UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de São José do Rio Preto

Thais Cristina Benatti Gallo

# Transferência de massa e cinética de liberação de óleo essencial de orégano encapsulado pelos métodos de gelificação iônica e coacervação complexa

São José do Rio Preto
2019

Thais Cristina Benatti Gallo

# Transferência de massa e cinética de liberação de óleo essencial de orégano encapsulado pelos métodos de gelificação iônica e coacervação complexa

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Engenharia e Ciência de Alimentos, junto ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Campus de São José do Rio Preto (Área de concentração: Engenharia de Alimentos).

Financiadora: CAPES e CNPq

Orientador: Profª. Drª. Vânia Regina Nicoletti

Co-orientador: Profª. Drª. Marília Gonçalves Cattelan

São José do Rio Preto
2019

G172t

Gallo, Thais Cristina Benatti

Transferência de massa e cinética de liberação de óleo essencial de orégano encapsulado pelos métodos de gelificação iônica e coacervação complexa / Thais Cristina Benatti Gallo. -- São José do Rio Preto, 2019

109 f. : il., tabs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto

Orientadora: Vânia Regina Nicoletti

Coorientadora: Marília Gonçalves Cattelan

1. *Origanum vulgare* L.. 2. Interação eletrostática. 3. Liofilização. 4. Modelagem. 5. Difusão. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

Thais Cristina Benatti Gallo

# Transferência de massa e cinética de liberação de óleo essencial de orégano encapsulado pelos métodos de gelificação iônica e coacervação complexa

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Engenharia e Ciência de Alimentos, junto ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Campus de São José do Rio Preto (Área de concentração: Engenharia de Alimentos).

Financiadora: CAPES e CNPq

Comissão Examinadora

Profª. Drª. Vânia Regina Nicoletti
UNESP – Campus de São José do Rio Preto
Orientadora

Profª. Drª. Izabela Dutra Alvim
ITAL – Campinas

Profª. Drª. Maria Aparecida Mauro
UNESP – Campus de São José do Rio Preto

São José do Rio Preto
26 de fevereiro de 2019

Este trabalho é dedicado, em especial, à minha mãe, Josirene,
aos meus avós, Maria Irene e José Maria (*in memorian*),
às minhas irmãs, Tamires e Maria Eduarda,
e ao meu namorado, Artur, cujo incentivo e apoio
foram fundamentais para a conclusão desta jornada.

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, pelo dom da vida, pelas bênçãos e oportunidades concedidas durante meu percurso e por mais essa conquista.

À Prof. Dra. Vânia Regina Nicoletti, pelos sete anos de orientação, convivência, aprendizado, seriedade, competência e dedicação. Obrigada pelo exemplo diário de profissionalismo e pela amizade.

À Prof. Dra. Marília Gonçalves Cattelan, pela co-orientação durante essa jornada do Mestrado, pelos ensinamentos, sugestões e discussões sobre o trabalho.

À Prof. Dra. Maria Aparecida Mauro, pelas valiosas sugestões durante o exame de qualificação, pelas discussões e esclarecimentos sobre dúvidas do trabalho, pelo aprendizado durante as aulas e pela participação como membro titular da banca examinadora.

À Dra. Izabela Dutra Alvim, pelas valiosas sugestões durante o exame de qualificação, pela parceria em análises e explicações, pelo uso de seu equipamento e pela participação como membro titular da banca examinadora.

À Universidade Estadual Paulista (UNESP/IBILCE) por me acolher na graduação e proporcionar a continuidade e realização de um sonho.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001, à qual agradeço.

Ao CNPq pelo suporte financeiro para desenvolvimento deste projeto de pesquisa (Processo 423066/2016-1).

À Laszlo pela parceria na compra do óleo essencial de orégano.

Ao Laboratório de Caracterização Estrutural (LCE/DEMa/UFSCar) pelas análises de Microscopia Eletrônica de Varredura.

Aos professores da Pós-Graduação, por todos os ensinamentos e discussões durante as disciplinas, permitindo que eu crescesse profissionalmente.

Aos técnicos de laboratório, por toda a ajuda e paciência.

Aos amigos de laboratório, principalmente à Poliana, pelo convívio, apoio e ajuda e pelos momentos de descontração.

À mulher que mais amo e admiro, minha mãe Josirene, que sempre me incentivou nos estudos e nunca mediu esforços para proporcionar o melhor às filhas.

Muito obrigada pelo incentivo e torcida, pelos esforços para sempre me ver feliz e pelo exemplo de bondade, responsabilidade e respeito.

Ao Artur, meu namorado e companheiro, que sempre esteve disposto a me ajudar. Obrigada pelas horas dedicadas a mim e, principalmente, obrigada por todo incentivo, amor, torcida, dedicação e paciência em dias difíceis.

Às minhas irmãs caçulas, Tamires e Maria Eduarda, à minha avó, Maria Irene, e ao meu padrasto, Abraão, por todo incentivo, torcida e ajuda e por todos os momentos de alegria.

À minha família, pelo incentivo e pela grande torcida, em todos os momentos.

À minha segunda família, Ana, Laércio, Amanda e Enzo, por me acolherem tão bem e por proporcionarem ótimos momentos durante meus anos longe de casa.

E, finalmente, a todos que contribuíram, direta ou indiretamente, para a realização deste trabalho.

"*Você nunca sabe que resultados virão da sua ação.*
*Mas se você não fizer nada, não existirão resultados*."

*Mahatma Gandhi*

**RESUMO**

O óleo essencial de orégano é conhecido por suas propriedades antimicrobianas, porém trata-se de uma mistura de compostos voláteis sensíveis à luz, ao oxigênio e à temperatura e que podem ser facilmente degradados. A encapsulação permite a sua proteção, estendendo sua vida útil e promovendo sua liberação controlada. O objetivo deste trabalho foi estudar a influência do método de encapsulação e material de parede e, consequentemente da morfologia das partículas, na cinética de liberação do óleo essencial de orégano em um meio líquido com condições análogas à uma solução de marinação, bem como avaliar se os processos de recobrimento por interação eletrostática com concentrado proteico de soro de leite e liofilização influenciam na liberação do composto ativo. As partículas produzidas por gelificação iônica apresentaram capacidades de carga e retenção entre 64,19 e 78,64 % e 57,58 e 73,26 %, respectivamente, enquanto as partículas produzidas por coacervação complexa apresentaram capacidade de retenção entre 64,58 e 66,12 % e eficiência de encapsulação entre 88,84 e 90,84 %. Enquanto o processo de liofilização diminuiu o diâmetro médio e tornou a superfície das partículas irregulares, acelerando a liberação do óleo, o processo de recobrimento não teve interferência significativa na cinética de liberação. As partículas produzidas por ambos os processos demoraram entre 420 e 660 minutos para liberar 95 % ou mais do óleo retido. Durante o processo de liberação, as amostras não apresentaram dissolução ou erosão, porém as partículas produzidas por gelificação iônica intumesceram e as coacervadas apresentaram redução de seu diâmetro médio. O modelo que melhor se ajustou aos perfis de liberação foi o de *Peppas*, o qual apresentou coeficiente de determinação ($R^2$) > 0,94, erro residual médio (E) < 10 % e expoente difusional (n) entre 0,29 e 0,33, confirmando que a liberação do óleo essencial de orégano ocorreu, predominantemente, através da difusão de *Fick*. Os valores de coeficiente de transferência de massa instantâneo (h) variaram entre $0,89 \times 10^{-8}$ e $5,06 \times 10^{-8}$, mostrando correlação com os perfis de liberação do óleo essencial de orégano.

Palavras-chave: *Origanum vulgare* L. Interação eletrostática. Liofilização. Modelagem. Difusão.

***ABSTRACT***

*Oregano essential oil is known for its antimicrobial properties; however, it is a mixture of volatile compounds sensitive to light, oxygen, and temperature, and that can be easily degraded. Encapsulation allowed its protection, extending its shelf life and promoting its controlled release. The objective of this work was to evaluate the influence of the encapsulation method and wall material, and consequently the particle morphology, in the release kinetics of oregano essential oil in a liquid medium with conditions analogous to a marinating solution, as well as to evaluate if the electrostatic interaction with whey protein concentrate and freeze-drying processes have influence on the release of the oil. Particles produced by ionic gelation presented loading and retention capacities between 64.19 and 78.64 % and 57.48 and 73.26 %, respectively, while particles produced by complex coacervation presented a retention capacity between 64.58 and 66.12 % and encapsulation efficiency between 88.84 and 90.84 %. Whereas the freeze-drying process decreased the mean size and made the particle surfaces to become irregular, accelerating the oil release, the coating process did not have significative interference in the release process. Particles produced by both processes took between 420 and 660 minutes to release 95 % or more of the trapped oil. During the release process, samples did not show dissolution or erosion; however, particles produced by ionic gelation undergone swelling and the coacervate particles showed a decrease in their mean size. The model that best fitted the kinetic profiles was Peppas, which presented a determination coefficient ($R^2$) > 0.94, mean residual error (E) < 10 % and diffusional exponent (n) between 0.29 and 0.33, confirming that oregano essential oil release occurred, mainly, through Fick diffusion. Instantaneous mass transfer coefficient values (h) varied between $0.89 \times 10^{-8}$ and $5.06 \times 10^{-8}$, showing correlation with the oregano essential oil release profiles*.

*Keywords: Origanum vulgare L. Electrostatic interaction Freeze-drying. Modeling. Diffusion.*

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

**Figura 1 –** Planta de orégano (*Origanum vulgare* L.). .....20
**Figura 2 –** Tipos de partículas: (i) cápsula simples, (ii) esfera (matriz), (iii) cápsula irregular, (iv) cápsula de múltiplos-núcleos, (v) cápsula de múltiplas paredes e (vi) cápsulas reunidas. .....23
**Figura 3 –** Estrutura do tipo "caixa de ovo" da gelificação do alginato: (i) representação esquemática e (ii) estrutura química pela interação iônica entre íons carboxilato – alginato – e íons $Ca^{2+}$.....26
**Figura 4 –** Etapas da encapsulação por coacervação complexa.....29
**Figura 5 –** Representação esquemática de um sistema de liberação controlada.....33
**Figura 6 –** Representação gráfica genérica dos perfis de liberação tardia e contínua. .....33
**Figura 7 –** Esquema de matrizes hidrofílicas após entrada de meio aquoso. .....34
**Figura 8 –** Condições de produção e análise das micropartículas empregadas no presente estudo.....37
**Figura 9 –** Microscopia óptica da amostra produzida por gelificação iônica por extrusão sem recobrimento úmida (GISRU): (A) exterior (4x), (B) interior (4x) e (C) interior após amostra cortada ao meio (10x). .....48
**Figura 10 –** Microscopia óptica da amostra produzida por gelificação iônica por extrusão sem recobrimento liofilizada (GISRL): (A) exterior (4x), (B) interior (4x) e (C) interior após amostra cortada ao meio (10x). .....49
**Figura 11 –** Microscopia óptica da amostra produzida por gelificação iônica por extrusão com recobrimento úmida (GICRU): (A) exterior (4x), (B) interior (4x) e (C) interior após amostra cortada ao meio (10x). .....50
**Figura 12 –** Microscopia óptica da amostra produzida por gelificação iônica por extrusão com recobrimento liofilizada (GICRL): (A) exterior (4x), (B) interior (4x) e (C) interior após amostra cortada ao meio (10x). .....51
**Figura 13 –** Microscopia óptica (10x) das amostras produzida por coacervação complexa: (A) úmida (CCU), (B) liofilizada (CCL) e (C) liofilizada reidratada (CCL). 52
**Figura 14 –** MEV da amostra de partículas liofilizadas de OEO encapsulado por gelificação iônica sem recobrimento com WPC (GISRL) com aumento de: (A) 36x, (B) 100x e (C) 5000x. .....53

**Figura 15 –** MEV da amostra de partículas liofilizadas de OEO encapsulado por gelificação iônica com recobrimento com WPC (GICRL) com aumento de: (A) 35x, (B) 100x e (C) 5000x. ..... 54
**Figura 16 –** MEV da amostra de partículas liofilizadas de OEO encapsulado por coacervação complexa (CCL): (A) 500x, (B) 1000x e (C) 5000x. ..... 55
**Figura 17 –** Distribuição de tamanho para as amostras de OEO encapsulado por gelificação iônica. ..... 57
**Figura 18 –** Distribuição de tamanho para as amostras de OEO encapsulado por coacervação complexa. ..... 58
**Figura 19 –** Curvas de cinética de liberação in vitro de OEO encapsulado pelos métodos de gelificação iônica e coacervação complexa. ..... 63
**Figura 20 –** Microscopia óptica (4x) das alterações estruturais e morfológicas da amostra GISRU durante a cinética de liberação: (A) 10 minutos, (B) 60 minutos, (C) 360 minutos e (D) 540 minutos. ..... 65
**Figura 21 –** Microscopia óptica (4x) das alterações estruturais e morfológicas da amostra GISRL durante a cinética de liberação: (A) 10 minutos, (B) 60 minutos, (C) 360 minutos e (D) 540 minutos. ..... 66
**Figura 22 –** Microscopia óptica (4x) das alterações estruturais e morfológicas da amostra GICRU durante a cinética de liberação: (A) 10 minutos, (B) 60 minutos, (C) 360 minutos e (D) 540 minutos. ..... 67
**Figura 23 –** Microscopia óptica (4x) das alterações estruturais e morfológicas da amostra GICRL durante a cinética de liberação: (A) 10 minutos, (B) 60 minutos, (C) 360 minutos e (D) 540 minutos. ..... 68
**Figura 24 –** Microscopia óptica (10x) das alterações estruturais e morfológicas da amostra CCU durante a cinética de liberação: (A) 10 minutos, (B) 60 minutos, (C) 240 minutos e (D) 420 minutos. ..... 69
**Figura 25 –** Microscopia óptica (10x) das alterações estruturais e morfológicas da amostra CCL durante a cinética de liberação: (A) 10 minutos, (B) 60 minutos, (C) 240 minutos e (D) 420 minutos. ..... 70
**Figura 26 –** Variação de tamanho das amostras de OEO encapsulado em alginato pelo método de gelificação iônica. ..... 72
**Figura 27 –** Variação de tamanho das amostras de OEO encapsulado em gelatina/goma arábica pelo método de coacervação complexa. ..... 72

