,1	48,7
Tp ₁	146,5	149,3	58,3	55,5	57,5	56,5
ΔT ₁	4,8	35,4	12,9	11,3	12,9	14,3
ΔH ₁	3,7	16,9	2,1	1,1	1,9	1,4
Tp ₀	171,8	235,9	95,9	127,4	123,2	152,5
Tp ₂	173,6	239,9	120,1	134,7	133,8	166,4
ΔT ₂	2,7	3,4	56,6	19,7	32,4	27,9
ΔH ₂	0,25	2,3	44,7	8,9	36,1	9,7
Tp ₀	175,6	256,2	183,7		195,5	231,1
Tp ₃	181,6	258,5	191,0		200,2	234,6
ΔT ₃	11,8	4,5	18,6		8,7	0,5
ΔH ₃	4,1	13,8	10,3		3,4	6,0
Tp ₀	205,9					
Tp ₄	214,2					
ΔT ₄	10,1					
ΔH ₄	0,43					
Tp ₀	228,3					
Tp ₅	241,9					
ΔT ₅	6,2					
ΔH ₅	5,2					

* Tp₀ = Temperatura inicial (°C), Tp_x = Temperatura de pico (°C), ΔT_x = Variação de temperatura, ΔH_x = Entalpia (J.g⁻¹);

** Nomenclatura da amostra referente à concentração de extrato encapsulado nas fibras ultrafinas expressa em % (m/m, em zeína na solução polimérica).

O extrato de bagaço de uva não encapsulado apresentou cinco eventos térmicos, sendo quatro desses endotérmicos e um exotérmico (Tabela 9). A primeira endoterma foi observada na temperatura de 146,5 °C ($\Delta H = 3,7 \text{ J.g}^{-1}$), seguido da endoterma em 173,6 °C ($\Delta H = 0,25 \text{ J.g}^{-1}$). O terceiro evento térmico, em 181,6 °C, apresentou a maior absorção de energia, com $\Delta H = 4,1 \text{ J.g}^{-1}$. E, posteriormente, foi observada a quarta endoterma, na temperatura de 214,2 °C ($\Delta H = 0,43 \text{ J.g}^{-1}$).

As transições supracitadas possivelmente referem-se as temperaturas de fusão e as respectivas energias necessárias para aumentar o estado de agitação molecular e ocasionar a mudança de estado físico (de sólido para líquido) dos diferentes compostos que estão presentes no bagaço de uva liofilizado. Por fim, observou-se uma exoterma em, aproximadamente, 242 °C ($\Delta H = 5,2 \text{ J.g}^{-1}$), provavelmente referente a decomposição da amostra por combustão.

O polímero zeína em pó apresentou três efeitos endotérmicos (Tabela 9), sendo que o efeito com maior valor de entalpia relativa à energia absorvida foi a primeira endoterma, observada em 149,3 °C ($\Delta H = 16,9 \text{ J.g}^{-1}$), relativa à temperatura de transição vítrea da proteína. As demais endotermas, em temperaturas iguais a 239,9 ($\Delta H = 2,3 \text{ J.g}^{-1}$) e 258,5 °C ($\Delta H = 13,8 \text{ J.g}^{-1}$), possivelmente são referentes a decomposição da zeína, visto que a degradação térmica de biopolímeros pode ocorrer em duas etapas, sendo a etapa inicial relacionada a quebra das ligações da rede de moléculas e a segunda etapa relacionada a degradação das ligações internas de cada monômero que compõe o biopolímero (DENG et al., 2018).

No geral, as fibras ultrafinas de zeína com e sem extrato de bagaço de uva encapsulado também apresentaram três eventos térmicos (Tabela 9). O primeiro evento em, aproximadamente, 58 °C, pode ser atribuído a perda de água pelas fibras ultrafinas (DRAGO et al., 2022; NEO et al., 2013).

O segundo evento térmico, referente a transição vítrea dos materiais, ocorreu em temperatura igual a 120,1 °C (absorvendo energia de $\Delta H = 44,7 \text{ J.g}^{-1}$) para as fibras compostas apenas pela proteína (Fibras 0%). As demais fibras de zeína com extrato de bagaço de uva incorporado nas proporções 5, 10 e 15% (m/m) apresentaram temperaturas de transição vítrea superiores, com valores iguais a 134,7; 133,8 e 166,4 °C, respectivamente. Indicando que

esses materiais fibrosos são mais estáveis termicamente, sendo que as fibras com 15% de extrato foram o material mais estável, pois apresentaram a temperatura de degradação mais alta.

Esse comportamento de elevação da temperatura de transição vítrea em relação às fibras com extrato encapsulado, provavelmente ocorreu em função da menor mobilidade das cadeias de zeína devido as interações com o extrato de bagaço de uva, por exemplo, através de ligações de hidrogênio (ALTAN; ÇAYIR, 2020; REN et al., 2022; WANG et al., 2016).

O terceiro evento térmico observado nos termogramas das fibras com extrato, com endotermas em, aproximadamente, 200 °C, possivelmente seja referente à decomposição das amostras (NEO et al., 2013; WANG et al., 2022).

A inexistência dos picos característicos observados no termograma do extrato não encapsulado em relação aos termogramas das fibras ultrafinas de zeína com extrato nas proporções 5, 10 e 15% (m/m) indica que os compostos do bagaço de uva foram eficientemente encapsulados pela matriz polimérica (MEHRAN; MASOUM; MEMARZADEH, 2020)

Ainda, os resultados de DSC demonstram que as fibras ultrafinas de zeína com extrato de bagaço de uva (em todas as concentrações adicionadas) apresentam potencial para aplicações em temperaturas mais elevadas como, por exemplo, temperaturas de processos térmicos que visem à conservação dos alimentos, visto que foram estáveis termicamente até, aproximadamente, 130 °C.

4.3.4.2 Análise de Termogravimetria

A análise de termogravimetria (TGA) permite avaliar a estabilidade térmica das amostras em aquecimento, mensurando a perda de massa das mesmas. Ainda, a comparação entre diferentes termogramas de TGA antes e após o processo de encapsulação por *electrospinning* possibilita obter dados sobre a influência do mesmo na estabilidade térmica do material de parede e compostos encapsulados (DENG et al., 2018; NEO et al., 2013).

Os termogramas de TGA da zeína pura (polímero em pó), do extrato de bagaço da uva não encapsulado (extrato liofilizado) e das fibras ultrafinas de zeína com extrato encapsulado nas proporções 0, 5, 10 e 15% (m/m) estão

reportados em conjunto na Figura 13. As respectivas temperaturas e perdas de massa observadas durante a análise térmica de cada amostra são demonstradas na Tabela 10.

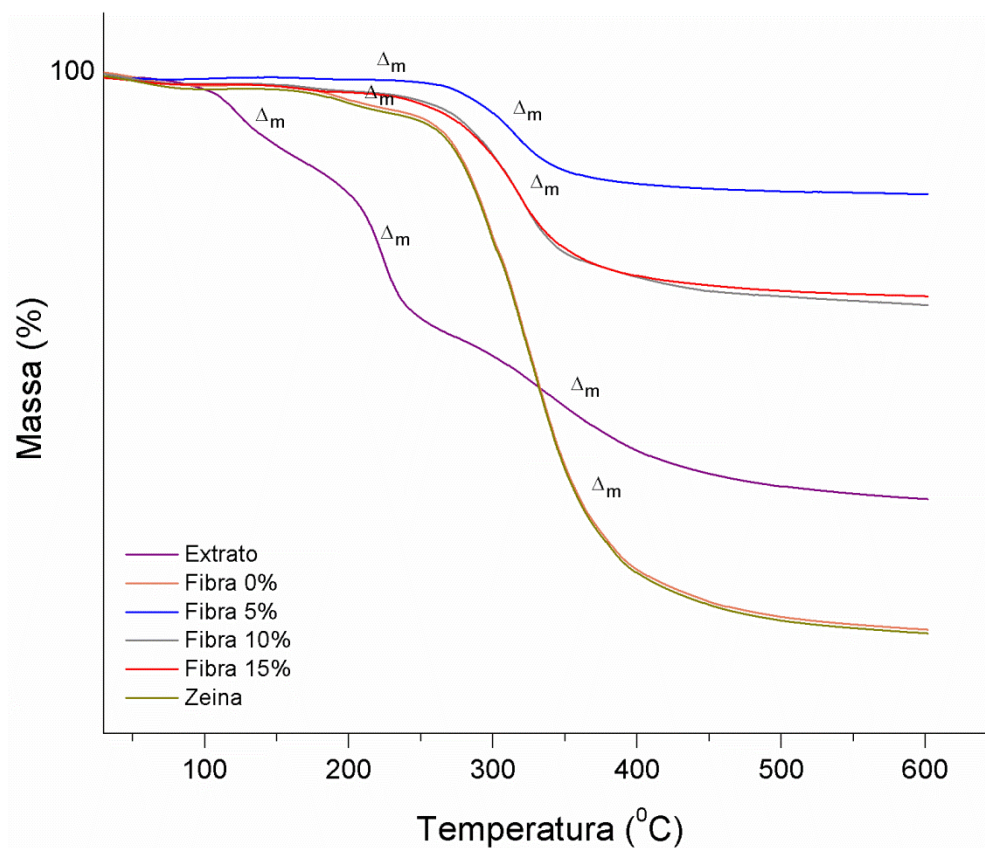


Figura 13 - Curvas de perda de massa por TGA do extrato de bagaço de uva não encapsulado, do polímero zeína e das fibras ultrafinas de zeína com diferentes concentrações de extrato de bagaço de uva.

Tabela 10 - Temperaturas e perdas de massa, pela análise de TGA, do extrato de bagaço de uva liofilizado e não encapsulado, do polímero zeína e das fibras ultrafinas de zeína com diferentes concentrações de extrato de bagaço de uva.

Parâmetro *	Amostras					
	Extrato não encapsulado	Zeína	Fibras 0% **	Fibras 5% **	Fibras 10% **	Fibras 15% **
Tp ₀	110,40	172,70	191,40	152,70	152,40	155,00
Tp ₁	120,00	184,20	205,20	170,60	165,10	158,60
Δm ₁	8,22	3,83	2,89	1,67	2,56	2,95
Tp ₀	210,90	283,30	285,10	282,70	286,60	289,20
Tp ₂	220,90	318,40	311,90	310,30	310,30	311,80
Δm ₂	33,97	64,32	55,53	60,89	53,15	53,24
Tp ₀	308,50					
Tp ₃	314,10					
Δm ₃	23,01					
Δm _T	65,20	68,15	58,42	62,63	55,71	56,19
Δm _R	34,80	31,85	41,58	37,37	44,29	43,81

* Tp₀ = Temperatura inicial (°C), Tp_x = Temperatura de pico (°C), Δm_x = Variação de massa (%), Δm_T = Variação de massa total (%), Δm_R = Massa do resíduo (%);

** Nomenclatura da amostra referente à concentração de extrato encapsulado nas fibras ultrafinas expressa em % (m/m, em zeína na solução polimérica).