**Figura 28 –** Ajuste dos dados da cinética de liberação de OEO encapsulado pelos métodos de gelificação iônica e coacervação complexa utilizando-se o modelo de Peppas. ..... 76
**Figura 29 –** Curvas obtidas para a concentração de equilíbrio do OEO em meio líquido com condições análogas à solução de marinação. ..... 79
**Figura 30 –** Curvas de liberação em termos da concentração de OEO liberado em função do tempo em solução análoga à solução de marinação, para uma massa de amostra de 5 mg. ..... 79

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1 –** Modelos e respectivas equações para ajuste de dados de liberação de compostos encapsulados. ..... 35
**Tabela 2 –** Partículas produzidas no presente estudo com suas respectivas siglas. 47
**Tabela 3 –** Diâmetro médio ($D_{[4,3]}$) e polidispersidade das amostras de OEO encapsulado por gelificação iônica e coacervação complexa. ..... 57
**Tabela 4 –** Desempenho de encapsulação das partículas carregadas com óleo essencial de orégano encapsulado por gelificação iônica por extrusão. ..... 60
**Tabela 5 –** Desempenho de encapsulação das partículas carregadas com óleo essencial de orégano encapsulado por coacervação complexa. ..... 60
**Tabela 6 –** Diâmetro médio das amostras de OEO encapsulado por gelificação iônica durante ensaios de liberação in vitro. ..... 71
**Tabela 7 –** Diâmetro médio das amostras de OEO encapsulado por coacervação complexa durante ensaios de liberação in vitro. ..... 71
**Tabela 8 –** Valores do coeficiente de determinação ($R^2$) e erro residual médio relativo (E) obtidos após ajuste dos modelos aos dados experimentais. ..... 75
**Tabela 9 –** Parâmetros de ajuste do modelo de Peppas para as curvas de cinética de liberação obtidas experimentalmente. ..... 76
**Tabela 10 –** Concentração de equilíbrio e coeficientes de transferência de massa instantâneos de partículas de OEO encapsulado em meio líquido com condições análogas a solução de marinação. ..... 80
**Tabela 11 –** Valores de coeficiente de transferência de massa instantâneo em relação aos diâmetros médios de partículas de OEO encapsulado. ..... 80

# SUMÁRIO

**1 INTRODUÇÃO** ..... **17**
**2 OBJETIVOS** ..... **19**
**2.1 Objetivo geral** ..... **19**
**2.2 Objetivos específicos** ..... **19**
**3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA** ..... **20**
**3.1 Orégano (*Origanum vulgare* L.)** ..... **20**
**3.2 Óleos essenciais** ..... **21**
**3.3 Encapsulação** ..... **22**
3.3.1 Gelificação iônica ..... 24
*3.3.1.1 Agentes surfactantes* ..... 26
*3.3.1.2 Interação eletrostática* ..... 27
3.3.2 Coacervação complexa ..... 28
**3.4 Liofilização** ..... **30**
**3.5 Marinação de alimentos** ..... **31**
**3.6 Liberação controlada de materiais encapsulados** ..... **32**
**4 MATERIAL E MÉTODOS** ..... **37**
**4.1 Matéria prima** ..... **37**
**4.2 Produção das partículas** ..... **37**
4.2.1 Encapsulação ..... 37
*4.2.1.1 Gelificação iônica por extrusão* ..... 38
*4.2.1.2 Coacervação Complexa* ..... 38
4.2.2 Recobrimento ..... 39
4.2.3 Liofilização ..... 39
**4.3 Caracterização morfológica e estrutural** ..... **39**
4.3.1 Microscopia óptica ..... 40
4.3.2 Microscopia Eletrônica de Varredura ..... 40
4.3.3 Diâmetro médio e distribuição de tamanho ..... 40
**4.4 Desempenho de encapsulação** ..... **41**
4.4.1 Gelificação iônica ..... 41
4.4.2 Coacervação complexa ..... 41
**4.5 Cinética de liberação *in vitro*** ..... **42**
**4.6 Modelagem e Transferência de massa** ..... **44**
4.6.1 Modelagem das curvas de cinética de liberação ..... 44

4.6.2 Cálculo do coeficiente de transferência de massa instantâneo (*h*) .....44
**4.7 Tratamento estatístico dos resultados.....46**
**5 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....47**
**5.1 Caracterização morfológica e estrutural .....47**
5.1.1 Microscopia óptica e eletrônica de varredura .....47
5.2.2 Diâmetro médio e distribuição de tamanho .....56
**5.2 Desempenho de encapsulação .....60**
**5.3 Cinética de liberação *in vitro*.....62**
5.3.1 Alterações morfológicas e estruturais das partículas durante os ensaios de liberação.....65
5.3.2 Alterações no diâmetro médio das partículas durante os ensaios de liberação .....71
**5.4 Modelagem e transferência de massa .....75**
5.4.1 Modelagem das curvas de cinética de liberação.....75
5.4.1 Cálculo do coeficiente de transferência de massa instantâneo (*h*) .....78
**6 CONCLUSÃO .....83**
**LISTA DE SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS .....84**
**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....85**
APÊNDICE A – Imagem digitalizada da amostra GISRU após 10 minutos em contato com meio líquido com condições análogas à solução de salmoura. .....95
APÊNDICE B – Imagem digitalizada da amostra GISRU após 60 minutos em contato com meio líquido com condições análogas à solução de salmoura. .....96
APÊNDICE C – Imagem digitalizada da amostra GISRU após 360 minutos em contato com meio líquido com condições análogas à solução de salmoura. .....97
APÊNDICE D – Imagem digitalizada da amostra GISRU após 540 minutos em contato com meio líquido com condições análogas à solução de salmoura. .....98
APÊNDICE E – Imagem digitalizada da amostra GISRL após 10 minutos em contato com meio líquido com condições análogas à solução de salmoura. .....99
APÊNDICE F – Imagem digitalizada da amostra GISRL após 60 minutos em contato com meio líquido com condições análogas à solução de salmoura. .....100
APÊNDICE G – Imagem digitalizada da amostra GISRL após 360 minutos em contato com meio líquido com condições análogas à solução de salmoura. .....101
APÊNDICE H – Imagem digitalizada da amostra GISRL após 540 minutos em contato com meio líquido com condições análogas à solução de salmoura. .....102

APÊNDICE I – Imagem digitalizada da amostra GICRU após 10 minutos em contato com meio líquido com condições análogas à solução de salmoura. .....103
APÊNDICE J – Imagem digitalizada da amostra GICRU após 60 minutos em contato com meio líquido com condições análogas à solução de salmoura. .....104
APÊNDICE K – Imagem digitalizada da amostra GICRU após 360 minutos em contato com meio líquido com condições análogas à solução de salmoura. .....105
APÊNDICE L – Imagem digitalizada da amostra GICRU após 540 minutos em contato com meio líquido com condições análogas à solução de salmoura. .....106
APÊNDICE M – Imagem digitalizada da amostra GICRL após 10 minutos em contato com meio líquido com condições análogas à solução de salmoura. .....107
APÊNDICE N – Imagem digitalizada da amostra GICRL após 60 minutos em contato com meio líquido com condições análogas à solução de salmoura. .....108
APÊNDICE O – Imagem digitalizada da amostra GICRL após 360 minutos em contato com meio líquido com condições análogas à solução de salmoura. .....109
APÊNDICE P – Imagem digitalizada da amostra GICRL após 540 minutos em contato com meio líquido com condições análogas à solução de salmoura. .....110

# 1 INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, a alta demanda por alimentos seguros, naturais e de qualidade, além da suspeita sobre a toxicidade de alguns aditivos químicos, evidenciaram a necessidade do uso de compostos naturais que possam desempenhar a função de conservante (OLIVEIRA et al., 2012). Assim, a indústria de alimentos tem dado uma atenção considerável aos óleos essenciais, os quais são compostos voláteis produzidos como metabólitos secundários por plantas aromáticas e possuem propriedades antioxidantes, aromatizantes e conservantes. Além disso, são naturais, seguros para uso e amplamente aceitos pelos consumidores (BAKRY et al., 2016).

O orégano está entre as plantas aromáticas utilizadas como especiarias mais comercializadas e consumidas no mundo, tendo grande importância econômica como fonte natural de compostos bioativos (LUKAS; SCHMIDERER; NOVAK, 2015). Seu óleo essencial é conhecido por suas propriedades antimicrobianas devido aos seus principais compostos fenólicos – carvacrol e timol (BAKRY et al., 2016). Porém, como os demais óleos essenciais, trata-se de uma mistura de compostos voláteis que podem ser degradados devido à sua sensibilidade à luz, ao oxigênio e à temperatura.

A microencapsulação é uma tecnologia que permite aprisionar fisicamente substâncias sensíveis, de modo a protegê-las de condições adversas, estendendo sua vida útil e promovendo a liberação controlada do material encapsulado (BEIRÃO-DA-COSTA et al., 2013). Para a encapsulação de óleos essenciais, pode-se utilizar várias técnicas, tais como: emulsificação, coacervação, gelificação iônica, *spray drying*, *spray chilling*, liofilização, entre outras (ASBAHANI et al., 2015; BAKRY et al., 2016). Entretanto, é interessante o uso de técnicas pouco agressivas, como a gelificação iônica e a coacervação, as quais são técnicas simples e que não exigem equipamentos especializados em escala laboratorial. Além disso, as técnicas de encapsulação que produzem partículas úmidas, como as citadas acima, são geralmente complementadas com processo de desidratação para que as partículas possam ser analisadas também em estado desidratado. O processo de desidratação por liofilização é um dos mais utilizados para fornecer produtos de excelente qualidade e com características semelhantes aos originais, uma vez que não requer altas temperaturas para a desidratação do produto. Devido à grande gama de técnicas de encapsulação, há diversos estudos focados em processos de produção de partículas,

porém estudos sobre os fenômenos de transferência de massa e cinética de liberação de compostos encapsulados são tão importantes quanto a produção e são mais escassos.

O desenvolvimento de sistemas de liberação controlada depende, além da escolha do material a ser encapsulado e dos métodos empregados para encapsulação, das possibilidades de predição e controle do gatilho e da cinética de liberação desse composto no meio. Ao mesmo tempo, os mecanismos de liberação dependem de diversos fatores específicos e inerentes a cada aplicação, incluindo o método de encapsulação, o material de parede, a morfologia das partículas e as propriedades do meio (MADERUELO; ZARZUELO; LANAO, 2011).

Diante do exposto, o presente estudo teve por objetivo caracterizar a liberação *in vitro* do óleo essencial de orégano microencapsulado, buscando descrever os mecanismos de transferência de massa envolvidos no processo e determinar sua cinética de liberação, visando sua aplicação como antimicrobiano no controle do desenvolvimento de micro-organismos em filés de peito de frango marinados. Para tanto, foram estudadas partículas contendo óleo essencial de orégano (OEO) encapsulado em alginato de sódio pelo método de gelificação iônica por extrusão, submetidas ou não ao processo de recobrimento por interação eletrostática com concentrado proteico de soro de leite (WPC), úmidas e liofilizadas, e partículas contendo óleo essencial de orégano encapsulado em gelatina e goma arábica pelo método de coacervação complexa, úmidas e liofilizadas. Pretendeu-se, assim, correlacionar os efeitos do método de produção e da formulação da matriz encapsulante, bem como o estado úmido ou desidratado da partícula, com suas propriedades de barreira e, consequentemente, com os fenômenos de transferência de massa e a cinética de liberação do óleo essencial de orégano em meio líquido.

# 2 OBJETIVOS

## 2.1 Objetivo geral

O objetivo deste trabalho foi encapsular o óleo essencial de orégano (OEO) para evitar perdas dos principais compostos voláteis e, consequentemente, perda do efeito antimicrobiano desejado e estudar os fenômenos de transferência de massa envolvidos em sua liberação. A partir dos resultados obtidos, objetivou-se ajustar modelos matemáticos adequados à predição da cinética de liberação do óleo essencial de orégano em meio líquido, simulando condições análogas à solução de marinação de carne de frango, visando a aplicação das partículas como antimicrobiano natural.

## 2.2 Objetivos específicos

Os objetivos específicos incluíram:

i. produção de partículas contendo OEO encapsulado em alginato de sódio por gelificação iônica por extrusão;

ii. produção de micropartículas contendo OEO encapsulado em gelatina e goma arábica por coacervação complexa;

iii. submissão das partículas produzidas de acordo com o item (i) a uma etapa de recobrimento por interação eletrostática com WPC;

iv. submissão das partículas produzidas de acordo com os itens (i), (ii) e (iii) a uma etapa de liofilização;

v. caracterização das partículas produzidas quanto à distribuição de tamanho, morfologia e teor de OEO;

vi. determinação, experimental, da cinética de liberação de OEO em meio líquido simulando soluções de marinação;

vii. avaliação, ao longo do processo de liberação, das alterações morfológicas e estruturais sofridas pelas partículas;

viii. modelagem da cinética de liberação e correlação dos fenômenos de transporte com as alterações morfológicas e estruturais observadas.

# 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

## 3.1 Orégano (*Origanum vulgare* L.)

O orégano é uma planta herbácea perene (Figura 1), pertencente à família Lamiaceae, nativa da Europa e Ásia Central (CHARLES, 2012). O gênero *Origanum* possui mais de 205 espécies (TERAMOTO et al., 2009), predominantemente distribuídas ao redor da região do Mediterrâneo (SÖZMEN et al., 2012) e a espécie mais difundida no mundo é a *Origanum vulgare* L. (BONFANTI et al., 2012).

**Figura 1 –** Planta de orégano (*Origanum vulgare* L.).

Fonte: J.S. Peterson, hosted by the USDA-NRCS PLANTS Database, 2019.

O orégano está entre as plantas de especiarias mais comercializadas e consumidas no mundo (CHISHTI; KALOO; SULTAN, 2013; LUKAS; SCHMIDERER; NOVAK, 2015) e tem grande importância econômica como fonte natural de compostos bioativos, como vitaminas, taninos, resinas, esteróis, flavonoides e óleo essencial (CHOU et al., 2011; LIU et al., 2012; LUKAS; SCHMIDERER; NOVAK, 2015), o qual possui um teor entre 0,5 e 7,0 % na espécie *Origanum vulgare* (GOUNARIS et al., 2002; KOKKINI et al., 1997).

Tal especiaria é amplamente utilizada como aromatizante para dar sabor a vários alimentos como pizzas, saladas, carnes processadas e linguiças (AZIZI; YAN;

HONERMEIER, 2009; CHARLES, 2012). Há séculos essa planta tem sido utilizada na área medicinal para tratar várias doenças como tosses convulsivas, distúrbios digestivos, bronquite e asma e, frequentemente, como expectorante, antioxidante, anti-inflamatório e antimicrobiano, entre outras aplicações (CHISHTI; KALOO; SULTAN, 2013; GULLUCE et al., 2012; SARIKURKCU et al., 2015).

## 3.2 Óleos essenciais

Os óleos essenciais (OEs) são metabólitos secundários de plantas que ganharam atenção considerável devido às suas aplicações nas indústrias farmacêuticas, cosméticas e de alimentos, com propriedades anti-inflamatórias, antibacterianas, analgésicas, sedativas, antioxidantes, aromatizantes (CALO et al., 2015; PESAVENTO et al., 2015; RAUT; KARUPPAYIL, 2014) e conservantes (ASBAHANI et al., 2015). Assim, as indústrias de alimentos vêm demonstrando interesse, principalmente, pela aplicação dos óleos essenciais de especiarias como antimicrobianos naturais (DU PLOOY; REGNIER; COMBRINCK, 2009), pois devido à hidrofobicidade dos seus componentes químicos majoritários, eles se acumulam nos ambientes ricos em lipídeos das estruturas da membrana celular bacteriana, causando danos estruturais e funcionais (GOÑI et al., 2009). Atualmente, há diversos estudos com resultados promissores sobre o uso de OEs em alimentos como agente antimicrobiano e biopreservativo (CHANG et al., 2017; FERNANDES et al., 2016; GIRARDI et al., 2017; HERNÁNDEZ-HERNÁNDEZ et al., 2017; TEODORO et al., 2014).

O óleo essencial de orégano (OEO) é composto por mais de 30 ingredientes, como carvacrol, timol, α-terpineno, γ-terpineno, terpinen-4-ol, *p*-cinemo e α-terpineol. Os dois primeiros componentes são compostos fenólicos que constituem cerca de 78 a 82 % do óleo essencial e são os principais responsáveis por sua atividade antioxidante e antimicrobiana (BAKRY et al., 2016; BONFANTI et al., 2012; BOTSOGLOU et al., 2003; CHISHTI; KALOO; SULTAN, 2013; PREUSS et al., 2005). Considerado um dos mais efetivos, o OEO e seus compostos fenólicos demonstraram a capacidade de levar uma célula à morte por sua capacidade de permear e despolarizar a membrana citoplasmática bacteriana (BAKRY et al., 2016). Segundo Rodriguez-Garcia et al. (2016), a eficácia da atividade antimicrobiana segue a

seguinte ordem: orégano / dente de alho / coentro (semente) / canela > tomilho > menta > alecrim > mostarda > coentro (folhas/talos) / sálvia.

Contudo, os seguintes pontos limitam a aplicação dos OEs em alimentos e em outros produtos industriais: (i) são altamente insolúveis em água devido à sua natureza lipofílica e, por essa razão, podem limitar o contato com agentes patogênicos em alimentos ou materiais de elevada umidade (KALEMBA; KUNICKA, 2003); (ii) muitos OEs, os quais são compostos voláteis, têm baixa estabilidade oxidativa e efeito de curta duração (MARTINS et al., 2009). Embora diversos compostos naturais possuam propriedades biológicas descritas em pesquisas *in vitro*, sua eficácia é reduzida quando em alimentos. Esse comportamento referido como “paradoxal” tem propiciado estudos em um campo emergente da físico-química de alimentos, na tentativa de entender e explicar o fenômeno. *A priori*, sabe-se que a concentração e os componentes presentes nos alimentos originam interações moleculares e coloidais que impactam no efeito antimicrobiano dos óleos essenciais. Alguns fatores que contribuem para o paradoxo antimicrobiano são a polaridade, a massa molar e a carga do composto antimicrobiano, além do pH, da força iônica e da temperatura do meio.

As estratégias para melhorar os efeitos biológicos de compostos naturais em alimentos envolvem a modificação de suas propriedades físicas através do uso da encapsulação (WEISS; LOEFFLER; TERJUNG, 2015). A ausência de controle sobre a taxa de liberação do OE produz um efeito imediato e de curta duração (BANERJEE et al., 2013), sendo que a encapsulação oferece uma abordagem adequada e eficaz para aumentar a estabilidade física das substâncias ativas, protegê-las das interações com os ingredientes alimentares e minimizar possíveis efeitos deletérios do OE sobre as propriedades sensoriais (MORAES-LOVISON et al., 2017), além de garantir a liberação lenta e controlada dos compostos voláteis (ASBAHANI et al., 2015).

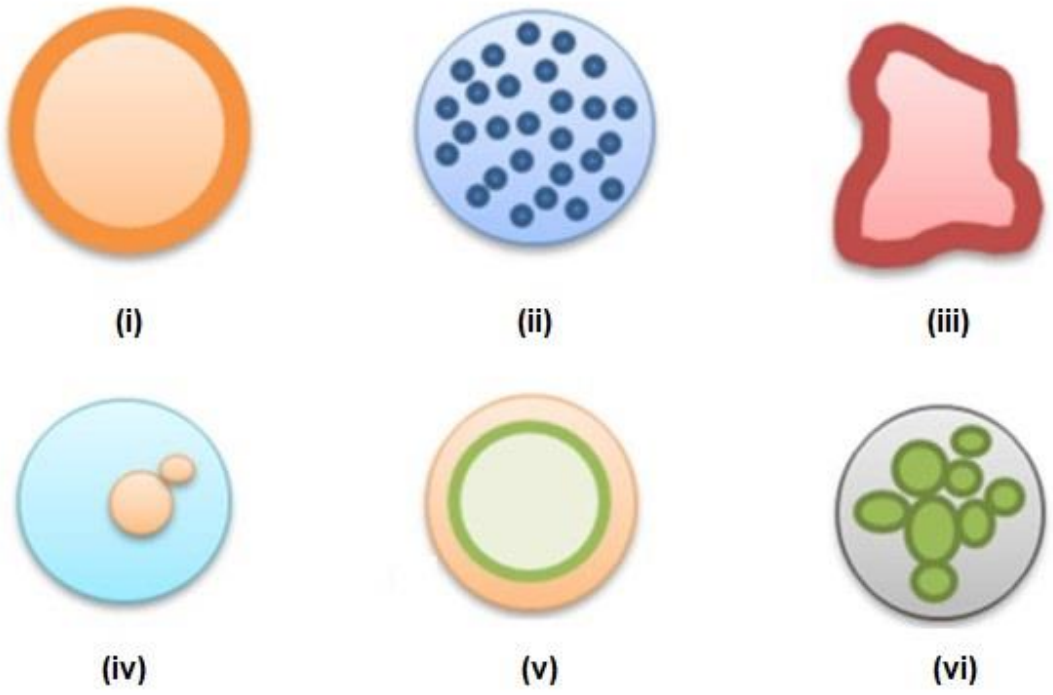
## 3.3 Encapsulação

A encapsulação é uma tecnologia na qual uma substância sólida, líquida ou gasosa é envolvida por uma parede de revestimento ou incorporada em matrizes de um ou mais materiais de parede para obtenção de partículas (NAZZARO et al., 2012). Esse método permite que substâncias sensíveis fiquem protegidas de condições adversas do meio, tais como a luz, a umidade, o oxigênio e as interações com outros

componentes do alimento, permitindo a estabilização do produto, estendendo sua vida útil e promovendo a liberação controlada do material encapsulado em condições pré-definidas (BEIRÃO-DA-COSTA et al., 2013).

As partículas são formadas por um material central, conhecido como material de recheio, fase interna ou núcleo, e um material de parede, denominado revestimento, casca, membrana ou fase externa. O material utilizado para a formação da parede determina a estabilidade das micropartículas e a eficiência do processo (CALVO et al., 2012). O tamanho e a forma das partículas dependem do material de parede e do método utilizado para prepará-las. Há seis tipos de partículas, as quais estão representadas na Figura 2. Os tipos mais comuns são as cápsulas – partículas que possuem um núcleo envolto por uma membrana – e as esferas – partículas que possuem núcleos embutidos em uma matriz, geralmente polímeros (NAZZARO et al., 2012).

**Figura 2 –** Tipos de partículas: (i) cápsula simples, (ii) esfera (matriz), (iii) cápsula irregular, (iv) cápsula de múltiplos-núcleos, (v) cápsula de múltiplas paredes e (vi) cápsulas reunidas.




Fonte: Adaptado de Bakry et al., 2016.

As técnicas utilizadas para a encapsulação são divididas em três métodos: (i) físicos (*spray drying*, *spray chilling*, liofilização, extrusão), (ii) químicos (polimerização interfacial, inclusão molecular) e (iii) físico-químicos (gelificação iônica, coacervação, emulsificação) (ASBAHANI et al., 2015; DIMA et al., 2016; MARTINS et al., 2014; SHAHIDI; HAN, 1993). A seleção da técnica depende do material de recheio, do tamanho desejado das micropartículas e da aplicação e mecanismo de liberação destas (COOK et al., 2012).

No caso dos OEs é recomendada uma encapsulação a baixa temperatura para evitar perdas por volatilização. Assim, pode-se selecionar dois métodos interessantes: a gelificação iônica por extrusão, dada sua simplicidade e versatilidade (BENAVIDES et al., 2016), em escala laboratorial, e a coacervação complexa, uma vez que forma partículas visualmente menores que as formadas pela gelificação iônica por extrusão.