O extrato de bagaço de uva não encapsulado apresentou três eventos de perda de massa, conforme a Tabela 10. O primeiro evento foi observado na temperatura de 120 °C, sendo responsável por uma perda de massa igual a 8,22% (em relação à massa inicial). Essa massa perdida pode ser atribuída a evaporação dos compostos voláteis presentes no extrato e também à eliminação de uma pequena quantidade de água que possivelmente tenha sido absorvida do ambiente durante a manipulação da amostra no momento da análise, visto que por se tratar de um extrato liofilizado, o mesmo é altamente higroscópico.

O segundo evento térmico em, aproximadamente, 221 °C, foi responsável pela maior perda de massa do extrato durante toda a análise (33,07% da massa inicial). Esse evento provavelmente refere-se ao início da decomposição térmica dos compostos presentes no extrato. Por fim, a perda de 23,01% da massa inicial é referente à decomposição final dos compostos mais estáveis termicamente presentes no extrato de bagaço de uva não encapsulado (Tabela 10).

As amostras de zeína pura (polímero em pó) e de todas as fibras analisadas apresentaram apenas dois eventos de perda de massa, sendo que o polímero zeína em pó teve a maior perda de massa em relação a todas as amostras (Tabela 10), igual a 68,15% da massa inicial. Essa perda total de massa ocorreu em duas temperaturas, de 184,20 (3,83%) e 318,40 °C (64,32%). A primeira temperatura é possivelmente atribuída a degradação da rede polimérica formada a partir de interações intermoleculares das cadeias de zeínas adjacentes e, a segunda temperatura, provavelmente deve-se a degradação dos monômeros da proteína (DENG et al., 2018; XU et al., 2021).

As fibras sem extrato apresentaram a maior estabilidade térmica frente as demais amostras (Tabela 10), com o primeiro evento de perda de massa em temperatura igual a 205,20 °C (perda de 2,89% da massa inicial). O segundo evento, em 311,90 °C, foi responsável pela perda de mais da metade da massa inicial (55,53%), resultando em uma perda total igual a 58,42%. Esses eventos provavelmente são referentes as degradações causadas pelo rompimento das interações intermoleculares e degradação dos monômeros do biopolímero, conforme supracitado para a zeína na forma de pó (DENG et al., 2018; XU et al., 2021).

As fibras ultrafinas de zeína com 5, 10 e 15% (m/m) de extrato exibiram comportamento térmico semelhante, conforme demonstrado na Tabela 10. Os primeiros eventos térmicos dessas amostras ocorreram na faixa de 170,60 a 158,60 °C, com perdas de massas de 1,67 a 2,95% (da massa inicial) em relação as fibras com 5 a 15% (m/m) de extrato, respectivamente. Ainda, as fibras ultrafinas de zeína com 5% (m/m) de extrato demonstraram ser o material com menor perda de massa entre as três fibras com extrato encapsulado.

O segundo evento térmico dessas amostras ocorreu em torno de 310 °C para as três fibras ultrafinas, resultando em perdas de massa finais de até 62,63% (da massa inicial). Novamente, esses eventos térmicos e as consequentes perdas de massas em dois estágios são atribuídos as degradações intermoleculares e intramoleculares da proteína, conforme já mencionado (DENG et al., 2018; XU et al., 2021).

Além disso, observou-se que tanto o extrato não encapsulado, quanto a zeína em forma de pó e fibras ultrafinas com diferentes concentrações de extrato encapsulado, apresentaram massa residual de até 43,81% (em relação a massa inicial) após o término da análise. Segundo Deng et al. (2018), essa massa de resíduo observada em 600 °C provavelmente é constituída por compostos inorgânicos formados a partir da degradação térmica das amostras.

De modo similar ao mencionado na seção 4.3.4.1 (discussão dos resultados da análise de DSC), o desaparecimento dos picos de temperatura característicos de perdas de massa do extrato bagaço de uva em relação as fibras ultrafinas de zeína com extrato de bagaço de uva encapsulado (em todas as concentrações) indicam adequada encapsulação do extrato pela matriz polimérica por *electrospinning*.

4.3.5. Ângulo de contato

Os ângulos de contato com a água das membranas de fibras ultrafinas de zeína com diferentes concentrações de extrato de bagaço de uva (0, 5, 10 e 15% m/m) estão representados na Figura 14 durante os tempos iguais a 0, 25 e 50 s após a queda da gota de água. Os valores referentes aos ângulos médios das amostras estão apresentados na Tabela 11.

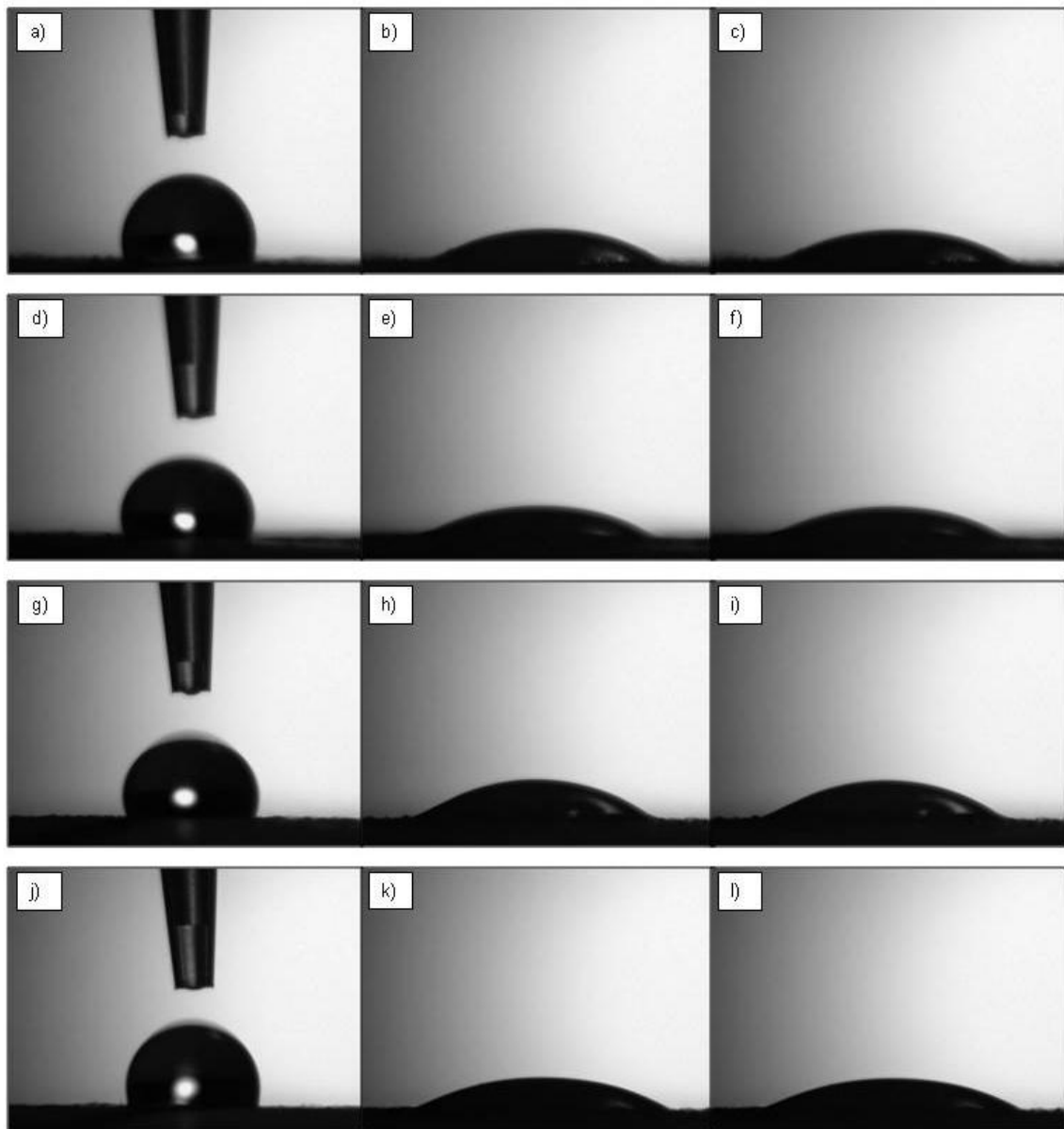


Figura 14 - Ângulo de contato com a água das membranas das fibras ultrafinas de zeína com concentrações de extrato de bagaço de uva iguais a 0 (a, b, c), 5 (d, e, f), 10 (g, h, i) e 15% (j, k, l) em tempos iguais a 0 (a, d, g, j), 25 (b, e, h, k) e 50 (c, f, i, l) segundos após a queda da gota de água.

Tabela 11 - Ângulo de contato médio das membranas de fibras ultrafinas de zeína com diferentes concentrações de extrato de bagaço de uva.

Fibras ultrafinas *	Ângulo de contato médio (°)		
	0 s	25 s	50 s
Fibras 0%	103,86	31,72	30,17
Fibras 5%	104,40	30,98	29,30
Fibras 10%	108,63	29,72	28,62
Fibras 15%	103,36	28,72	27,50

* Nomenclatura da amostra referente à concentração de extrato encapsulado nas fibras ultrafinas expressa em % (m/m, em zeína na solução polimérica).

No tempo zero (momento inicial após a queda da gota), as membranas de fibras ultrafinas de zeína sem extrato (Fibras 0%) e com a maior concentração de extrato de bagaço de uva encapsulado apresentaram ângulos de contato médios muito próximos, iguais a 103,86 e 103,36°, respectivamente (Tabela 11), sugerindo que, de modo geral, a incorporação do extrato não afetou drasticamente esse parâmetro no período de tempo inicial de interação com a gota de água.

Após transcorridos 25 s da queda da gota, todas as amostras demonstraram elevada redução nos valores de ângulos de contato médios. Essa redução se tornou menos pronunciada ao longo do período de tempo compreendido entre 25 e 50 s, sendo que nesse último tempo as membranas de fibras ultrafinas de zeína com 0 e 15% (m/m) de extrato de bagaço de uva encapsulado demonstraram valores de ângulos de contatos médios iguais a 30,17 e 27,50°, respectivamente (Tabela 11).

Os valores mais altos de ângulo de contato médio para a membrana de fibras ultrafinas de zeína sem extrato em 25 e 50 s possivelmente ocorreram devido a presença de resíduos de aminoácidos hidrofóbicos na proteína, que diminuem a interação da mesma com a água e, conseqüentemente, tornam a membrana mais hidrofóbica (GITERU; ALI; OEY, 2021).

Em relação as membranas das fibras ultrafinas de zeína com 5, 10 e 15% (m/m) de extrato de bagaço de uva, a maior redução nos ângulos de contato (em relação ao tempo zero) provavelmente ocorreu devido à incorporação das moléculas de antocianinas, compostos altamente hidrofílicos e solúveis em água, que possibilitaram aumento da interação das membranas com a gota de água, tornando as mesmas mais hidrofílicas (OLIVEIRA FILHO et al., 2021; PRIETTO et al., 2018).

Esse fato pode ser útil para determinar a aplicação do material produzido. A interação das moléculas do extrato encapsulado com íons hidrogênio ou hidroxilas presentes no meio permite que essas membranas de fibras ultrafinas de zeína com extrato rico em antocianinas do bagaço de uva sejam empregadas em embalagens inteligentes, como sensores colorimétricos naturais responsivos ao pH, atuando, por exemplo, no monitoramento da qualidade dos alimentos (OLIVEIRA FILHO et al., 2021; PRIETTO et al., 2018).

Prietto et al. (2018) observaram comportamento semelhante de maior hidrofiliabilidade em membranas de fibras de zeína com antocianinas extraídas do repolho roxo em comparação com as membranas de fibras de zeína pura. No entanto, esses autores relataram resultados inferiores em relação ao tempo necessário, após interação com a água, para que o ângulo de contato das membranas de fibras com extrato se tornasse zero.

4.3.6. Atividade antioxidante

Avila et al. (2020) mencionam que os compostos fenólicos, como as antocianinas presentes na uva, podem ser classificados como antioxidantes primários, os quais atuam de modo a inibir as reações oxidativas e, devido a sua capacidade de eliminação de radicais livres, podem ser empregados na indústria de alimentos, por exemplo, para estender a vida útil de produtos embalados. Assim, as atividades antioxidantes do extrato de bagaço de uva não encapsulado e das fibras ultrafinas de zeína, sem e com esse extrato, frente aos radicais livres ABTS, DPPH, ON e OH estão reportadas na Tabela 12.

Tabela 12 - Atividades antioxidantes do extrato de bagaço de uva não encapsulado e encapsulado em fibras ultrafinas de zeína em diferentes concentrações frente aos radicais ABTS, DPPH, ON e OH.

Amostras *	Inibição dos radicais livres (%)**			
	ABTS	DPPH	ON	OH
Extrato não encapsulado	87,50 ± 0,10 ^a	82,07 ± 0,38 ^a	59,13 ± 0,64 ^a	45,36 ± 3,07 ^a
Fibras 0%	36,36 ± 0,60 ^e	4,91 ± 2,21 ^d	3,94 ± 2,18 ^d	nd
Fibras 5%	41,10 ± 2,31 ^d	20,18 ± 1,46 ^c	23,45 ± 1,22 ^c	8,13 ± 1,81 ^c
Fibras 10%	47,90 ± 2,19 ^c	36,38 ± 1,84 ^b	33,13 ± 3,75 ^b	11,96 ± 2,90 ^c
Fibras 15%	58,29 ± 0,25 ^b	37,94 ± 1,52 ^b	36,76 ± 3,77 ^b	20,13 ± 1,71 ^b

* Nomenclatura da amostra referente à concentração de extrato encapsulado nas fibras ultrafinas expressa em % (m/m, em zeína na solução polimérica);

** Radicais ABTS (2,2-azino-bis(3-ethylbenzo thiazoline-6-sulfonic acid) diammoninum salt); DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil); ON (óxido nítrico); OH (hidroxila);

nd = não detectado;

^{a,b} Médias seguidas de letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa entre os dados pelo teste Tukey (p < 0,05).

Nos estudos que objetivam avaliar a eficácia antioxidante de determinada amostra é recomendado o emprego de mais de um modelo *in vitro*, em razão das diferenças de cada método para avaliar a capacidade de eliminação dos radicais livres pela amostra. Assim, os ensaios frente aos radicais disponíveis no mercado, como DPPH e ABTS, são amplamente relatados na literatura para avaliar a atividade antioxidante de amostras, como produtos naturais e seus extratos e, assim, possibilitam a comparação entre resultados novos e dados já relatados (RUBERTO et al., 2007).

Outro modo de realizar a avaliação da atividade antioxidante *in vitro* é através da determinação da capacidade de eliminar as espécies reativas de oxigênio (EROS), um grupo de substâncias que contêm átomos de oxigênio

altamente reativos e com forte poder oxidante, representado pelos radicais superóxido, peróxido de hidrogênio, hidroxila, óxido nítrico, peroxila e alcóxila (CHARRIER; ANASTASIO, 2011; DUAN et al., 2007; ZHANG et al., 2019b).

Para análise que empregou o radical livre ABTS, o extrato não encapsulado apresentou capacidade de eliminação de 87,50% dos radicais livres, valor superior a todas as amostras analisadas. Esse valor também foi significativamente maior ($p < 0,05$) para esse mesmo radical em relação as fibras ultrafinas de zeína com extrato encapsulado, que apresentaram atividades antioxidantes iguais a 41,10; 47,90 e 58,29% para as concentrações de extrato iguais 5, 10 e 15% (m/m), respectivamente. As fibras sem extrato também demonstraram atividade antioxidante, eliminando, aproximadamente, 36% dos radicais livres.

A capacidade de eliminar radicais livres das fibras ultrafinas de zeína sem a presença de extrato de bagaço de uva (Fibras 0%) pode ser relacionada a presença de resíduos de aminoácidos, como arginina, alanina, histidina, leucina, metionina e valina, que apresentam atividade antioxidante tanto na forma livre como na forma de resíduo em proteínas. Além disso, a alta área superficial das fibras ultrafinas de zeína proporciona maior contato da solução de radicais livres com a estrutura das paredes das fibras, o que possivelmente favorece a eliminação desses radicais pelo material nanométrico (BRUNI et al., 2020; ZHANG; LUO; WANG, 2011).

Os dados relativos ao extrato de bagaço de uva não encapsulado são inferiores aos relatados na literatura por Iora et al. (2015) em seu estudo com bagaço de *Vitis vinifera* das variedades Merlot, Tanat e Cabernet Sauvignon, cultivadas no Brasil. Milinčić et al. (2021) também relataram melhores resultados de eliminação do radical ABTS ao avaliarem o bagaço de uva tinta Prokupac produzida na região vinícola da Sérvia.

Em relação ao radical DPPH, o extrato não encapsulado apresentou capacidade de eliminação desses radicais igual a 82,07%. As fibras ultrafinas de zeína com extrato de bagaço de uva demonstraram valores significativamente menores ($p < 0,05$), entre 20,18 a 37,94% para as fibras com 5 e 15% (m/m) de extrato de bagaço de uva encapsulado, respectivamente. Ainda, as fibras sem extrato (Fibras 0%) também exerceram pequeno efeito

sobre os radicais DPPH, eliminando aproximadamente 5% dos mesmos (Tabela 12).

Peixoto et al. (2018) relataram resultado superior para o extrato não encapsulado obtido a partir do bagaço de uva *Vitis vinifera* L. de vinho tinto produzido em uma vinícola situada em Portugal. Ruberto et al. (2007) também mencionaram melhores atividades antioxidantes para os bagaços de uvas tintas de cinco cultivares de *Vitis vinifera* L. obtidos após a produção de vinhos na Itália.

As substâncias EROS, como os radicais óxido nítrico e hidroxila, podem ser associadas a oxidação de lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos. Assim, são capazes de ocasionar a deterioração dos alimentos e, ainda, possuem relação com diversas doenças em organismos vivos, como o envelhecimento celular, a artrite reumatóide, a carcinogênese, o diabetes, as doenças coronarianas, diversas inflamações, entre outras (CHARRIER; ANASTASIO, 2011; DUAN et al., 2007).

A produção excessiva dessas moléculas pelos organismos vivos, sem a ação de um agente antioxidante, causa um desequilíbrio, provocando estresse oxidativo. Embora os organismos possuam sistemas antioxidantes para protegê-los, esses sistemas podem não ser capazes de reparar a totalidade dos danos causados. Assim, compostos naturais com atividade antioxidante, como as antocianinas, podem ajudar na proteção contra o estresse oxidativo (CHARRIER; ANASTASIO, 2011; DUAN et al., 2007; ZHANG et al., 2019b).

O óxido nítrico é vital para o funcionamento de organismos vivos, pois está associado a manutenção da homeostase dos mesmos, porém, quando esse radical está presente em concentrações elevadas (estresse oxidativo) pode desencadear certas doenças, como processos inflamatórios exacerbados (APAK et al., 2016; YEN; LAI; CHOU, 2001).

O extrato de bagaço de uva não encapsulado foi capaz de eliminar 59,13% dos radicais livres ON. As fibras ultrafinas de zeína incorporadas com extrato também apresentaram efeito sob esse radical livre, eliminando de 23,45 a 36,76% para as fibras com concentrações de extrato iguais 5 e 15% (m/m), respectivamente. Ainda que significativamente menor ($p < 0,05$), as fibras

ultrafinas sem extrato também apresentaram atividade antioxidante frente a esses radicais (3,94%) (Tabela 12).

A outra substância EROS analisada, o radical hidroxila, em geral, é o radical mais reativo e nocivo para os organismos vivos, podendo causar danos ao DNA dos mesmos. Essa EROS é gerada quando a água é exposta a radiação ionizante ou pela reação de Fenton (quando há íons ferrosos em presença de peróxido de hidrogênio) (CHENG; JEN; TSAI, 2002).

Para os radicais livres OH, as fibras ultrafinas de zeína sem extrato não apresentaram atividade antioxidante detectável, as fibras com 5 e 10% (m/m) de extrato de bagaço de uva demonstraram a mesma capacidade de eliminação desses radicais e as fibras ultrafinas com 15% de extrato exibiram o melhor resultado (20,13%) entre os materiais encapsulados. Nessa mesma análise, o extrato de bagaço de uva não encapsulado capturou cerca de 45% dos radicais OH disponíveis no meio (Tabela 12).

Embora menos frequente na literatura estudos que avaliem a atividade antioxidante de extrato de bagaço de uva não encapsulado pelos métodos dos radicais ON e OH, os dados obtidos no presente trabalho demonstraram o potencial do extrato para eliminar radicais EROS. Esses resultados são importantes em razão das espécies ON e OH serem responsáveis por causar doenças nos organismos vivos a partir de estresse oxidativo e por estarem relacionados com a oxidação lipídica nos alimentos, conforme supracitado.