### 3.3.1 Gelificação iônica

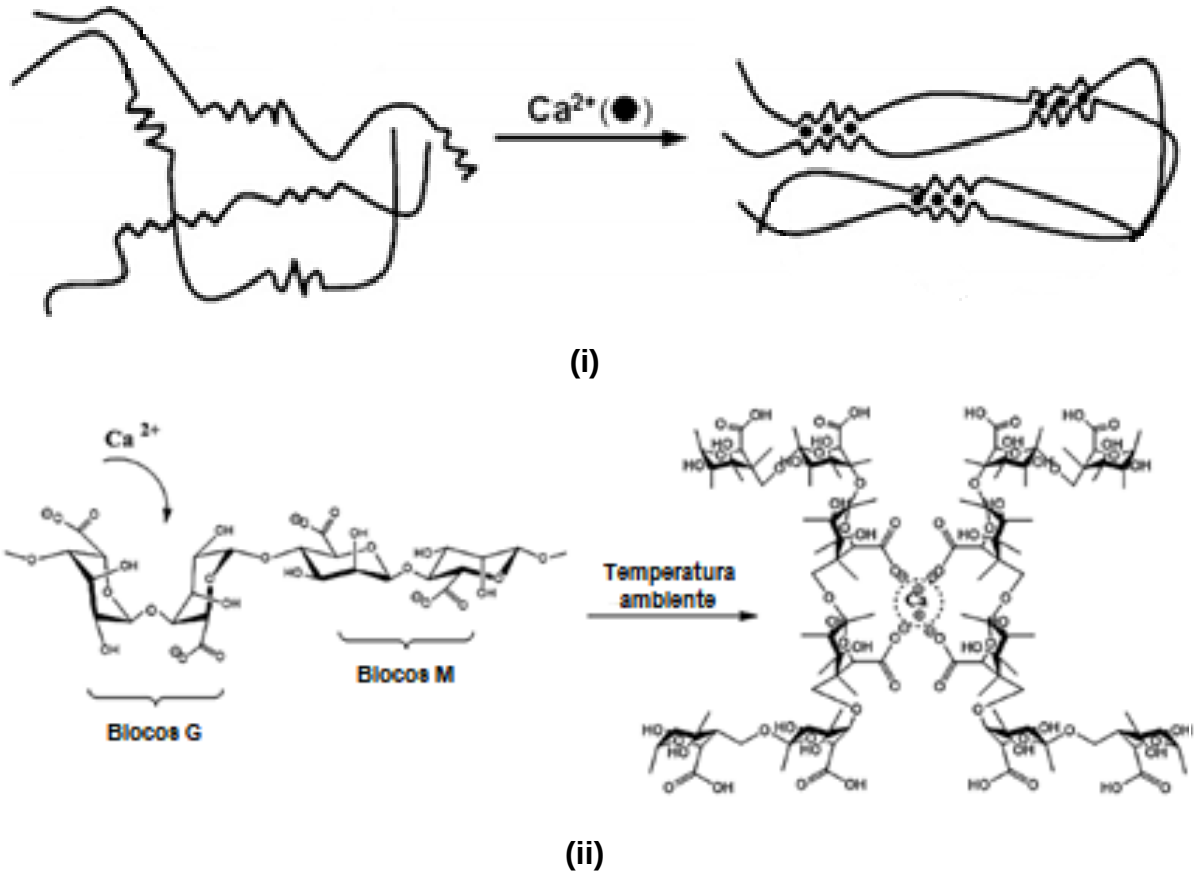
O processo de gelificação iônica é baseado na capacidade de polissacarídeos aniônicos (como alginato, pectina, goma carragena) de formar um gel insolúvel através da reticulação iônica em presença de cátions multivalentes. As partículas de polissacarídeo são dispersas em uma solução contendo íons bivalentes, usualmente $Ca^{2+}$. As vantagens desse processo são a não utilização de altas temperaturas e equipamentos especializados, além de ser considerado de relativo baixo custo. Porém, as partículas obtidas por gelificação iônica possuem elevada porosidade da matriz e, consequentemente, elevado índice de difusão do material de recheio, o que pode ser uma limitação, dependendo da aplicação da partícula. Essa técnica pode ser efetuada por extrusão ou por atomização. Na extrusão, uma mistura contendo o material de parede e o recheio é gotejada em uma solução iônica por meio de uma seringa. No processo de atomização, o ar comprimido força a passagem da mistura de material de parede e recheio por um orifício de tamanho definido (BUREY et al., 2008; PATIL et al., 2010).

Polissacarídeos são uma das categorias de polímeros naturais que desempenham um importante papel em sistemas de entrega de compostos bioativos. Eles são, por definição, estruturas de carboidratos poliméricos constituídos por unidades repetidas de monossacarídeos unidas por ligações glicosídicas. Como são

de fonte natural, os polissacarídeos são altamente seguros, não tóxicos, biodegradáveis e biocompatíveis, além de serem abundantes na natureza e terem baixo custo para seu processamento. Assim, as informações sobre as propriedades biológicas e físico-químicas dos polissacarídeos os tornaram um material promissor na preparação de micropartículas (YANG et al., 2015).

O alginato é um polissacarídeo aniônico produzido por algas marrons, como *Laminaria hyperborea*, *Macrocystis pyrifera* e *Ascophyllum nodosum*, e bactérias. Sua disponibilidade comercial é fruto da produção a partir de algas na forma de sal – alginato de sódio (AGÜERO et al., 2017; OTÁLORA et al., 2016). O uso do alginato como material de parede tem como vantagens seu baixo custo, maior compatibilidade em comparação com outros biopolímeros (ARANHA, 2015) e capacidade de formar complexos com proteínas de alimentos como proteínas do soro de leite (CHING; BANSAL; BHANDARI, 2015). Ademais, o emprego do alginato de sódio é legalmente permitido em alimentos (BRASIL, 2010). Esse polissacarídeo possui grupos carboxílicos que consistem em resíduos de ácidos α-L-glucurônico (G) e β-D-manurônico (M) ligados linearmente por ligações 1,4-glicosídicas (YANG; XIE; HE, 2011). A gelificação do alginato ocorre pela troca de íons de sódio dos blocos G por cátions multivalentes, como os íons de cálcio, e subsequente empilhamento desses blocos G para formar uma característica estrutura do tipo “caixa de ovo”, como observado na Figura 3.

**Figura 3 –** Estrutura do tipo “caixa de ovo” da gelificação do alginato: (i) representação esquemática e (ii) estrutura química pela interação iônica entre íons carboxilato – alginato – e íons $Ca^{2+}$.




Fonte: Adaptado de Agüero et al., 2017; Lee; Mooney, 2012.

Na gelificação iônica, é possível encapsular substâncias hidrofóbicas (MCCLEMENTS, 2006), porém, para obtenção de uma emulsão cineticamente estável é necessária a utilização de um agente surfactante não iônico, o qual estabiliza a emulsão preparada com OE e o material de parede através do uso de um homogeneizador (BAKRY et al., 2016).

*3.3.1.1 Agentes surfactantes*

Agentes surfactantes são substâncias que ajudam a estabilizar emulsões, facilitando a dispersão do óleo em pequenas gotas na fase aquosa, e, consequentemente, podem aumentar a eficiência de encapsulação. A seleção do surfactante é importante na estabilidade da emulsão, já que, geralmente, são

moléculas anfifílicas, ou seja, possuem componentes hidrofílicos e lipofílicos em sua estrutura química, isto é, são solúveis tanto em água quanto em óleo e permitem, assim, que o óleo seja disperso em água. O surfactante é adsorvido na interface água-óleo, estabelecendo uma barreira em torno das gotículas dispersas e, então, a emulsão é estabilizada devido à redução da tensão interfacial do sistema (SHAMAEI et al., 2017; SIYAL et al., 2017). Na indústria de alimentos, geralmente usam-se surfactantes sintéticos de moléculas pequenas (como Tweens e Spans), os quais têm um grupo não polar (cauda) e um grupo polar (cabeça) (MCCLEMENTS; JAFARI, 2018).

Tween é uma marca de registro comercial da ICI Americas, Inc. e, na nomenclatura, o número após o nome do polissorbato refere-se ao grupo hidrofílico. Assim, o Tween 80 é um surfactante hidrofílico e possui uma designação comercial de polissorbato 80 (derivação de um emulsificante de sorbitano polietoxilado e ácido oleico). Devido às boas propriedades emulsificantes, é um dos mais utilizados na preparação de emulsões. Esse surfactante não possui carga (não iônico) e seu componente hidrofílico tem uma importância considerável em relação ao componente lipofílico, o que permite a estabilização efetiva das emulsões óleo em água (ARANCIBIA et al., 2017).

*3.3.1.2 Interação eletrostática*

A interação eletrostática consiste, basicamente, na modificação da estrutura do material de parede de uma partícula pela interação entre polieletrólitos e proteínas, formando agregados estáveis entre os dois polímeros de cargas opostas, o que resulta na formação de um complexo sobre a superfície da partícula (ARANHA, 2015; PATIL et al., 2010). Assim, com esse processo, pode-se superar a limitação da elevada porosidade da matriz das partículas obtidas por gelificação iônica. Humblet-Hua et al. (2011) observou que o revestimento de micropartículas de pectina e alginato com policátions (tais como quitosana e proteínas de soro) resultou na formação de um revestimento sobre a superfície das micropartículas, o qual retardou a liberação dos compostos encapsulados.

Devido às interações eletrostáticas entre grupos com cargas opostas, proteínas e polissacarídeos podem formar complexos em uma solução aquosa

espontaneamente, geralmente entre os valores de pKa dos grupos aniônicos do polissacarídeo e o ponto isoelétrico (pI) da proteína (DE KRUIF; WEINBRECK; DE VRIES, 2004; TOLSTOGUZOV, 2003). A formação e estabilidade desses complexos são afetados por alguns fatores, como pH, força iônica, relação proteína:polieletrólito e condições de produção (YE, 2008).

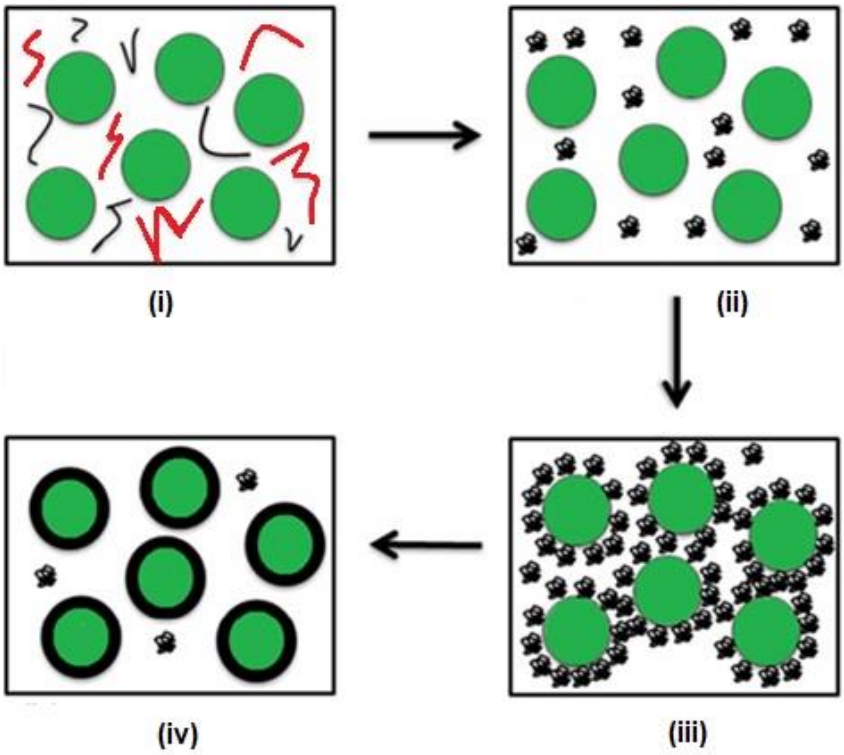
Proteínas lácteas, como as caseínas e proteínas do soro de leite, são estruturas globulares reconhecidas como seguras (GRAS) pela *Food and Drug Administration* (FDA). Tais proteínas possuem a capacidade de gelificação e ligação com pequenas moléculas, sendo, portanto, uma alternativa promissora na encapsulação de compostos bioativos (SHI et al., 2013), apresentando características de biodegradabilidade e biocompatibilidade, além de formar membranas transparentes com boas propriedades mecânicas (BERNABÉ; PENICHE; ARGÜELLES-MONAL, 2005). Além disso, proteínas de soro de leite têm demonstrado boa proteção contra oxidação, possuindo baixa permeabilidade ao oxigênio (CHARVE; REINECCIUS, 2009). As proteínas de soro contêm 82 % de β-lactoglobulina e 15 % de α-lactalbumina, com pontos isoelétricos variando de 4,4 a 5,2 (DAMODARAM, 2008).

### 3.3.2 Coacervação complexa

A encapsulação por coacervação é um fenômeno físico-químico em que ocorre separação espontânea de fases líquidas em uma solução coloidal e, então, o material de recheio é encapsulado no processo (KAUSHIK et al., 2015; THIES, 2007). Esse processo pode ser classificado em coacervação simples e complexa. No caso da coacervação simples há a precipitação de um polímero através da adição de agentes (sais ou álcoois), os quais têm maior afinidade pela água do que o polímero (LAKKIS, 2007), enquanto na coacervação complexa deve haver interação entre pelo menos dois polímeros, com cargas opostas, sob condições adequadas (THIES, 2007; XIAO et al., 2014). O processo de coacervação complexa envolve quatro etapas, como apresentado na Figura 4: (i) mistura do composto bioativo (material de recheio) em uma solução aquosa contendo dois diferentes polímeros (materiais de parede); (ii) coacervação inicial de polímeros após redução do pH da solução abaixo do ponto isoelétrico da proteína; (iii) deposição dos polímeros na superfície do composto

bioativo; e (iv) solidificação e consequente formação da parede e isolamento das partículas (AZEREDO, 2015; BAKRY et al., 2016; SILVA et al., 2012b).

**Figura 4 –** Etapas da encapsulação por coacervação complexa.




Fonte: Adaptado de Bakry et al., 2016.