Ainda, é importante mencionar que, embora em termos percentuais, tanto o extrato não encapsulado quanto as fibras ultrafinas de zeína com extrato (em todas as concentrações) tenham apresentado menores atividades antioxidantes em relação aos radicais ON e OH, comparativamente, ao ABTS e DPPH, as duas primeiras espécies são moléculas importantes para a manutenção do adequado funcionamento de organismos vivos e sua completa inibição seria prejudicial. Assim, menores taxas de captura desses radicais possivelmente são suficientes para reduzir a concentração das espécies oxidantes em excesso e, conseqüentemente, controlar o estresse oxidativo, protegendo as células de danos que poderiam ser causados por esses radicais.

Não foram encontrados dados já publicados na literatura que reportassem a captura dos quatro radicais livres aqui estudados por fibras

ultrafinas de zeína incorporadas com extrato de bagaço de uva de vinho tinto, rico em antocianinas.

Porém, ao comparar-se os dados da Tabela 12, observou-se que o extrato de bagaço de uva não encapsulado demonstrou maior capacidade de eliminação, frente ao material encapsulado, para todos os radicais livres avaliados. A menor atividade antioxidante dos materiais encapsulados provavelmente ocorreu em função da liberação incompleta do extrato de bagaço de uva a partir das fibras ultrafinas de zeína, visto que a metodologia utilizada mensurou apenas o ponto inicial do fenômeno de difusão, que provavelmente representa a liberação parcial dos compostos bioativos do extrato. Outro fator que também pode ter influenciado na discrepância observada é a menor concentração de extrato encapsulado que está presente nas fibras ultrafinas em relação à concentração de extrato livre.

Contudo, pode-se observar que o processo de nanoencapsulação por *electrospinning* manteve a atividade antioxidante do extrato frente aos radicais ABTS, DPPH, ON e OH, o que pode ser considerado uma alternativa promissora para preservar as moléculas bioativas existentes no extrato, como as antocianinas, contra fatores ambientais (como luminosidade, umidade, ataques enzimáticos, oxigênio, entre outros) e aumentar a estabilidade química e térmica das moléculas, ao mesmo tempo em que mantém suas funções biológicas, como a atividade antioxidante. Visto que, em contraste, o extrato não encapsulado poderia ser facilmente degradado no ambiente. E, sua liberação total e pontual no meio, possivelmente não seria capaz de proteger os alimentos de processos oxidativos que ocorrerão ao decorrer do período de armazenamento dos mesmos.

Ainda, embora as fibras ultrafinas de zeína com extrato de bagaço de uva apresentem menores atividades antioxidantes (Tabela 12), o percentual necessário de inibição de radicais livres deve estar associado a aplicação em que serão utilizadas as nanoestruturas. Assim, as capacidades de captura de radicais livres relatadas para as fibras ultrafinas de zeína com extrato de bagaço de uva podem ser suficientes para controlar processos oxidativos que ocorrem em alguns alimentos, por exemplo, com vida útil de curto prazo. Além disso, considerando-se uma liberação inicial e parcial dos compostos bioativos encapsulados, essas nanoestruturas possivelmente também possam ser

aplicadas a sistemas que necessitem de liberação lenta e sustentada de compostos antioxidantes, como alimentos armazenados por longos períodos de tempo, devido sua vida útil de longo prazo.

Tais fatos indicam potencial aplicação para as fibras ultrafinas de zeína com extrato de bagaço de uva como emissoras de compostos antioxidantes, que visem estender vida útil de alimentos, como cárneos e pescado, em embalagens ativas antioxidantes.

4.3.7. Atividade antimicrobiana

A contaminação dos alimentos por microrganismos causa perdas econômicas, além de ser responsável pela transmissão de doenças aos consumidores, podendo levar a casos graves, com hospitalizações e mortes. Aliado a esses fatos, atualmente, diversas bactérias apresentam resistência aos antibióticos de uso regular, evidenciando a necessidade de pesquisas na área para encontrar novos compostos com atividade antimicrobiana (MA et al., 2019).

As moléculas de antocianinas podem inibir o crescimento bacteriano através de mecanismos de interação com a membrana celular desses microrganismos (por exemplo, por ligações de hidrogênio ou interações hidrofóbicas), alterando a permeabilidade seletiva da membrana ou causando a ruptura da mesma, o que provoca extravasamento de componentes intracelulares, como enzimas e íons reguladores da pressão osmótica (Na^+ e K^+). Ainda, esses danos ocasionados às células interferem e modificam funções metabólicas das bactérias, como as reações envolvidas no processo respiratório e síntese de proteínas. Dependendo da intensidade do dano causado, além de inibir o crescimento, as antocianinas podem apresentar efeito bactericida (DENG et al., 2021; GONG et al., 2021; MA et al., 2019; YU; AHMEDNA, 2013).

O extrato de bagaço de uva, rico em compostos fenólicos, como as antocianinas, apresentou halos de inibição, pela metodologia de difusão em ágar (DA), frente as bactérias *E. coli* e *S. aureus* na forma não encapsulada, além de também ter sido observado pequeno efeito das fibras ultrafinas de zeína com extrato encapsulado para a *E. coli*, conforme a Tabela 13.

Tabela 13 - Halos de inibição por difusão em ágar frente as bactérias *E. coli* e *S. aureus* para o extrato de bagaço de uva não encapsulado e encapsulado em fibras ultrafinas de zeína em diferentes concentrações

Amostras	Halo de inibição (mm)	
	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>
Extrato não encapsulado	5	6
Fibras 0% *	nd	nd
Fibras 5% *	nd	nd
Fibras 10% *	2	nd
Fibras 15% *	4	nd

* Nomenclatura da amostra referente à concentração de extrato encapsulado nas fibras ultrafinas expressa em % (m/m, em zeína na solução polimérica);

nd = não detectado.

Em relação ao extrato não encapsulado, o menor halo de inibição para bactéria Gram negativa (*E. coli*) possivelmente ocorreu em razão de a mesma possuir uma membrana celular em dupla camada (possui uma membrana externa) e fortemente hidrofóbica, que a torna mais resistente a agentes antimicrobianos, quando comparada a membrana simples da estrutura Gram positiva (*S. aureus*) (SMITH-PALMER; STEWART; FYFE, 1998).

Os dados obtidos para o extrato não encapsulado são inferiores aos reportados por Oliveira et al. (2013), que também utilizaram a análise de difusão em ágar, e relatam maiores halos de inibição tanto para a bactéria *E. coli* (7 – 10 mm) como para a *S. aureus* (9 – 12 mm) em seu estudo sobre os compostos dos bagaços das uvas Merlot e Syrah (ambas *Vitis Vinifera*) obtidos de vinho tinto (produzidos no Brasil) e extraídos por fluido supercrítico (gás carbônico).

Resultado semelhante para *S. aureus* e inferior para a *E. coli* (sem halo de inibição) foram relatados em um estudo realizado por Xu et al. (2016) sobre extrato do bagaço de vinho tinto da uva Chambourcin (híbrida) cultivada na

Virginia e extraído com acetona 80% (v/v, em água destilada). Esses pesquisadores avaliaram também outra cultivar de uva tinta da mesma localidade, a Cabernet Franc (*Vitis Vinifera*), que apresentou atividade antimicrobiana superior em relação aos resultados obtidos no presente trabalho para *S. aureus* (12 mm) e inferior para a *E. coli* (sem halo de inibição).

Em relação a atividade antimicrobiana das fibras ultrafinas de zeína com extrato de bagaço de uva encapsulado por difusão em ágar, somente as fibras com 10 e 15% (m/m) de extrato apresentaram halo de inibição frente a bactéria *E. coli*. Esse comportamento possivelmente ocorreu em função de algumas variáveis, como a difusão dos compostos do extrato a partir das fibras de zeína, a migração desses compostos antimicrobianos pelo ágar e a interação dos mesmos com os microrganismos terem sido mais adequadas em relação a bactéria *E. coli* quando comparada a *S. aureus*.

Ainda, os menores halos de inibição das fibras ultrafinas de zeína com extrato de bagaço de uva, quando comparados ao extrato não encapsulado, possivelmente estão associados à maior facilidade de difusão pelo ágar que este último apresenta, dado que não está encapsulado em uma matriz polimérica. Todavia, o extrato não encapsulado possivelmente será degradado com maior facilidade quando exposto a fatores ambientais (luminosidade, oxigênio, ataque enzimático, entre outros), visto que não dispõem de um material de parede para protegê-lo.

Outrossim, a metodologia de difusão em ágar é um teste qualitativo de avaliação inicial da atividade antimicrobiana de uma substância contra determinada cepa, sendo necessária posterior análise quantitativa pelos métodos de concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) (OLIVEIRA et al., 2013; XU et al., 2016).

Assim, a CIM e a CBM frente as bactérias *E. coli* e *S. aureus* para o extrato de bagaço de uva na forma não encapsulada e encapsulada em fibras ultrafinas de zeína estão reportados na Tabela 14.

Tabela 14 – CIM e CBM frente as bactérias *E. coli* e *S. aureus* para o extrato de bagaço de uva não encapsulado e encapsulado em fibras ultrafinas de zeína em diferentes concentrações.

Amostras	CIM **		CBM **	
	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>
Extrato não encapsulado	4,0	16,0	nd	16,0
Fibras 0% *	nd	nd	nd	nd
Fibras 5% *	nd	nd	nd	nd
Fibras 10% *	4,0	3,2	nd	nd
Fibras 15% *	4,8	3,0	nd	nd

* Nomenclatura da amostra referente à concentração de extrato encapsulado nas fibras ultrafinas expressa em % (m/m, em zeína na solução polimérica);

** CIM = Concentração Inibitória Mínima, em mg.mL⁻¹; CBM = Concentração Bactericida Mínima, em mg.mL⁻¹;

nd = não detectado.

O extrato de bagaço de uva não encapsulado apresentou atividade antimicrobiana para as duas bactérias utilizadas, sendo as CIM observadas iguais a 4,0 e 16,0 mg.mL⁻¹ para a *E. coli* e *S. aureus*, respectivamente (Tabela 14).

Silva et al. (2018) avaliaram bagaços de vinhos tintos das uvas portuguesas Touriga Nacional e Preto Martinho (ambas *Vitis vinifera*). Os dados reportados mencionaram CIM inferior, igual a 0,075 mg.mL⁻¹ para o extrato do bagaço da uva Preto Martinho em relação ao microrganismo *S. aureus* e sem efeito inibitório para a outra casta em relação a esse microrganismo. Ainda, ambos os resíduos da indústria vinícola não apresentaram atividade antimicrobiana frente a *E. coli*.

A cultura de *S. aureus* também foi mais susceptível ao extrato de bagaço das uvas Cabernet Franc (*Vitis Vinifera*) e Chambourcin (híbrida) cultivadas na Virginia, demonstrando CIM igual a 75 mg.mL⁻¹. Conforme

também relatado por Xu et al. (2016), ambos os extratos não apresentaram efeito inibitório sob a *E. coli*. De modo análogo, o trabalho de Peixoto et al. (2018) utilizando bagaço de vinho tinto de uvas (*Vitis vinifera*) cultivadas em Portugal, reportou valores de CIM igual a 20 mg.mL⁻¹ para *S. aureus* e maior que 20 mg.mL⁻¹ de bagaço de uva para a bactéria *E. coli*.

Diversos fatores dificultam a comparação dos resultados obtidos com os dados da literatura em relação as análises CIM e CBM, bem como em relação a análise de DA, em virtude das inúmeras variáveis envolvidas nas análises, como a cultivar de uva que originou o bagaço, a composição e a concentração do extrato utilizado, o sinergismo entre os compostos presentes no extrato, o método empregado para mensurar o halo de inibição, as concentrações escolhidas para avaliar CIM e CBM, a resistência das cepas bacterianas utilizadas, as condições de cultivo proporcionadas aos microrganismos, entre outros.

Embora a CIM (16 mg.mL⁻¹) para *S. aureus* seja superior em relação a outra bactéria analisada e em relação a alguns dados da literatura, essa concentração de extrato também demonstrou efeito bactericida, sendo a única concentração capaz de matar os microrganismos avaliados entre todas as amostras testadas (Tabela 14). Esse comportamento possivelmente ocorreu em virtude de diferenças na membrana celular entre as classes de bactérias, que tornam a *S. aureus* mais susceptível a compostos antimicrobianos do extrato de bagaço de uva, conforme supracitado.

As fibras ultrafinas de zeína com 10 e 15% (m/m) de extrato de bagaço de uva também exibiram menores CIM para a cepa Gram positiva (*S. aureus*) em comparação com a Gram negativa (*E. coli*). Todavia, nenhuma concentração de extrato encapsulado apresentou efeito bactericida.

Além disso, tanto na metodologia de CIM, como CBM, nota-se comportamento semelhante ao observado na análise de DA, ao comparar-se as atividades antimicrobianas do extrato não encapsulado e das fibras ultrafinas de zeína com extrato (Tabela 14). Essas discrepâncias possivelmente podem ter ocorrido em razão das mesmas justificativas mencionadas na seção 4.3.6, que trata sobre atividade antioxidante. Uma vez que os dados apresentados podem representar uma liberação inicial e parcial dos compostos bioativos presentes no extrato a partir das estruturas das fibras, resultando em

menor inibição do crescimento dos microrganismos ou mesmo ausência de efeito bactericida em relação aos mesmos.

Ainda, a atividade antimicrobiana que se deseja obter com as fibras ultrafinas de zeína e extrato de bagaço de uva deve estar associada as aplicações nas quais as mesmas serão utilizadas. Uma vez que a atividade antimicrobiana obtida (Tabela 14) com essas estruturas pode ser suficiente para controlar ou inibir o crescimento de microrganismos presentes em determinados alimentos.

Assim, considerando-se o tempo utilizado durante a execução das análises e que possivelmente os dados obtidos mensuram apenas a fase inicial do fenômeno de difusão dos compostos bioativos do extrato de bagaço de uva presentes nas fibras ultrafinas de zeína. Há possibilidade dessas estruturas serem utilizadas em sistemas que visem manter uma liberação gradual e prolongada dos compostos bioativos com atividade antimicrobiana, controlando, por exemplo, o crescimento de microrganismos em alimentos com prazo de vida útil prolongado.

Contudo, pode-se observar que as fibras ultrafinas de zeína com extrato de bagaço de uva encapsulado foram capazes de manter o efeito bacteriostático do extrato não encapsulado, inibindo o crescimento das bactérias *E. coli* e *S. aureus*. Esse comportamento sugere que tais fibras apresentam potencial para serem empregadas pela indústria de alimentos como emissoras de compostos antimicrobianos em embalagens ativas antimicrobianas, que busquem preservar e estender a vida útil de alimentos embalados, como produtos cárneos e pescado.

5. Considerações finais

O extrato de bagaço da uva Bordô (*Vitis Labrusca* L.) apresentou moléculas de antocianinas em sua composição, sendo a malvidina o principal composto dessa classe. Além disso, as antocianinas presentes no extrato demonstraram capacidade de mudança de cor responsiva a variação de pH do meio, atuando como corante natural.

As fibras ultrafinas de zeína incorporadas com 0, 5, 10 e 15% (m/m) de extrato de bagaço de uva, produzidas pela técnica de *electrospinning*, apresentaram morfologia lisa, homogênea, contínua, cilíndrica e sem *beads*. Ainda, todas as fibras com extrato incorporado demonstraram valores de eficiência de encapsulação acima de 85% e estabilidade térmica até, aproximadamente, 130 °C.

Os espectros de FTIR indicaram que as interações extrato-proteína foram do tipo interações intermoleculares, sem a ocorrência de reações químicas. Além disso, encapsulação do extrato de bagaço de uva foi capaz de tornar a membrana de fibras ultrafinas de zeína com extrato mais hidrofílicas em relação as membranas de fibras de zeína sem extrato.

O extrato de bagaço de uva não encapsulado apresentou capacidade de eliminar os radicais livres ABTS, DPPH, ON e OH. Todas as fibras ultrafinas de zeína com extrato encapsulado também demonstraram atividade antioxidante frente a esses quatro tipos de radicais.

Na análise antimicrobiana por difusão em ágar, o extrato de bagaço de uva não encapsulado apresentou halos de inibição de crescimento para as bactérias Gram negativa *E. coli* e Gram positiva *S. aureus*, sendo mais efetivo para a primeira. As fibras ultrafinas de zeína com 10 e 15% (m/m) de extrato demonstraram pequenos halos de inibição para a bactéria Gram negativa, sem efeito para o outro microrganismo.

Além disso, as fibras ultrafinas de zeína com 10 e 15% (m/m) de extrato exibiram efeito inibitório em relação aos microrganismos *E. coli* e *S. aureus*. O extrato não encapsulado além de também ser inibitório para ambos os microrganismos citados, expressou efeito bactericida frente ao *S. aureus*.

Assim, as fibras ultrafinas de zeína com extrato de bagaço de uva encapsulado mantiveram as atividades antioxidante e antimicrobiana do extrato

na forma não encapsulada. Ainda, esse mesmo extrato, apresentou capacidade de mudança de cor em resposta a variação do pH do meio. Tais fatos indicam potencial aplicação para as fibras ultrafinas de zeína com extrato de bagaço de uva Bordô (*Vitis Labrusca* L.), como sistema emissor de compostos bioativos antioxidantes e antimicrobianos (que objetivem estender vida útil do alimento) e sensor de pH (que vise indicar o frescor do alimento) para constituir uma embalagem ativa e inteligente aplicada a indústria de alimentos.

Estudos futuros com avaliações destes materiais encapsulados *in situ* na embalagem ativa e inteligente são importantes, por exemplo, para preservação e monitoramento de alimentos ricos em proteínas e altamente perecíveis, como cárneos e pescados.

6. Referências bibliográficas

AGGARWAL, A.; LANGOWSKI, H. C. Packaging functions and their role in technical development of food packaging systems: Functional equivalence in yoghurt packaging. **Procedia CIRP**, v. 90, p. 405–410, 2020.

AHMED, G. H. G.; FERNÁNDEZ-GONZÁLEZ, A.; GARCÍA, M. E. D. Nano-encapsulation of grape and apple pomace phenolic extract in chitosan and soy protein via nanoemulsification. **Food Hydrocolloids**, v. 108, 105806, 2020.

ALI, S.; KHATRI Z.; OH, K.; KIM, I.; KIM, S. Zein/cellulose acetate hybrid nanofibers: Electrospinning and characterization. **Macromolecular Research**, v. 22, p. 971–977, 2014.

ALIZADEH-SANI, M.; MOHAMMADIAN, E.; RHIM, J.; JAFARI, S. pH-sensitive (halochromic) smart packaging films based on natural food colorants for the monitoring of food quality and safety. **Trends in Food Science and Technology**, v. 105, p. 93–144, 2020.

ALIZADEH SANI, M.; TAVASSOLI, M.; SALIM, S.; AZIZI-LALADADI, M.; MCCLEMENTS, D. Development of green halochromic smart and active packaging materials: TiO₂ nanoparticle- and anthocyanin-loaded gelatin/κ-carrageenan films. **Food Hydrocolloids**, v. 124, 107324, 2022.

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.

ALTAN, A.; ÇAYIR, Ö. Encapsulation of carvacrol into ultrafine fibrous zein films via electrospinning for active packaging. **Food Packaging and Shelf Life**, v. 26, 100581, 2020.

ALVAREZ-SUAREZ, J.; CUADRADO, C.; REDONDO, I.; GIAMPIERI, F.; GAONZ´LEZ-PARAMÁS, A.; SANTOS-BUELGA, C. Novel approaches in anthocyanin research - Plant fortification and bioavailability issues. **Trends in Food Science and Technology**, v. 117, p. 92–105, 2021.

ANANGA, A.; GEORGIEV, V.; OCHIENG, J.; PHILLS, B.; TSOLOVA, V. The

Mediterranean Genetic Code - Grapevine and Olive. **The Mediterranean Genetic Code - Grapevine and Olive**, p. 247 - 287, 2013.

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

APAK, R.; OZYUREK, M.; GUÇLU, K.; ÇAPANOGU, E. Antioxidant activity/capacity measurement. 3. Reactive oxygen and nitrogen species (ROS/RNS) scavenging assays, oxidative stress biomarkers, and chromatographic/chemometric assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 64, p. 1046–1070, 2016.

AVILA, L.; FONTES, M.; ZAVAREZE, E.; MORAES, C.; MORAIS, M.; ROSA, G. Recovery of bioactive compounds from jaboticaba peels and application into zein ultrafine fibers produced by electrospinning. **Polymers**, v. 12, p. 1–19, 2020.

AYDOGDU, A.; SUMNU, G.; SAHIN, S. Fabrication of gallic acid loaded Hydroxypropyl methylcellulose nanofibers by electrospinning technique as active packaging material. **Carbohydrate Polymers**, v. 208, p. 241–250, 2019.

BECERRIL, R.; NERÍN, C.; SILVA, F. Bring some colour to your package: Freshness indicators based on anthocyanin extracts. **Trends in Food Science and Technology**, v. 111, p. 495–505, 2021.

BELWAL, T.; SINGH, G.; JEANDET, P.; PANDEY, A.; GIRI, L.; RAMOLA, S.; BHATT, I.; VENSKUTONIS, P.; GEORGIEV, M.; CLÉMENT, C.; LUO, Z. Anthocyanins, multi-functional natural products of industrial relevance: Recent biotechnological advances. **Biotechnology Advances**, v. 43, 107600, 2020.