A junção de proteínas carregadas positivamente a polissacarídeos carregados negativamente conduz à formação de complexos estáveis. Assim são formadas duas fases: a primeira é conhecida como “rica em polímeros”, contendo o coacervado precipitado e a segunda é chamada “pobre em polímeros”, onde o solvente permanece. A agregação das partículas ocorre somente sob certas condições, como correta proporção entre os biopolímeros e ótimo pH, levando à precipitação dos complexos insolúveis. Os complexos podem sofrer drásticas alterações durante o processo, o que torna essencial a preparação sob condições apropriadas (RUTZ et al., 2017; SCHMITT; TURGEON, 2011; THIES, 2007).

O uso do processo de coacervação complexa para encapsulação de compostos fornece as seguintes vantagens: obtenção de partículas que variam de 1 a 1000 μm; uso de condições menos agressivas de processo; variedade de biopolímeros que podem ser utilizados como material de parede; possibilidade de alta eficiência e

retenção, podendo atingir até 90 %; baixa migração do óleo para a superfície da partícula (KAUSHIK et al., 2015; KRALOVEC et al., 2012; SCHMITT et al., 1998).

O sistema gelatina-goma arábica é o mais estudado para coacervação complexa. A gelatina é derivada do colágeno, sendo uma das proteínas mais utilizadas para encapsulação de alimentos, uma vez que possui boa capacidade de formar filme e gel estável em temperaturas menores que 40 °C (MARFIL et al., 2016). Assim como as outras proteínas, a gelatina tem caráter anfótero, ou seja, dependendo do pH do meio em que se encontra, seus grupos de aminoácidos podem estar carregados negativa ou positivamente. Para pH acima do ponto isoelétrico da gelatina, esta terá uma carga resultante negativa, enquanto para pH abaixo do ponto isoelétrico, sua carga resultante será positiva. Em função da hidrólise sofrida na extração, a gelatina pode ser dividida em dois grupos: tipo “A”, com extração realizada por hidrólise ácida e ponto isoelétrico entre 7,0 a 9,5, e tipo “B”, com extração realizada por hidrólise básica e ponto isoelétrico entre 4,5 a 5,5 (MARFIL et al., 2016; PRATA, 2006). A goma arábica (GA) é extraída de espécies de acácia, sendo um polissacarídeo insípido, inodoro, solúvel em água, com baixa higroscopicidade e boas propriedades emulsificantes, além de promover formação de filmes e possuir ação protetora contra oxidação de voláteis. Acima de pH 2,2, esse polissacarídeo é negativamente carregado (AZEREDO, 2015; MARFIL et al., 2016).

### 3.4 Liofilização

A desidratação é uma forma conveniente de conservação de produtos alimentícios, uma vez que reduz o conteúdo de umidade até níveis baixos, reduzindo a chance de reações químicas e as taxas de reações de degradação e aumentando a vida-de-prateleira deste produto. Entre as técnicas de secagem disponíveis, a liofilização é considerada um processo de referência para a produção de produtos desidratados de alta qualidade, por não utilizar ar quente, o qual pode danificar o alimento e, consequentemente, alterar suas propriedades. Apesar do elevado custo, esse processo apresenta vantagens consideráveis em relação às técnicas clássicas de desidratação, como preservação da maior parte das propriedades originais do produto, alta capacidade de reidratação, menor contração do produto e manutenção da morfologia inicial do material, entre outras (ORREGO-ALZATE, 2008).

A liofilização é um processo de desidratação baseado na sublimação da água presente no produto. Para isso, o material a ser seco é previamente congelado e por se tratar de um processo realizado a baixa temperatura e em ausência de ar, as propriedades químicas e organolépticas do produto praticamente não se alteram. O congelamento inicial do produto protege e enrijece a estrutura da matriz sólida e minimiza as alterações na forma do produto, com retração mínima, prevenindo a subsequente migração da água líquida e dos solutos durante a etapa de sublimação. As baixas temperaturas empregadas no processo contribuem para preservar os componentes. Além disso, a formação dos cristais de gelo, seguida pela sua sublimação, resulta em uma matriz homogênea (HAMMAMI; RENÉ, 1997; MARQUES; PRADO; FREIRE, 2009).

Um sistema de liofilização é constituído basicamente de uma câmara a vácuo, um condensador, um compressor e uma bomba de vácuo. Três estágios distintos caracterizam o processo de liofilização: o estágio de congelamento, o estágio de secagem primária e o estágio de secagem secundária. No estágio de secagem primária a água congelada é removida por sublimação originando espaços vazios no interior da matriz alimentícia que antes eram ocupados pelo gelo sublimado, tornando desta forma, o alimento poroso. Nessa etapa, a maior parte da água é removida – em torno de 90% do conteúdo original. Entretanto, ainda podem restar quantidades significativas de água ligada no interior do produto, necessitando de um potencial adicional. A força motriz desta etapa é o aquecimento realizado no estágio de secagem secundária, em que ocorre a dessorção da água ligada, com a umidade final podendo chegar até 2 % (BERK, 2018).

No caso de desidratação de partículas contendo compostos bioativos como material de recheio – como os óleos essenciais –, o processo de liofilização é realizado com o objetivo de elevar a vida-de-prateleira, além de permitir o uso em produtos desidratados.

### 3.5 Marinação de alimentos

O processo de marinação de alimentos é utilizado pela indústria de alimentos visando prolongar a vida de prateleira de produtos cárneos (BJÖRKROTH, 2005), aumentar seu valor agregado e obter um produto de fácil preparo (NIEMINEN et al.,

2012), além de melhorar suas qualidades sensoriais, como aroma, maciez e suculência (NUÑEZ-GONZÁLEZ, 2010). De acordo com Yusop et al. (2012) e Topuz et al. (2014), é crescente a demanda por produtos cárneos marinados de aves e peixes na Europa, sendo um segmento de destaque na indústria alimentícia.

A marinação pode ser classificada como um processo de difusão ou osmose, no qual a carne entra em contato com uma solução de salmoura através de imersão, injeção ou massagem. O método mais antigo de marinação é por imersão, onde os ingredientes penetram na carne por difusão no decorrer do tempo. O processo de massagem é um aperfeiçoamento do processo de imersão, uma vez que o produto a ser marinado é colocado em um equipamento com um recipiente cilíndrico, denominado *tumbler*, o qual fica em constante movimento, auxiliando na distribuição da salmoura. Já o método de injeção é feito através do uso de uma seringa contendo a solução de salmoura, a qual é injetada em diferentes camadas do produto cárneo (BENDALL, 1954; NUÑEZ-GONZÁLEZ, 2010).

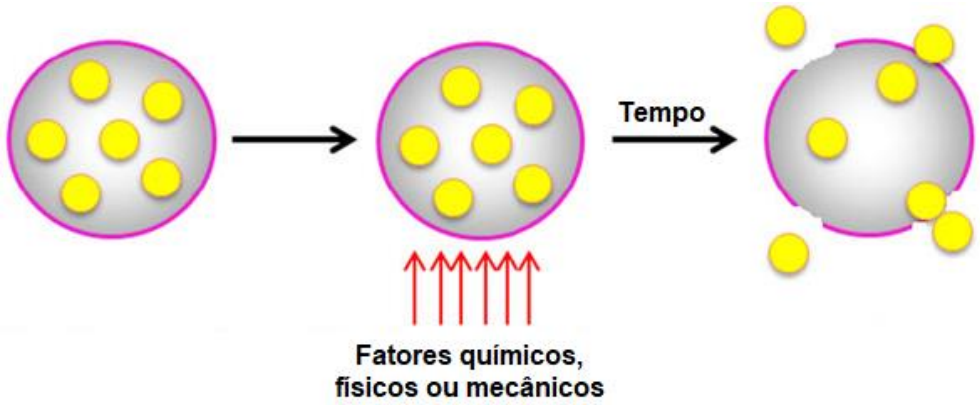
No Brasil, de acordo com a Instrução Normativa n˚ 89 de 2003 (BRASIL, 2003), temperados marinados podem conter, no máximo, 20 % de salmoura incoporada na carne, teor mínimo de sal de 1 % e de especiarias de 0,5 %. Embora diversas especiarias sejam permitidas para uso em alimentos (BRASIL, 2005) e sejam amplamente empregadas na indústria alimentícia, ainda são escassos os estudos sobre os efeitos biológicos (antioxidantes e antimicrobianos) dessas substâncias em produtos cárneos marinados de modo a promover a extensão de sua vida de prateleira (LYTOU; PANAGOU; NYCHAS, 2016; THOMAS et al., 2010).

### 3.6 Liberação controlada de materiais encapsulados

A liberação controlada é definida como uma situação onde um ou mais compostos ativos ou ingredientes são disponibilizados em um ambiente e tempo desejados a uma taxa específica (BAKRY et al., 2016), como representado esquematicamente na Figura 5. O desenvolvimento de sistemas de liberação controlada depende, além da escolha do material a ser encapsulado e dos métodos empregados para protegê-lo de condições adversas, das possibilidades de predição e controle do gatilho e da cinética de liberação desse composto no meio. Os gatilhos de liberação dependem de muitos fatores, como: material encapsulante, substância

encapsulada, geometria e morfologia da cápsula, condições do meio (solvente, pH, força iônica, temperatura) e método de produção das partículas (MADERUELO; ZARZUELO; LANAO, 2011).

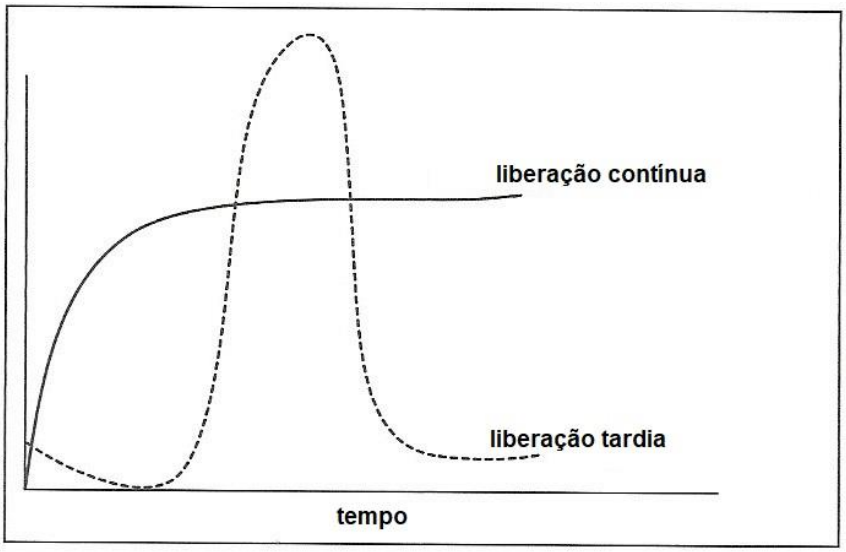
**Figura 5 –** Representação esquemática de um sistema de liberação controlada.




Fonte: Adaptado de Bakry et al., 2016.

Os sistemas de liberação controlada podem ser classificados em 2 tipos: (i) sistema de liberação tardia, onde a liberação do composto ativo é tardia e acontece a partir de um “tempo de espera” finito até um ponto quando/onde a liberação é favorecida; (ii) sistema de liberação contínua, onde o mecanismo é designado para manter uma concentração constante do ativo em um lugar desejado. Tais sistemas estão representados graficamente na Figura 6.

**Figura 6 –** Representação gráfica genérica dos perfis de liberação tardia e contínua.



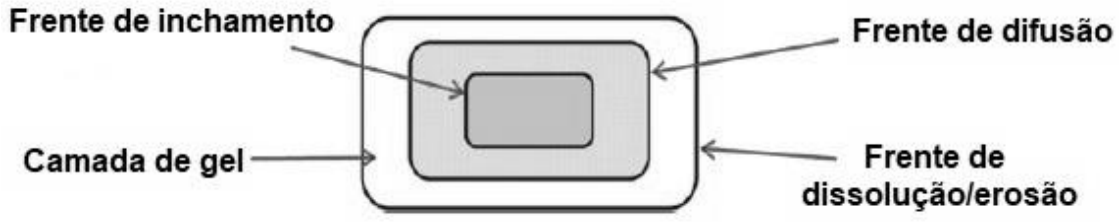

Fonte: Adaptado de Lakkis, 2007.

Um dos requisitos essenciais para a predição dos mecanismos de liberação de ativos encapsulados é identificar os parâmetros de transferência de massa e difusão do ativo a partir de uma região de alta concentração (matriz) para uma região de baixa concentração (meio de liberação) (LAKKIS, 2007). Em alguns casos, pode ocorrer uma alta liberação inicial, conhecida como “explosão de liberação” (*burst release*), antes da liberação alcançar um perfil estável. Tal explosão pode estar relacionada às condições do processo de encapsulação, pequenas falhas na estrutura da matriz, geometria das partículas, interações entre o material de parede e o ativo, estrutura porosa da matriz e, até mesmo, alta carga do ativo encapsulado (HUANG; BRAZEL, 2001; LAKKIS, 2007).