BHARDWAJ, N.; KUNDU, S. C. Electrospinning: A fascinating fiber fabrication technique. **Biotechnology Advances**, v. 28, p. 325–347, 2010.

BHARGAVA, N.; SHARANAGAT, V.; MOR, R.; KUMAR, K. Active and intelligent biodegradable packaging films using food and food waste-derived

bioactive compounds: A review. **Trends in Food Science and Technology**, v. 105, p. 385–401, 2020.

BÖHMER-MAAS, B.; FONSECA, L.; OTERO, D.; ZAVAREZE, E.; ZAMBIAZI, R. Photocatalytic zein-TiO₂ nanofibers as ethylene absorbers for storage of cherry tomatoes. **Food Packaging and Shelf Life**, v. 24, 100508, 2020.

BONFIGLI, M.; GODOY, E.; REINHEIMER, M.; SCENNA, N. Comparison between conventional and ultrasound-assisted techniques for extraction of anthocyanins from grape pomace. Experimental results and mathematical modeling. **Journal of Food Engineering**, v. 207, p. 56–72, 2017.

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

BRUNI, G.; ACUNHA, T.; OLIVEIRA, J.; FONSECA, L.; SILVA, F.; GUIMARÃES, V.; ZAVAREZE, E. Electrospun protein fibers loaded with yerba mate extract for bioactive release in food packaging. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 100, p. 3341–3350, 2020.

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

ÇANGA, E.; DUDAK, F. Characterization of cellulose acetate/gum Arabic fibers loaded with extract of *Viburnum opulus* L. fruit. **LWT - Food Science and Technology**, v. 110, p. 247–254, 2019.

CASTAÑEDA-OVANDO, A.; PACHECO-HERNÁNDEZ, M.; PÁEZ-HERNÁNDEZ, M.; RODRÍGUEZ, J.; GÁLÁN-VIDAL, C. Chemical studies of anthocyanins: A review. **Food Chemistry**, v. 113, p. 859–871, 2009.

CETINKAYA, T.; WIJAYA, W.; ALTAY, F.; CEYLAN, Z. Fabrication and characterization of zein nanofibers integrated with gold nanospheres. **LWT - Food Science and Technology**, v. 155, 112976, 2022.

CHARRIER, J.; ANASTASIO, C. Impacts of antioxidants on hydroxyl radical production from individual and mixed transition metals in a surrogate lung fluid. **Atmospheric Environment**, v. 45, p. 7555–7562, 2011.

CHEN, H.; ZHANG, M.; BHANDARI, B.; YANG, C.. Novel pH-sensitive films containing curcumin and anthocyanins to monitor fish freshness. **Food Hydrocolloids**, v. 100, 105438, 2020a.

CHEN, S.; WU, M.; LU, P.; GAO, L.; YAN, S.; WANG, S. Development of pH indicator and antimicrobial cellulose nanofibre packaging film based on purple sweet potato anthocyanin and oregano essential oil. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 149, p. 271–280, 2020b.

CHENG, F.; JEN, J.; TSAI, T. H. Hydroxyl radical in living systems and its separation methods. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 781, p. 481–496, 2002.

CHENG, H.; XU, H.; MCCLEMENTS, D.; CHEN, L.; JIAO, A.; TIAN, Y.; MIAO, M.; JIN, Z. Recent advances in intelligent food packaging materials: Principles, preparation and applications. **Food Chemistry**, v. 375, 131738, 2022a.

CHENG, H.; WU, W.; CHEN, J.; PAN, H.; XU, E.; CHEN, S.; YE, X.; CHEN, J. Establishment of anthocyanin fingerprint in black wolfberry fruit for quality and geographical origin identification. **LWT - Food Science and Technology**, v. 157, 113080, 2022b.

CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute. Manual de Padrões para Teste de sensibilidade a antimicrobianos por disco-difusão: Norma aprovada, 2015. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/servicos/audite/manuais/clsi/clsi_OPASM2-A8.pdf. Acesso: 29/01/2019.

COELHO, S.; ESTEVINHO, B.; ROCHA, F. Encapsulation in food industry with emerging electrohydrodynamic techniques: Electrospinning and electrospraying – A review. **Food Chemistry**, v. 339, 127850, 2021.

COLUSSI, R.; SILVA, W.; BIDUSKI, B.; HALAL, S.; ZAVAREZE, E.; DIAS, A.

Postharvest quality and antioxidant activity extension of strawberry fruit using allyl isothiocyanate encapsulated by electrospun zein ultrafine fibers. **LWT - Food Science and Technology**, v. 143, 111087, 2021.

DENG, H.; ZHU, J.; TONG, Y.; KONG, Y.; TAN, C.; WANG, M.; WAN, M.; MENG, X. Antibacterial characteristics and mechanisms of action of *Aronia melanocarpa* anthocyanins against *Escherichia coli*. **LWT - Food Science and Technology**, v. 150, 112018, 2021.

DENG, L.; ZHANG, X.; LI, Y.; QUE, F.; KANG, X.; LIU, Y.; FENG, F.; ZHANG, H. Characterization of gelatin/zein nanofibers by hybrid electrospinning. **Food Hydrocolloids**, v. 75, p. 72–80, 2018.

DENG, L.; LI, Y.; FENG, F.; WU, D.; ZHANG, H. Encapsulation of allopurinol by glucose cross-linked gelatin/zein nanofibers: Characterization and release behavior. **Food Hydrocolloids**, v. 94, p. 574–584, 2019.

DONG, X.; ZHU, C.; HUANG, G.; XIAO, J. Fractionation and structural characterization of polysaccharides derived from red grape pomace. **Process Biochemistry**, v. 109, p. 37–45, 2021.

DRAGO, E.; FRANCO, P.; CAMPARDELLI, R.; MARCO, I.; PEREGO, P. Zein electrospun fibers purification and vanillin impregnation in a one-step supercritical process to produce safe active packaging. **Food Hydrocolloids**, v. 122, 107082, 2022.

DREVELEGKA, I.; GOULA, A. Recovery of grape pomace phenolic compounds through optimized extraction and adsorption processes. **Chemical Engineering and Processing: Process Intensification**, v. 149, 107845, 2020.

DUAN, M.; YU, S.; SUN, J.; JIANG, H.; ZHAO, J.; TONG, C.; HU, Y.; PANG, J.; WU, C. Development and characterization of electrospun nanofibers based on pullulan/chitin nanofibers containing curcumin and anthocyanins for active-intelligent food packaging. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 187, p. 332–340, 2021.

DUAN, X.; JIANG, Y.; SU, X.; ZHANG, Z.; SHI, J.. Antioxidant properties of

anthocyanins extracted from litchi (*Litchi chinensis* Sonn.) fruit pericarp tissues in relation to their role in the pericarp browning. **Food Chemistry**, v. 101, p. 1365–1371, 2007.

ECHEGOYEN, Y.; FABRA, M.; CASTRO-MAYORGA, J.; CHERPINSKI, A.; LAGARON, J. High throughput electro-hydrodynamic processing in food encapsulation and food packaging applications: Viewpoint. **Trends in Food Science and Technology**, v. 60, p. 71–79, 2017.

EVANGELHO, J.; CRIZEL, R.; CHAVES, F.; PRIETTO, L.; PINTO, V.; MIRANDA, M.; DIAS, A.; ZAVAREZE, E. Thermal and irradiation resistance of folic acid encapsulated in zein ultrafine fibers or nanocapsules produced by electrospinning and electrospraying. **Food Research International**, v. 124, p. 137–146, 2019.

FEI, P.; ZHENG, F.; ZHENG, S.; CHEN, Q.; HU, Y.; CAI, J. Acylation of blueberry anthocyanins with maleic acid: Improvement of the stability and its application potential in intelligent color indicator packing materials. **Dyes and Pigments**, v. 184, 108852, 2021.

FIROUZ, M.; MOHI-ALDEN, K.; OMID, M. A critical review on intelligent and active packaging in the food industry: Research and development. **Food Research International**, v. 141, 110113, 2021.

FLÓREZ, M.; GUERRA-RODRÍGUEZ, E.; CAZÓN, P.; VÁZQUEZ, M. Chitosan for food packaging: Recent advances in active and intelligent films. **Food Hydrocolloids**, v. 124, 107328, 2022.

FONSECA, L.; CRUXEN, C.; BRUNI, G.; FIORENTINI, A.; ZAVAREZE, E.; LIM, L.; DIAS, A. Development of antimicrobial and antioxidant electrospun soluble potato starch nanofibers loaded with carvacrol. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 139, p. 1182–1190, 2019.

FORATO, L.; BICUDO, T.; COLNAGO, L. Conformation of α Zeins in Solid State by Fourier Transform IR. **Biopolymers - Biospectroscopy Section**, v. 72, p. 421–426, 2003.

FRANCIS, F. J. **Anthocyanins As Food Colors: Analysis of Anthocyanins**. ACADEMIC PRESS, INC., p. 181-207, 1982.

GARAVAND, F.; RAHAEE, S.; VAHEDIKIA, N.; JAFARI, S.; Different techniques for extraction and micro/nanoencapsulation of saffron bioactive ingredients. **Trends in Food Science and Technology**, v. 89, p. 26–44, 2019.

GARAVAND, F.; JALAI-JIVAN, M.; ASSADPOUR, E.; JAFARI, S. Encapsulation of phenolic compounds within nano/microemulsion systems: A review. **Food Chemistry**, v. 364, 130376, 2021.

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.

GITERU, S.; ALI, M.; OEY, I. Recent progress in understanding fundamental interactions and applications of zein. **Food Hydrocolloids**, v. 120, 106948, 2021.

GLUSAC, J.; FISHMAN, A. Enzymatic and chemical modification of zein for food application. **Trends in Food Science and Technology**, v. 112, p. 507–517, 2021.

GÓMEZ-ESTACA, J.; LOPEZ-DE-DICASTILLO, C.; HERNÁNDEZ-MUNOZ, P.; CATALÁ, R.; GAVARA, R.. Advances in antioxidant active food packaging. **Trends in Food Science and Technology**, v. 35, p. 42–51, 2014.

GONG, S.; FEI, P.; SUN, Q.; GUO, L.; JIANG, L.; DOU, K.; BI, X.; YUN, X. Action mode of cranberry anthocyanin on physiological and morphological properties of *Staphylococcus aureus* and its application in cooked meat. **Food Microbiology**, v. 94, 103632, 2021.