A liberação de materiais encapsulados em matrizes hidrofílicas depende de uma série de fatores, pois tais matrizes se hidratam quando em contato com água e, assim, aumentam seu tamanho devido à entrada do solvente. A hidratação da matriz forma uma zona em que o polímero passa de um estado cristalino a um estado “borrachoso”, conhecido como camada de gel, através da qual ocorrem fenômenos de transporte: (i) entrada de meio aquoso; (ii) saída do ativo para fora do sistema; (iii) erosão da matriz. A espessura da camada de gel aumenta proporcionalmente à entrada de água no sistema, ao mesmo tempo que as cadeias poliméricas da superfície se tornam mais hidratadas e gradualmente perdem sua consistência, permitindo o início da erosão da matriz.

A entrada do meio aquoso na matriz é acompanhada da formação de uma série de frentes, apresentadas na Figura 7, as quais desaparecem durante o processo de dissolução/erosão da matriz.

**Figura 7 –** Esquema de matrizes hidrofílicas após entrada de meio aquoso.




Fonte: Adaptado de Maderuelo; Zarzuelo; Lanao, 2011.

A liberação de materiais encapsulados pode ser descrita através de quatro tipos de mecanismos de transporte de moléculas através do material de parede (SIEPMANN; PEPPAS, 2012; ZOU et al., 2015):

i. transporte do tipo I ou difusão de Fick, quando a taxa de liberação é controlada pelo processo de difusão;
ii. transporte do tipo II, que corresponde ao caso em que a liberação do encapsulado é controlada pelo processo de inchamento do material de parede;
iii. transporte anômalo ou não-Fickiano, que corresponde ao caso em que a taxa de liberação depende simultaneamente dos processos de inchamento e difusão;
iv. transporte tipo "supra II", no qual a taxa de liberação é controlada pela erosão/dissolução do polímero sob a ação do meio.

Vários modelos foram propostos para descrever os processos de transferência de massa envolvidos na liberação de compostos encapsulados, oferecendo parâmetros tais como o coeficiente de difusão, que permite descrever o mecanismo de liberação de cada sistema particular (JIMÉNEZ-ALVARADO et al., 2009; PAYS et al., 2002). Tais modelos são excelentes ferramentas para entender e predizer a liberação do ativo e estão apresentados na Tabela 1.

**Tabela 1 –** Modelos e respectivas equações para ajuste de dados de liberação de compostos encapsulados.

| Modelos | Equações | |
|---|---|---|
| **Ordem zero** | $\mathrm{Q} = \mathrm{K_0} \cdot \mathrm{t}$ | (1) |
| **Primeira ordem** | $\ln \mathrm{Q} = \mathrm{K_1} \cdot \mathrm{t}$ | (2) |
| **Higuchi** | $\mathrm{Q} = \mathrm{K_H} \cdot \mathrm{t}^{1/2}$ | (3) |
| **Peppas** | $\mathrm{Q} = \mathrm{k} \cdot \mathrm{t}^{\mathrm{n}}$ | (4) |
| **Coeficiente de transferência de massa** | $V \cdot \frac{\mathrm{d(c)}}{\mathrm{dt}} = -\mathrm{h} \cdot \mathrm{A} \cdot [\mathrm{c\ (sat)} - \mathrm{c\ (t)}]$ | (5) |

Q: percentual cumulativo de composto encapsulado liberado no tempo t; $K_0$, $K_1$, $K_H$: constantes características de cada modelo; k: constante relacionada às características estruturais e geométricas da matriz; n: expoente difusional; V: volume da solução (meio de liberação); A: área superficial total das partículas; c (sat): concentração de saturação do composto encapsulado (concentração no líquido no

limite da interface com o sólido); c (t): concentração do composto na solução homogeneizada no tempo t; h: coeficiente de transferência de massa.

Fonte: Elaborado pelo autor.

O modelo de ordem zero é conhecido como a cinética de liberação ideal para compostos bioativos, uma vez que, neste caso, os níveis permanecem constantes durante todo o período de liberação, obtendo-se ação prolongada, ou seja, a liberação independe da concentração do composto (COSTA; LOBO, 2001; SILVA et al., 2012a; SINGHVI; SINGH, 2011). Tal cinética pode ser obtida quando *n* (equação 4) assume o valor de 1, o que está, geralmente, relacionado ao transporte do tipo II (DIMA et al., 2016; LIU et al., 2006; NOPPAKUNDILOGRAT et al., 2015). O modelo de primeira ordem está associado ao gradiente de concentração do composto bioativo entre solução e interior da partícula e, assim, a liberação ocorre de forma proporcional à quantidade de composto presente no interior da partícula, de tal modo que a quantidade liberada diminui com o tempo de liberação (COSTA; LOBO, 2001), porém é necessário levar em consideração que não deve haver alteração (inchamento/dissolução/erosão) na forma das partículas durante o processo de liberação, fato que nem sempre acontece (SINGHVI; SINGH, 2011). Já o modelo de Higuchi acontece quando *n* (equação 4) assume o valor de 0,5, o que se relaciona com o transporte do composto através de difusão e dilatação da matriz polimérica, mostrando que a liberação é, principalmente, dependente do tempo, ou seja, a taxa de liberação está relacionada à taxa de difusão do composto (SILVA et al., 2012a).

O tipo de transporte de compostos encapsulados através da parede da partícula pode ser explicado em função de um dos parâmetros de ajuste presentes na equação generalizada de Peppas (equação 4), em que *n* (exponente difusional) indica o mecanismo de liberação do composto encapsulado. Em partículas esféricas, os valores de *n* indicam os seguintes mecanismos de liberação: $n = 0,43$, o mecanismo de liberação dominante é a difusão de Fick (transporte do tipo I); $0,43 < n < 0,85$ indica o mecanismo de liberação pela combinação da difusão e dilatação do material de parede (transporte anômalo ou não-Fickiano); e $n = 0,85$ corresponde à cinética de liberação devido à dilatação do material de parede (transporte do tipo II) (SIEPMANN; PEPPAS, 2012).

# 4 MATERIAL E MÉTODOS

## 4.1 Matéria prima

O óleo essencial de orégano (OEO) utilizado como material de recheio foi obtido comercialmente (Laszlo Aromatologia, Brasil). Os materiais de parede utilizados foram o biopolímero alginato de sódio (GRINDSTED, Danisco, França), a gelatina tipo “B” (LS Chemicals, Brasil) e a goma arábica pura (Dinâmica, Química Contemporânea Ltda., Brasil). Para o processo de encapsulação por gelificação iônica, empregaram-se Tween 80 (Dinâmica, Química Contemporânea Ltda., Brasil), cloreto de cálcio (Dinâmica, Química Contemporânea Ltda., Brasil) e concentrado proteico de soro de leite 80 % (WPC, Alibra Ingredientes Ltda, Brasil) para as etapas de preparação da emulsão, encapsulação e interação eletrostática, respectivamente. Para o processo de encapsulação por coacervação complexa, empregou-se ácido acético glacial (Dinâmica, Química Contemporânea Ltda., Brasil) para a etapa de ajuste de pH.

## 4.2 Produção das partículas

A Figura 8 ilustra as diferentes condições de produção e análise das partículas de OEO empregadas no presente estudo.

**Figura 8 –** Condições de produção e análise das micropartículas empregadas no presente estudo.

Fonte: Elaborado pelo autor.

### 4.2.1 Encapsulação

#### *4.2.1.1 Gelificação iônica por extrusão*

Para a encapsulação por gelificação iônica por extrusão, dispersões aquosas de alginato de sódio a 2 % (g de alginato/100 g de solução) foram preparadas por meio da dissolução do polissacarídeo em água destilada, seguido de aquecimento a 40 °C com agitação constante até completa solubilização. O OEO foi emulsionado em solução aquosa do polissacarídeo (1:2, em base seca) por 30 minutos em homogeneizador (IKAT25-Digital Ultra Turrax, Staufen, Germany) a 13500 rpm, após a adição de Tween 80 (Dinâmica, Química Contemporânea Ltda., Brasil) a 1,0 % (mL Tween 80/100 mL de emulsão). Então, a emulsão foi gotejada com agulha (0,45 mm de diâmetro interno x 13 mm de comprimento) em um recipiente contendo solução aquosa de cloreto de cálcio a 2 % (g de cloreto de cálcio/100 g de solução) sob agitação lenta, em temperatura ambiente (25 °C). As partículas obtidas foram mantidas na solução de $CaCl_2$, por 30 minutos, para cura e em seguida, foram separadas da solução por peneira (38 µm) e lavadas com água destilada a pH 4,0. As partículas foram, então, armazenadas sob refrigeração a 4 °C, em potes de plástico totalmente cobertos por papel alumínio, até o momento do seu uso em análises de caracterização e cinética de liberação.

#### *4.2.1.2 Coacervação Complexa*

Para a encapsulação por coacervação complexa, dispersões aquosas de gelatina a 1 % (g de gelatina/100 g de solução) e goma arábica a 1 % (g de goma arábica/100 g de solução) foram preparadas por meio da dissolução dos materiais em água destilada. A solução de gelatina foi aquecida à 50 °C, adicionou-se OEO na solução na proporção de 1 % (g OEO/100 g de solução de gelatina) e a mistura foi homogeneizada em homogeneizador (IKA T25-Digital Ultra Turrax, Staufen, Germany) a 13500 rpm por 5 minutos, para formação da emulsão. Então, a emulsão foi levada a um agitador magnético e adicionou-se a solução de goma arábica a 50 °C. O pH foi ajustado até 4,0 ± 0,2, com auxílio de ácido acético glacial, utilizando um pHmetro digital (Tecnal, TEC-3MP, Brasil), e o recipiente contendo a solução foi

imerso em banho de gelo, mantendo-se agitação constante, até atingir 10 ± 0,5 °C. Em seguida, o recipiente foi totalmente revestido com papel alumínio, para proteção contra a luz, e mantido a 4 °C por 24 horas, para completa precipitação das partículas produzidas. Então, estas foram separadas da solução com o uso de uma peneira (38 µm), lavadas com água destilada a pH 4,0 e armazenadas sob refrigeração a 4 °C, em potes de plástico totalmente cobertos por papel alumínio, até o momento do seu uso em análises de caracterização e cinética de liberação.

### 4.2.2 Recobrimento

Para o recobrimento com WPC, as partículas obtidas por gelificação iônica por extrusão, ainda úmidas, foram mantidas na dispersão de WPC a 4 % (g de WPC/100 g de solução), em pH 4,0, sob agitação constante por 30 minutos e, posteriormente, separadas por peneiramento (53 µm) e lavadas com água destilada pH 4,0. As partículas foram, então, armazenadas sob refrigeração a 4 °C, em potes de plástico totalmente cobertos por papel alumínio, até o momento do seu uso em análises de caracterização e cinética de liberação.

### 4.2.3 Liofilização

As partículas desidratadas, de ambos os processos de encapsulação, foram obtidas após congelamento a –34 °C em ultra-freezer (Liobrás, FV-500, Brasil) e liofilização por 48 horas em liofilizador de bancada (Liobrás, L-101, Brasil). As partículas desidratadas foram armazenadas em sacos plásticos zip-lock, totalmente cobertos por papel alumínio, em dessecador até o momento do seu uso em análises de caracterização e cinética de liberação.

## 4.3 Caracterização morfológica e estrutural

Para maior compreensão das características morfológicas e estruturais das micropartículas produzidas, estas foram avaliadas em relação ao diâmetro médio e distribuição de tamanhos e à análise morfológica, empregando microscopias ótica e eletrônica de varredura.

### 4.3.1 Microscopia óptica

Na análise estrutural das partículas úmidas, recobertas ou não, e desidratadas, empregou-se um microscópio óptico (Olympus CX31) equipado com câmera fotográfica SC30 munido de software AnalySIS getIT para a obtenção das imagens.

### 4.3.2 Microscopia Eletrônica de Varredura

As amostras desidratadas foram também submetidas à análise de microscopia eletrônica de varredura (MEV), utilizando-se um microscópio eletrônico (Philips XL – 30 FEG), no qual as partículas foram dispostas em um porta-amostra apropriado e recobertas com uma fina camada de ouro (Sputer Coater modelo SCD 050, Balzers, Brasil).

### 4.3.3 Diâmetro médio e distribuição de tamanho

A distribuição de tamanhos e o tamanho médio das partículas foram determinados por difração a laser, com o emprego do equipamento Partica - LA 950 (Horiba, Japão), com preparações conduzidas em triplicata. Para a análise, dispersaram-se as amostras úmidas, recobertas ou não, em água destilada, enquanto as amostras desidratadas foram dispersas em álcool etílico absoluto 99,5 % (Synth, Brasil).