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

HANANI, Z.; YEE, F.; NOR-KHAIZURA, M. Effect of pomegranate (*Punica*

granatum L.) peel powder on the antioxidant and antimicrobial properties of fish gelatin films as active packaging. **Food Hydrocolloids**, v. 89, p. 253–259, 2019.

HORUZ, T.; BELIBAĞLI, K. Nanoencapsulation of carotenoids extracted from tomato peels into zein fibers by electrospinning. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 99, p. 759–766, 2019.

IORA, S.; MACIEL, G.; ZIELINSKI, A.; SILVA, M.; PONTES, P.; HAMINIUK, C.; GRANATO, D.; Evaluation of the bioactive compounds and the antioxidant capacity of grape pomace. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 50, p. 62–69, 2015.

KALPANA, S.; PRIYADARSHINI, S.; LEENA, M.; MOSES, J.; ANANDHARAMAKRISHNAN, C. Intelligent packaging: Trends and applications in food systems. **Trends in Food Science and Technology**, v. 93, p. 145–157, 2019.

KAMMERER, D. CLAUS, A.; CARLE, R.; SCHIEBER, A. Polyphenol screening of pomace from red and white grape varieties (*Vitis vinifera* L.) by HPLC-DAD-MS/MS. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 4360–4367, 2004.

KASAAI, M. Zein and zein -based nano-materials for food and nutrition applications: A review. **Trends in Food Science and Technology**, v. 79, p. 184–197, 2018.

KIM, H.; ROY, S.; RHIM, J. Gelatin/agar-based color-indicator film integrated with *Clitoria ternatea* flower anthocyanin and zinc oxide nanoparticles for monitoring freshness of shrimp. **Food Hydrocolloids**, v. 124, 107294, 2022.

KUAI, L.; LIU, F.; CHIOU, B.; AVENA-BUSTILLOS, R.; MCHUGH, T.; ZHONG, F. Controlled release of antioxidants from active food packaging: A review. **Food Hydrocolloids**, v. 120, 106992, 2021.

LATOS-BROZIO, M.; MASEK, A. The application of natural food colorants as indicator substances in intelligent biodegradable packaging materials. **Food**

and Chemical Toxicology, v. 135, 110975, 2020.

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

LI, L.; WANG, H.; CHEN, M.; JIANG, S.; CHENG, J.; LI, X.; ZHANG, M.; JIANG, S. Gelatin/zein fiber mats encapsulated with resveratrol: Kinetics, antibacterial activity and application for pork preservation. **Food Hydrocolloids**, v. 101, 105577, 2020.

LI, M.; YU, H.; XIE, Y.; GUO, Y.; CHENG, Y.; QIAN, H.; YAO, W. Fabrication of eugenol loaded gelatin nanofibers by electrospinning technique as active packaging material. **LWT - Food Science and Technology**, v. 139, 110800, 2021a.

LI, T.; LIU, Y.; QIN, Q.; ZHAO, L.; WANG, Y.; WU, X.; LIAO, X. Development of electrospun films enriched with ethyl lauroyl arginate as novel antimicrobial food packaging materials for fresh strawberry preservation. **Food Control**, v. 130, 108371, 2021b.

MA, Y.; DING, S.; FEI, Y.; LIU, G.; JANG, H.; FANG, J. Antimicrobial activity of anthocyanins and catechins against foodborne pathogens *Escherichia coli* and *Salmonella*. **Food Control**, v. 106, 106712, 2019.

MEHRAN, M.; MASOUM, S.; MEMARZADEH, M. Improvement of thermal stability and antioxidant activity of anthocyanins of *Echium amoenum* petal using maltodextrin/modified starch combination as wall material. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 148, p. 768–776, 2020.

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

MERZ, B.; CAPELLO, C.; LEANDRO, G.; MORITZ, D.; MONTEIRO, A.; VALANCIA, G. A novel colorimetric indicator film based on chitosan, polyvinyl alcohol and anthocyanins from jambolan (*Syzygium cumini*) fruit for monitoring shrimp freshness. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.

153, p. 625–632, 2020.

MILINČIĆ, D.; STANISAVLJEVIĆ, N.; KOSTIC, A.; BAJIC, S.; KOJIC, M.; GASIC, U.; BARAC, M.; STANOJEVIC, S.; TESIC, Z.; PESIC, M. Phenolic compounds and biopotential of grape pomace extracts from Prokupac red grape variety. **LWT - Food Science and Technology**, v. 138, 110739, 2021.

MONTEIRO, G.; MINATEL, I.; PIMENTEL JUNIOR, A.; GOMEZ-GOMEZ, H.; CAMARGO, J.; DIAMANTE, M.; BASÍLIO, L.; TECCHIO, M.; LIMA, G. Bioactive compounds and antioxidant capacity of grape pomace flours. **LWT - Food Science and Technology**, v. 135, 110053, 2021.

MOREIRA, J.; TERRA, A.; COSTA, J.; MORAIS, M. Development of pH indicator from PLA/PEO ultrafine fibers containing pigment of microalgae origin. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 118, p. 1855–1862, 2018.

NEO, Y.; RAY, S.; JIN, J.; GIZDAVIC-NIKOLAIDIS, M.; NIEUWOUDT, M.; LIU, D.; QUEK, S.; Encapsulation of food grade antioxidant in natural biopolymer by electrospinning technique: A physicochemical study based on zein-gallic acid system. **Food Chemistry**, v. 136, p. 1013–1021, 2013.

NIU, B.; SHAO, P.; LUO, Y.; SUN, P. Recent advances of electrosprayed particles as encapsulation systems of bioactives for food application. **Food Hydrocolloids**, v. 99, 105376, 2020a.

NIU, B.; ZHAN, L.; SHAO, P.; XIANG, N.; SUN, P.; CHEN, H.; GAO, H. Electrospinning of zein-ethyl cellulose hybrid nanofibers with improved water resistance for food preservation. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 142, p. 592–599, 2020b.

OLIVEIRA, D.; SALVADOR, A.; SMÂNIA JUNIOR, A.; SMÂNIA, E. MARASCHIN, M.; FERREIRA, S. Antimicrobial activity and composition profile of grape (*Vitis vinifera*) pomace extracts obtained by supercritical fluids. **Journal of Biotechnology**, v. 164, p. 423–432, 2013.

OLIVEIRA, A.; MÓDENES, A.; BRAGIÃO, M.; HINTERHOLZ, C.; TRIGUEROS,

D.; BEZERRA, I. Use of grape pomace as a biosorbent for the removal of the Brown KROM KGT dye. **Bioresource Technology Reports**, v. 2, p. 92–99, 2018.

OLIVEIRA FILHO, J.; BRAGA, A.; OLIVEIRA, B.; GOMES, F.; MOREIRA, V.; PEREIRA, V.; EGEA, M. The potential of anthocyanins in smart, active, and bioactive eco-friendly polymer-based films: A review. **Food Research International**, v. 142, 110202, 2021.

PEIXOTO, C.; DIAS, M.; ALVES, M.; CALHELHA, R.; BARROS, L.; PINTO, S.; FERREIRA, I. Grape pomace as a source of phenolic compounds and diverse bioactive properties. **Food Chemistry**, v. 253, p. 132–138, 2018.

PERERA, K.; JAISWAL, S.; JAISWAL, A. K. A review on nanomaterials and nanohybrids based bio-nanocomposites for food packaging. **Food Chemistry**, v. 376, 131912, 2022.

PERTUZATTI, P.; MENDONÇA, S.; ALCOLÉA, M.; GUEDES, C.; AMORIM, F.; BECKMANN, A.; GAMA, L.; AMÉRICO, M. Bordo grape marc (*Vitis labrusca*): Evaluation of bioactive compounds *in vitro* and *in vivo*. **LWT - Food Science and Technology**, v. 129, 109625, 2020.

PEŠIĆ, M.; MILINCIĆ, D.; KOSTIĆ, A.; STANISAVLJEVIĆ, N.; VUKOTIĆ, G.; KOJIĆ, M.; GASIĆ, U.; BARAĆ, M.; STANOJEVIĆ, S.; POPOVIĆ, D.; BANJAC, N.; TESIĆ, Z.. *In vitro* digestion of meat- and cereal-based food matrix enriched with grape extracts: How are polyphenol composition, bioaccessibility and antioxidant activity affected? **Food Chemistry**, v. 284, p. 28–44, 2019.

PINTAĆ, D.; MAJKIĆ, T.; TOROVIĆ, L.; ORCIĆ, D.; BEARA, I.; SIMIN, N.; MIMICA-DUKIĆ, N.; LESJAK, M. Solvent selection for efficient extraction of bioactive compounds from grape pomace. **Industrial Crops and Products**, v. 111, p. 379–390, 2018.

PREMJIT, Y.; PANDHI, S.; KUMAR, A.; RAI, D.; DUARY, R.; MAHATO, D. Current trends in flavor encapsulation: A comprehensive review of emerging encapsulation techniques, flavour release, and mathematical modelling. **Food Research International**, v. 151, 110879, 2022.

PRIETTO, L.; MIRAPALHETE, T.; PINTO, V.; HOFFMANN, J.; VANIER, N.; LIM, L.; DIAS, A.; ZAVAREZE, E. pH-sensitive films containing anthocyanins extracted from black bean seed coat and red cabbage. **LWT - Food Science and Technology**, v. 80, p. 492–500, 2017.

PRIETTO, L.; PINTO, V.; HALAL, S.; MORAIS, M.; COSTA, J.; LIM, L.; DIAS, A.; ZAVAREZE, E. Ultrafine fibers of zein and anthocyanins as natural pH indicator. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 98, p. 2735–2741, 2018.

RADÜNZ, M.; HACKBART, H.; BONA, N.; PEDRA, N.; HOFFMANN, J.; STEFANELLO, F.; ZAVAREZE, E. Glucosinolates and phenolic compounds rich broccoli extract: Encapsulation by electrospraying and antitumor activity against glial tumor cells. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 192, 111020, 2020.

RADÜNZ, M.; CAMARGO, T.; HACKBART, H.; BLANK, J.; HOFFMANN, J.; STEFANELLO, F.; ZAVAREZE, E. Encapsulation of broccoli extract by electrospraying: Influence of *in vitro* simulated digestion on phenolic and glucosinolate contents, and on antioxidant and antihyperglycemic activities. **Food Chemistry**, v. 339, 128075, 2021.

REN, G.; SHI, J.; HUANG, S.; LIU, C.; NI, F.; HE, Y.; LUO, X.; LI, T.; SONG, Y.; HUANG, M.; XIE, H. The fabrication of novel zein and resveratrol covalent conjugates: Enhanced thermal stability, emulsifying and antioxidant properties. **Food Chemistry**, v. 374, 131612, 2022.

RIBEIRO, L.; RIBANI, R.; FRANCISCO, T.; SOARES, A.; PONTAROLO, R.; HAMINIUK, . Profile of bioactive compounds from grape pomace (*Vitis vinifera* and *Vitis labrusca*) by spectrophotometric, chromatographic and spectral analyses. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 1007, p. 72–80, 2015.

ROCKENBACH, I.; RODRIGUES, E.; GONZAGA, L.; CALIARI, V.; GENOVESE, M.; GONÇALVES, A.; FETT, R. Phenolic compounds content and antioxidant activity in pomace from selected red grapes (*Vitis vinifera* L. and *Vitis labrusca*

L.) widely produced in Brazil. **Food Chemistry**, v. 127, p. 174–179, 2011.

ROMANINI, E.; RODRIGUES, L.; FINGER, A.; CHIERRITO, T.; SCAPIM, M.; MADRONA, G. Ultrasound assisted extraction of bioactive compounds from BRS Violet grape pomace followed by alginate-Ca²⁺ encapsulation. **Food Chemistry**, v. 338, 128101, 2021.

ROSTAMABADI, H.; ASSADPOUR, E.; TABARESTANI, H.; FALSAFI, S.; JAFARI, S. Electrospinning approach for nanoencapsulation of bioactive compounds; recent advances and innovations. **Trends in Food Science and Technology**, v. 100, p. 190–209, 2020.

ROSTAMI, M.; YOUSEFI, M.; KHEZERLOU, A.; MOHAMMADI, M.; JAFARI, S. Application of different biopolymers for nanoencapsulation of antioxidants via electrohydrodynamic processes. **Food Hydrocolloids**, v. 97, 105170, 2019.

ROY, S.; PRIYADARSHI, R.; EZATI, P.; RHIM, J. Curcumin and its uses in active and smart food packaging applications - a comprehensive review. **Food Chemistry**, v. 375, 131885, 2022.

RUBERTO, G.; RENDA, A.; DAQUINO, C.; AMICO, V.; SPATAFORA, C.; TRINGALI, C.; TOMMASI, N. Polyphenol constituents and antioxidant activity of grape pomace extracts from five Sicilian red grape cultivars. **Food Chemistry**, v. 100, p. 203–210, 2007.

RUBIO, F.; HAMINIUK, C.; MARTELLI-TOSI, M.; SILVA, M.; MAKIMORI, G.; FAVARO-TRINDADE, C. Utilization of grape pomaces and brewery waste *Saccharomyces cerevisiae* for the production of bio-based microencapsulated pigments. **Food Research International**, v. 136, 109470, 2020.

SHAO, P.; LIU, L.; YU, J.; LIN, Y.; GAO, H.; CHEN, H.; SUN, P. An overview of intelligent freshness indicator packaging for food quality and safety monitoring. **Trends in Food Science and Technology**, v. 118, p. 285–296, 2021.

SHARMA, S.; BARKAUSKAITE, S.; JAISWAL, A.; JAISWAL, S. Essential oils as additives in active food packaging. **Food Chemistry**, v. 343, 128403, 2021.

SHISHIR, M.; 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 and Technology**, v. 78, p. 34–60, 2018.

SINGLETON, V. L.; ROSSI, J. A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 16, p. 144-158, 1965.

SILVA, S.; FELICIANO, R.; BOAS, L.; BRONZE, M. Application of FTIR-ATR to Moscatel dessert wines for prediction of total phenolic and flavonoid contents and antioxidant capacity. **Food Chemistry**, v. 150, p. 489–493, 2014.

SILVA, V.; IGREJAS, G.; FALCO, V.; SANTOS, T.; TORRES, C.; OLIVEIRA, A.; PEREIRA, J.; AMARAL, J.; POETA, P. Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activity of phenolic compounds extracted from wine industry by-products. **Food Control**, v. 92, p. 516–522, 2018.

SINOPOLI, A.; CALOGERO, G.; BARTOLOTTA, A. Computational aspects of anthocyanidins and anthocyanins: A review. **Food Chemistry**, v. 297, 124898, 2019.

SIROHI, R.; TARAFDAR, A.; SINGH, S.; NEGI, T.; GAUR, V.; GNANSOUNOU, E.; BHARATHIRAJA, B. Green processing and biotechnological potential of grape pomace: Current trends and opportunities for sustainable biorefinery. **Bioresource Technology**, v. 314, 123771, 2020.

SMITH-PALMER, A.; STEWART, J.; FYFE, L. Antimicrobial properties of plant essential oils and essences against five important food-borne pathogens. **Letters in Applied Microbiology**, v. 26, p. 118–122, 1998.

SOUZA, E.; KRINGEL, D.; DIAS, A.; ZAVAREZE, E. Polysaccharides as wall material for the encapsulation of essential oils by electrospun technique. **Carbohydrate Polymers**, v. 265, 118068, 2021.

TAN, H.; ZHOU, H.; GUO, T.; LI, J.; ZHANG, C.; WANG, S.; ZHANG, Y.; MA, L. Zein structure and its hidden zearalenone: Effect of zein extraction methods. **Food Chemistry**, v. 374, 131563, 2022.

TANG, Y.; ZHOU, Y.; LAN, X.; HUANG, D.; LUO, T.; JI, J.; MAFANG, Z.; MIAO, X.; WANG, H.; WANG, W. Electrospun Gelatin Nanofibers Encapsulated with Peppermint and Chamomile Essential Oils as Potential Edible Packaging. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 67, p. 2227–2234, 2019.

TARANTILIS, P.; TROIANOU, V.; PAPPAS, C.; KOTSERIDIS, Y.; POLISSIOU, M. Differentiation of Greek red wines on the basis of grape variety using attenuated total reflectance Fourier transform infrared spectroscopy. **Food Chemistry**, v. 111, p. 192–196, 2008.

TARONE, A.; CAZARIN, C.; MAROSTICA JUNIOR, M. Anthocyanins: New techniques and challenges in microencapsulation. **Food Research International**, v. 133, 109092, 2020.

TOPUZ, F.; UYAR, T. Antioxidant, antibacterial and antifungal electrospun nanofibers for food packaging applications. **Food Research International**, v. 130, 108927, 2020.

UMARAW, P.; MUNEKATA, P.; VERMA, A.; BARBA, F.; SINGH, V.; KUMAR, P.; LORENZO, J. Edible films/coating with tailored properties for active packaging of meat, fish and derived products. **Trends in Food Science and Technology**, v. 98, p. 10–24, 2020.

VINHOLES, J.; GROSSO, C.; ANDRADE, P.; GIL-IZQUIERDO, A.; VALENTÃO, P.; PINHO, P.; FERRERES, F. *In vitro* studies to assess the antidiabetic, anti-cholinesterase and antioxidant potential of *Spergularia rubra*. **Food Chemistry**, v. 129, p. 454–462, 2011.

WANG, D.; SUN, J.; LI, J.; SUN, Z.; LIU, F.; DU, L.; WANG, D. Preparation and characterization of gelatin/zein nanofiber films loaded with perillaldehyde, thymol, or ϵ -polylysine and evaluation of their effects on the preservation of chilled chicken breast. **Food Chemistry**, v. 373, 131439, 2022.

WANG, H.; HAO, L.; NIU, B.; JIANG, S.; CHENG, J.; JIANG, S. Kinetics and Antioxidant Capacity of Proanthocyanidins Encapsulated in Zein Electrospun Fibers by Cyclic Voltammetry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 64, p. 3083–3090, 2016.

WANG, H.; HAO, L.; WANG, P.; CHEN, M.; JIANG, S.; JIANG, S. Release kinetics and antibacterial activity of curcumin loaded zein fibers. **Food Hydrocolloids**, v. 63, p. 437–446, 2017.

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

WSOO, M.; SHAHIR, S.; BOHARI, S.; NAYAN, N.; RAZAK, S. A review on the properties of electrospun cellulose acetate and its application in drug delivery systems: A new perspective. **Carbohydrate Research**, v. 491, 107978, 2020.

WU, L.; TSAI, I.; HO, Y.; HANG, Y.; LIN, C.; TSAI, M.; MI, P. Active and intelligent gellan gum-based packaging films for controlling anthocyanins release and monitoring food freshness. **Carbohydrate Polymers**, v. 254, 117410, 2021.

XU, Q.; QIU, R.; BAI, Z.; MA, J.; FAN, Q.; LI, Y.; TAHA, S.; RAMZAN, Z.; LI, J. Zein-based microcapsule for vanillin sustained release. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 138, p. 1–10, 2021.

XU, Y.; BURTON, S.; KIM, C.; SISMOUR, E. Phenolic compounds, antioxidant, and antibacterial properties of pomace extracts from four virginia-grown grape varieties. **Food Science and Nutrition**, v. 4, p. 125–133, 2016.

YEN, G.; LAI, H.; CHOU, H. Nitric oxide-scavenging and antioxidant effects of *Uraria crinita* root. **Food Chemistry**, v. 74, p. 471–478, 2001.

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

YU, J.; AHMEDNA, M. Functional components of grape pomace: Their composition, biological properties and potential applications. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 48, p. 221–237, 2013.

ZENG, P.; CHEN, X.; QIN, Y.; ZHANG, Y.; WANG, X.; WANG, J.; NING, Z.;

RUAN, Q.; ZHANG, Y. Preparation and characterization of a novel colorimetric indicator film based on gelatin/polyvinyl alcohol incorporating mulberry anthocyanin extracts for monitoring fish freshness. **Food Research International**, v. 126, 108604, 2019.

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, J.; ZOU, X.; ZHAI, X.; HUANG, X.; JIANG, C.; HOLMES, M. Preparation of an intelligent pH film based on biodegradable polymers and roselle anthocyanins for monitoring pork freshness. **Food Chemistry**, v. 272, p. 306–312, 2019a.

ZHANG, X.; HUO, H.; SUN, X.; ZHU, J.; DAI, H.; ZHANG, Y. Nanocrystallization of anthocyanin extract from red-fleshed apple 'QN-5' improved its antioxidant effect through enhanced stability and activity under stressful conditions. **Molecules**, v. 24, p. 1-11, 2019b.

ZHAO, X.; ZHU, H.; ZHANG, G.; TANG, W. Effect of superfine grinding on the physicochemical properties and antioxidant activity of red grape pomace powders. **Powder Technology**, v. 286, p. 838–844, 2015.

ZHENG, L.; LIU, L.; YU, J.; SHAO, P. Novel trends and applications of natural pH-responsive indicator film in food packaging for improved quality monitoring. **Food Control**, v. 134, 108769, 2022.

ZHIJIANG, C.; QIN, Z.; XIANYOU, S.; YUNPEI, L. Zein/Poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) electrospun blend fiber scaffolds: Preparation, characterization and cytocompatibility. **Materials Science and Engineering C**, v. 71, p. 797–806, 2017.