A polidispersidade (*Span*) das amostras foi calculada de acordo com a equação (6), na qual $D_{50}$ é a mediana e $D_{10}$ e $D_{90}$ são, respectivamente, os tamanhos de partículas abaixo dos quais 10 % e 90 % da distribuição reside.

$$Span = \frac{D_{90} - D_{10}}{D_{50}} \quad (6)$$

## 4.4 Desempenho de encapsulação

### 4.4.1 Gelificação iônica

A capacidade de retenção (CR) foi avaliada por espectrofotometria UV-vis, conforme Hosseini et al. (2013b) com modificações. Para cada tratamento, 5 mg de partículas foram misturadas a 20 mL de solução Tween 80 a 0,1 % (mL Tween 80/100 mL de solução) e armazenadas *overnight*. A solução foi, então, filtrada e a absorbância foi mensurada a 275 nm. A concentração de OEO em solução foi calculada empregando-se uma curva de calibração. A amostra controle foi constituída por partículas sem OEO, porém tratadas de modo similar àquelas contendo o OEO. A capacidade de retenção (CR) e a capacidade de carga (CC) do OEO foram obtidas a partir das equações (7) e (8), respectivamente.

$$\mathrm{CR}\ (\%) = \frac{\text{OEO retido nas partículas}}{\text{OEO inicial}} \times 100 \tag{7}$$

$$\mathrm{CC}\ (\%) = \frac{\text{OEO retido nas partículas}}{\text{Massa de partículas}} \times 100 \tag{8}$$

### 4.4.2 Coacervação complexa

A mensuração do OEO presente nas partículas coacervadas foi avaliada por espectrofotometria UV-vis, conforme Marfil et al. (2016) com modificações, levando-se em consideração as diluições realizadas durante a análise para os cálculos finais. Para mensuração do óleo retido nas partículas (óleo superficial + óleo encapsulado), 0,2 g de partículas de cada tratamento foram misturadas a 5 mL de solução tampão citrato-fosfato a pH 8,0 ± 0,2 e 5 mL de hexano e o sistema foi agitado por 2 minutos. Após agitação, a fase orgânica foi removida para leitura de absorbância a 275 nm e adicionou-se 5 mL de hexano ao sistema, agitando-se por mais 2 minutos. Após agitação, retirou-se novamente a fase orgânica para leitura de absorbância a 275 nm. O processo de adição de 5 mL de hexano, agitação durante 2 minutos e retirada da fase orgânica para leitura da absorbância foi repetido por 5 vezes. Para mensuração do óleo superficial (ou não encapsulado), 0,2 g de partículas de cada tratamento foram

misturadas a 5 mL de hexano e o sistema foi agitado por 30 segundos. Após agitação, a fase orgânica foi removida para um balão volumétrico de 25 mL e adicionou-se 5 mL de hexano ao sistema, agitando-se por mais 30 segundos. Após agitação, retirou-se novamente a fase orgânica para o balão volumétrico. O processo de adição de 5 mL de hexano, agitação durante 30 segundos e retirada da fase orgânica para o balão volumétrico foi repetido por 4 vezes, totalizando 2 minutos de contato do hexano com as partículas. Então, completou-se o volume do balão volumétrico com hexano e a absorbância foi mensurada a 275 nm. A concentração de OEO em solução foi calculada empregando-se uma curva de calibração. A amostra controle foi constituída por partículas sem OEO, porém tratadas de modo similar àquelas contendo o OEO. A capacidade de retenção (CR) foi obtida a partir da equação (7) e a eficiência de encapsulação foi obtida a partir da equação (9).

$$\mathrm{EE}\ (\%) = \frac{\mathrm{OEO\ encapsulado} - \mathrm{OEO\ superficial}}{\mathrm{OEO\ retido\ nas\ partículas}} \times 100 \qquad (9)$$

### 4.5 Cinética de liberação *in vitro*

Para a análise de liberação *in vitro* do OEO, empregou-se o método descrito por Hosseini et al. (2013a). Visando simular as condições análogas presentes na solução de marinação dos filés de peito de frango, a análise de liberação *in vitro* foi conduzida utilizando-se óleo vegetal de soja no meio de liberação do OEO. Além disso, a solução empregada nos ensaios de liberação do óleo essencial foi acrescida de NaCl na mesma proporção utilizada para compor a solução de marinação descrita por Lytou, Panagou e Nychas (2016). O teor do óleo de soja empregado foi calculado de acordo com o teor de lipídeos presente em filés de peito de frango (3,0 %), conforme Tabela Brasileira de Composição de Alimentos (TACO, 2011).

Desse modo, 5 mg de partículas foram inseridas em um béquer contendo 20 mL de uma solução constituída pela mistura de 1,2 % de óleo de soja (g óleo de soja/100 g de solução) e 6 % de NaCl (g NaCl/100 g de solução) dissolvidos em uma solução aquosa de Tween 80 a 0,1 % (mL Tween 80/100 mL de solução). A suspensão foi agitada vagarosamente e mantida em temperatura de refrigeração (5 ± 0,5 °C). Em intervalos de tempos específicos, alíquotas de 7 mL de amostra foram coletadas, repondo-se 7 mL de solução análoga à solução de marinação para cada alíquota

retirada. Então, as amostras coletadas foram centrifugadas a 10414×g por 5 min a 25 °C em centrífuga (CT 5500-D, Brasil) e o sobrenadante foi inserido em frascos para determinação da absorbância a 275 nm. O branco foi composto pela mistura constituída por 1,2 % de óleo de soja (g óleo de soja/100 g de solução), 6 % de NaCl (g NaCl/100 g de solução) e solução aquosa de Tween 80 a 0,1 % (mL Tween 80/100 mL de solução).

A concentração de OEO liberada no meio ao longo do período de análise foi calculada por meio de uma curva de calibração de liberação do OEO na solução composta por óleo de soja, NaCl e solução aquosa de Tween 80 a 0,1 % (mL Tween 80/100 mL de solução). O percentual cumulativo de OEO liberado (Q) foi obtido pela relação entre a massa acumulada de OEO liberado em cada tempo de análise ($M_t$) pela massa total de OEO retida inicialmente nas partículas ($M_0$), conforme a equação (10).

$$Q(\%) = \sum_{t=0}^{t} \frac{M_t}{M_0} \times 100 \qquad (10)$$

As mudanças estruturais e morfológicas sofridas pelas amostras durante a cinética de liberação foram avaliadas através da obtenção de imagens das mesmas em diferentes intervalos de tempo. As alterações no tamanho médio das cápsulas foram mensuradas através da coleta de, ao menos, 300 partículas em determinados tempos da cinética. Para as amostras produzidas por gelificação iônica, coletaram-se as partículas e o meio de liberação após 10, 60, 360 e 540 minutos, inserindo-os em sacos plásticos zip-lock transparentes, os quais foram imediatamente estendidos sobre o vidro de um scanner e digitalizadas (Apêndices A - P). O diâmetro das partículas digitalizadas foi mensurado com auxílio de um paquímetro e, então, o diâmetro médio foi calculado. Para as amostras produzidas por coacervação complexa, coletaram-se as partículas após 10, 60, 240 e 420 minutos, e o seu diâmetro foi imediatamente mensurado usando um microscópio óptico (Olympus CX31) equipado com câmera fotográfica SC30 munido do software AnalySIS getIT. A porcentagem de alteração de tamanho ($\Delta D_i$) foi calculada com base na variação do diâmetro, utilizando-se a equação (11), na qual $D_t$ é o diâmetro após o tempo $t$ e $D_0$ é o diâmetro inicial da partícula.

$$\Delta D_i\ (\%) = \frac{D_t - D_0}{D_0} \times 100 \qquad (11)$$

## 4.6 Modelagem e Transferência de massa

Para modelar os fenômenos de transferência de massa e avaliar os mecanismos envolvidos, os modelos matemáticos apresentados na Tabela 1 (Item 3.7) foram aplicados aos os dados experimentais, com o objetivo de avaliar qual deles se ajustou melhor aos resultados.

### 4.6.1 Modelagem das curvas de cinética de liberação

Os critérios utilizados para escolha do modelo foram o coeficiente de determinação ($R^2$) e o erro residual médio relativo (E), valor que apresenta, em porcentagem, a diferença entre os valores obtidos experimentalmente e os valores preditos pelo modelo, o qual é obtido através da equação (12).

$$E = \left[\frac{1}{N} \times \sum_{i=1}^{N} \frac{|(V_e - V_p)|}{V_e}\right] \times 100 \qquad (12)$$

onde $N$ é o número de pontos, $V_e$ os valores obtidos experimentalmente e $V_p$ os valores preditos pelo modelo para cada ponto.

### 4.6.2 Cálculo do coeficiente de transferência de massa instantâneo (*h*)

Para o cálculo do coeficiente de transferência de massa instantâneo (h) apresentado na equação (5), utilizou-se o estudo realizado por Lewińska et al. (2002) como base. Para isso, foram consideradas as seguintes hipóteses:

(i) todo o volume das partículas estava acessível ao meio de liberação e que tal volume pode ser representado por seu volume geométrico;

(ii) não há alteração de volume no sistema;

(iii) o interior da partícula pode ser considerado como homogêneo, com uma mesma concentração de saturação do composto ativo no interior da partícula em qualquer tempo;

(iv) não há adsorção do composto ativo pela matriz.

Assim, como deduzido por Lewińska et al. (2002):

$$c\ (sat) = \left(\frac{V + V_P}{V_P}\right) \cdot c_{eq} - \frac{V}{V_P} \cdot c\ (t)$$

Substituindo-se a equação acima na equação (5) e desenvolvendo-se as equações geradas, chega-se na equação (13), a qual foi utilizada para cálculo de *h*.

$$V \cdot \frac{dc}{dt} = -\ h \cdot A \cdot t \cdot \left\{\left[\left(\frac{V + V_P}{V_P}\right) \cdot c_{eq} - \frac{V}{V_P} \cdot c\ (t)\right] - c\ (t)\right\}$$

$$V \cdot \frac{dc}{dt} = -\ h \cdot A \cdot t \cdot \left(\frac{V \cdot c_{eq}}{V_P} + \frac{V_P \cdot c_{eq}}{V_P} - \frac{V \cdot c\ (t)}{V_P} - c\ (t)\right)$$

$$\frac{dc}{dt} = -\ h \cdot A \cdot t \cdot \left(\frac{V \cdot c_{eq}}{V_P \cdot V} + \frac{V_P \cdot c_{eq}}{V_P \cdot V} - \frac{V \cdot c\ (t)}{V_P \cdot V} - \frac{c\ (t)}{V}\right)$$

$$\frac{dc}{dt} = -\ h \cdot A \cdot t \cdot \left(\frac{c_{eq}}{V_P} + \frac{c_{eq}}{V} - \frac{c\ (t)}{V_P} - \frac{c\ (t)}{V}\right)$$

$$\frac{dc}{dt} = -\ h \cdot A \cdot t \cdot \left[c_{eq} \cdot \left(\frac{1}{V_P} + \frac{1}{V}\right) - c\ (t) \cdot \left(\frac{1}{V_P} + \frac{1}{V}\right)\right]$$

$$\frac{dc}{dt} = -\ h \cdot A \cdot t \cdot \left[\left(c_{eq} - c\ (t)\right) \cdot \left(\frac{1}{V_P} + \frac{1}{V}\right)\right]$$

$$\frac{dc}{\left(c_{eq} - c\ (t)\right)} = -\ h \cdot A \cdot \left(\frac{1}{V_P} + \frac{1}{V}\right) \cdot (t \cdot dt)$$

$$\int_{c_0}^{c\ (t)} \frac{dc}{\left(c_{eq} - c\ (t)\right)} = -\ h \cdot A \cdot \left(\frac{1}{V_P} + \frac{1}{V}\right) \cdot \int (t \cdot dt)$$

$$ln \frac{c_{eq} - c\ (t)}{c_{eq} - c_0} = -\ h \cdot A \cdot \left(\frac{1}{V_P} + \frac{1}{V}\right) \cdot t$$

$$\frac{c_{eq} - c\ (t)}{c_{eq} - c_0} = \exp\left[-\ h \cdot A \cdot t \cdot \left(\frac{1}{V} + \frac{1}{V_P}\right)\right]$$

$$c_{eq} - c\ (t) = \left(c_{eq} - c_0\right) \cdot \exp\left[-\ h \cdot A \cdot t \cdot \left(\frac{1}{V} + \frac{1}{V_P}\right)\right]$$

$$c\,(t) - c_{eq} = -\left(c_{eq} - c_0\right) \cdot \exp\left[-\,h \cdot A \cdot t \cdot \left(\frac{1}{V} + \frac{1}{V_P}\right)\right]$$

$$c\,(t) = c_{eq} - \left(c_{eq} - c_0\right) exp\left[-h \cdot A \cdot t\left(\frac{1}{V} + \frac{1}{V_P}\right)\right] \quad (13)$$

onde *c (t)* é a concentração do material encapsulado na solução homogeneizada no tempo *t*, $c_{eq}$ é a concentração de equilíbrio, $c_0$ é a concentração do material encapsulado na solução homogeneizada em *t* = 0, *h* é o coeficiente de transferência de massa, *A* é a área de superfície externa total das partículas, *t* é o tempo, *V* é o volume da solução (meio de liberação) e $V_P$ é o volume das partículas.

Para o cálculo da concentração de equilíbrio ($c_{eq}$), a concentração média de OEO em uma partícula de cada amostra foi calculada pela equação (14) e, então, diferentes massas de partículas de cada amostra foram colocadas em um mesmo volume de meio líquido simulando condições análogas à solução de marinação. Após 24 horas de armazenamento à temperatura de refrigeração (5,0 ± 0,5 ° C) e agitação constante, a solução foi filtrada e a absorbância medida a 275 nm, resultando em uma curva que permitiu a dedução de $c_{eq}$.

$$c_{OEO}^{partícula} = \frac{massa\ de\ OEO\ retido\ em\ N\ partículas}{N \times volume\ de\ uma\ partícula} \quad (14)$$

## 4.7 Tratamento estatístico dos resultados

Os resultados obtidos nas determinações analíticas, em triplicata, foram avaliados em relação à adequação a uma distribuição normal e variâncias homogêneas, com análise de variância (ANOVA) e diferenças entre as médias testadas pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade.

# 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As partículas utilizadas neste estudo foram preparadas pelos métodos de gelificação iônica externa por extrusão e por coacervação complexa. O método de produção e o material de parede podem afetar a morfologia e a distribuição de tamanho das partículas que, por sua vez, podem influenciar na cinética de liberação (DIMA et al., 2016) e, consequentemente, na transferência de massa do material para o meio, através da interface material de parede-meio. Assim, após a encapsulação do OEO por ambos os processos, as partículas produzidas foram divididas em lotes, resultando em seis tratamentos, os quais estão especificados na Tabela 2, com suas respectivas siglas.

**Tabela 2 –** Partículas produzidas no presente estudo com suas respectivas siglas.

| Tratamento | Método de encapsulação | Recobrimento com WPC | Liofilização | Sigla |
|---|---|---|---|---|
| **1** | Gelificação iônica (GI) | | | GISRU |
| **2** | | | X | GISRL |
| **3** | | X | | GICRU |
| **4** | | X | X | GICRL |
| **5** | Coacervação complexa (CC) | | | CCU |
| **6** | | | X | CCL |

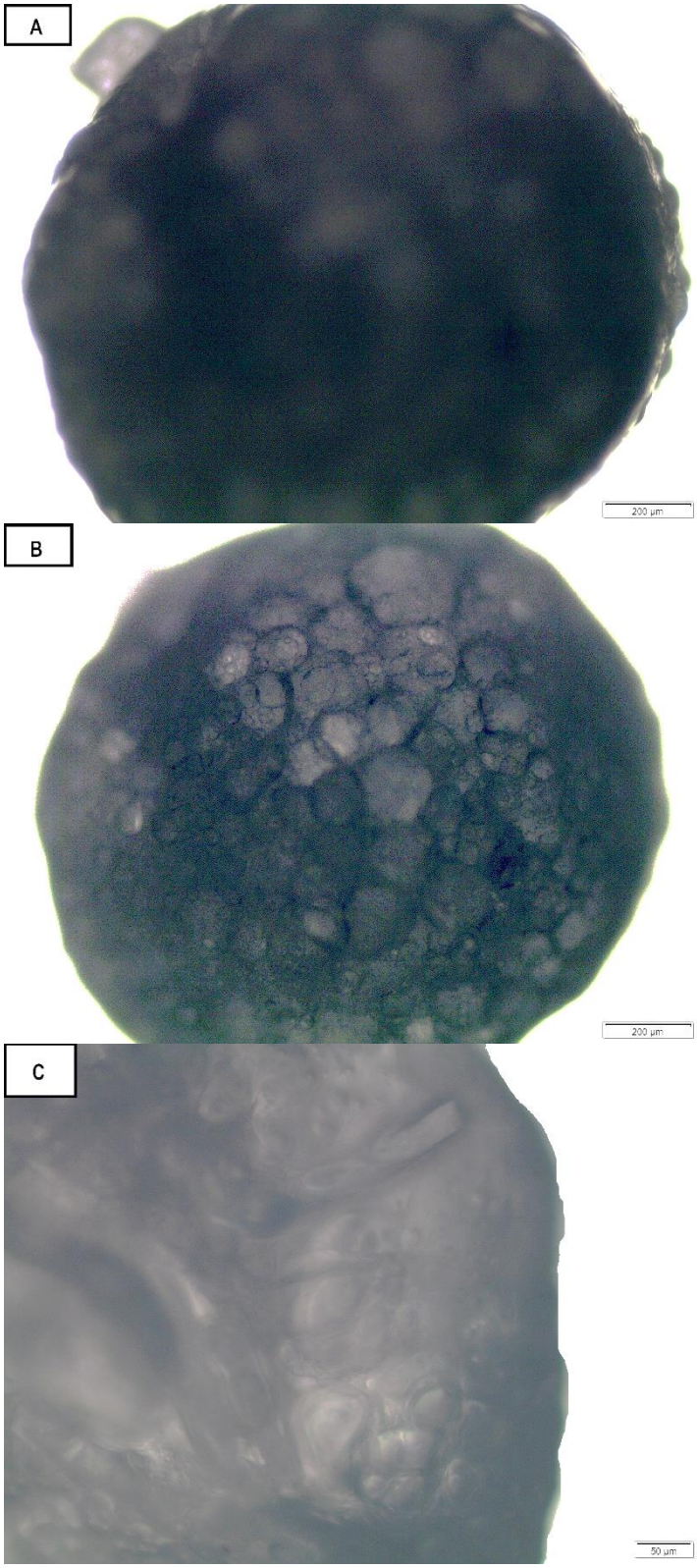
Fonte: Elaborado pelo autor.

## 5.1 Caracterização morfológica e estrutural

### 5.1.1 Microscopia óptica e eletrônica de varredura

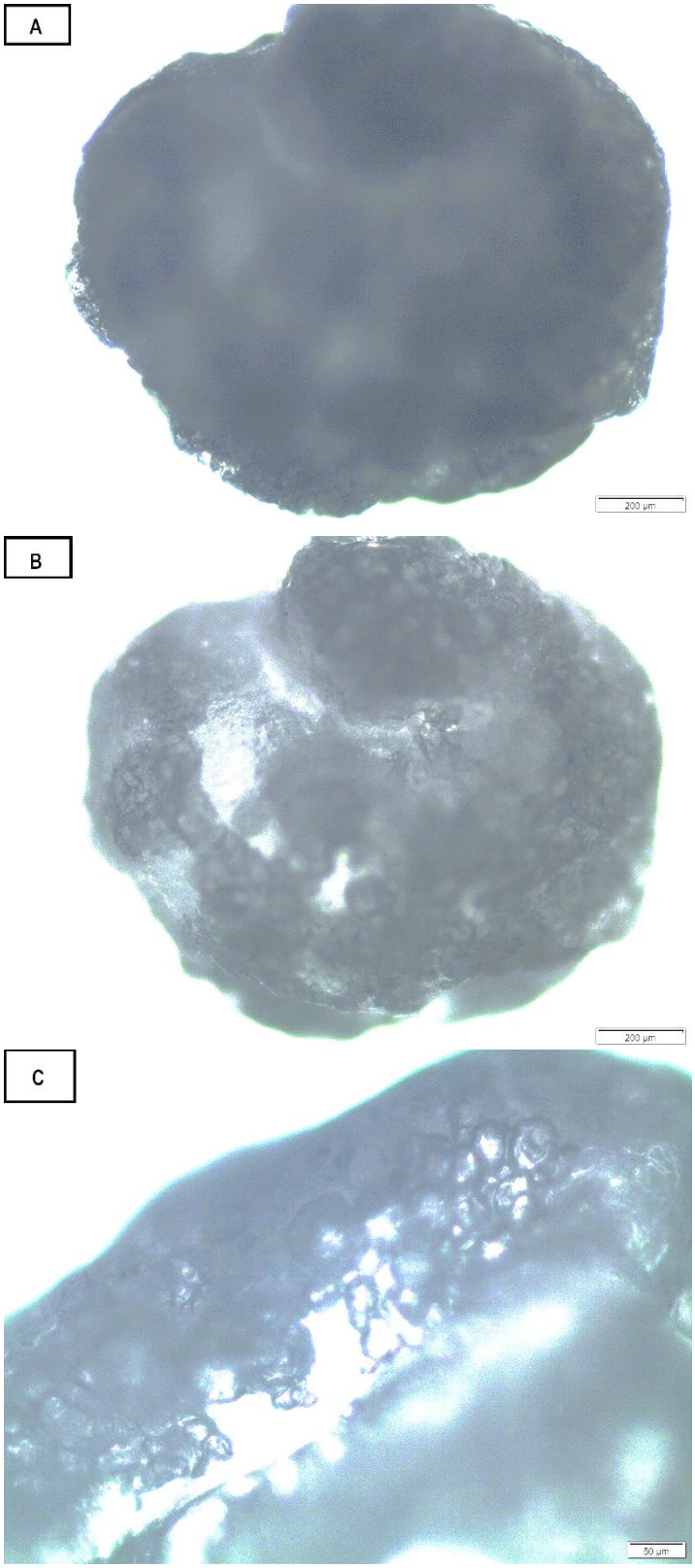
A estrutura das partículas foi avaliada através de microscópio óptico, utilizando-se lentes de 4x e 10x de aumento. Através da câmera fotográfica acoplada ao microscópio, obtiveram-se as imagens dessa análise, as quais estão apresentadas nas Figuras 9 a 13. As amostras liofilizadas foram analisadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) e as imagens estão apresentadas nas Figura 14, 15 e 16.

**Figura 9 –** Microscopia óptica da amostra produzida por gelificação iônica por extrusão sem recobrimento úmida (GISRU): (A) exterior (4x), (B) interior (4x) e (C) interior após amostra cortada ao meio (10x).



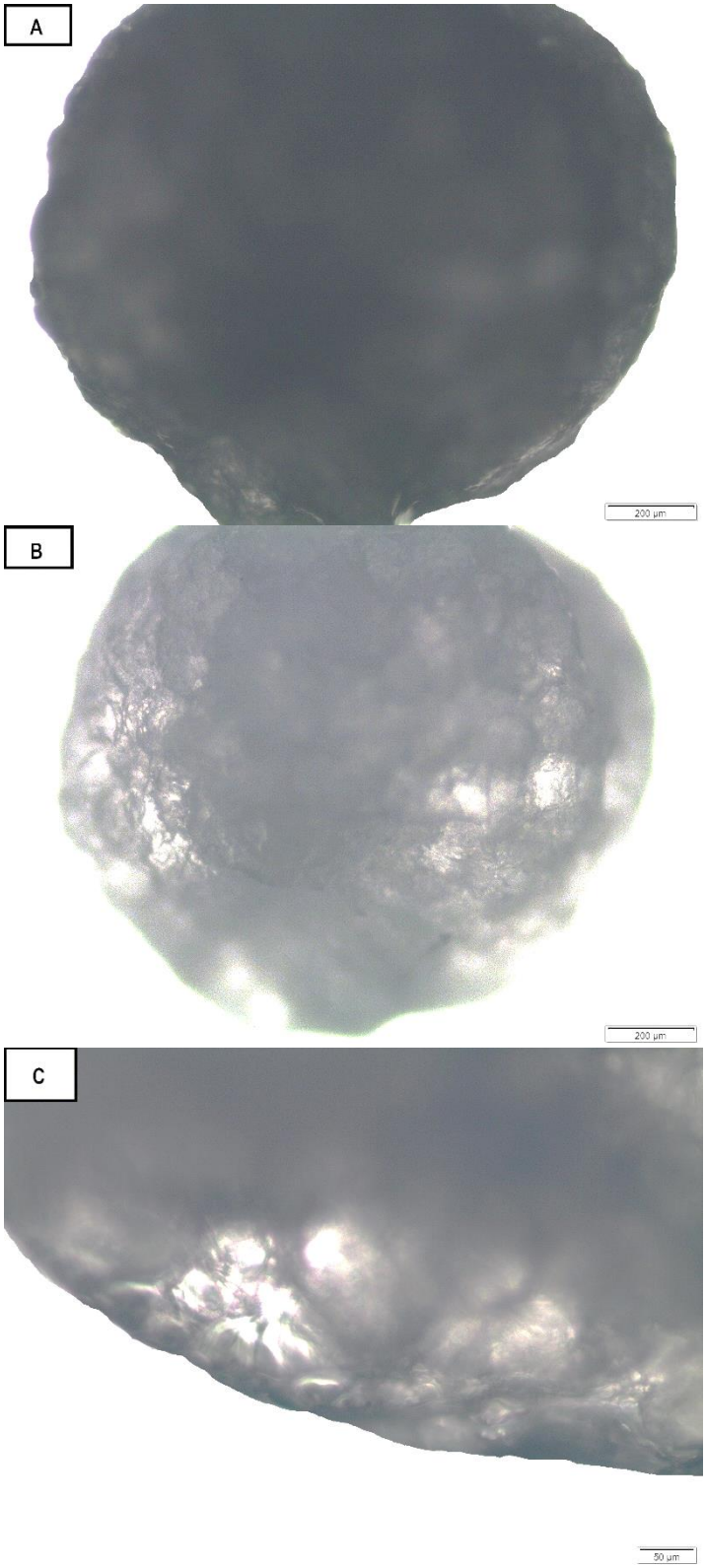

Fonte: Elaborado pelo autor.

**Figura 10 –** Microscopia óptica da amostra produzida por gelificação iônica por extrusão sem recobrimento liofilizada (GISRL): (A) exterior (4x), (B) interior (4x) e (C) interior após amostra cortada ao meio (10x).



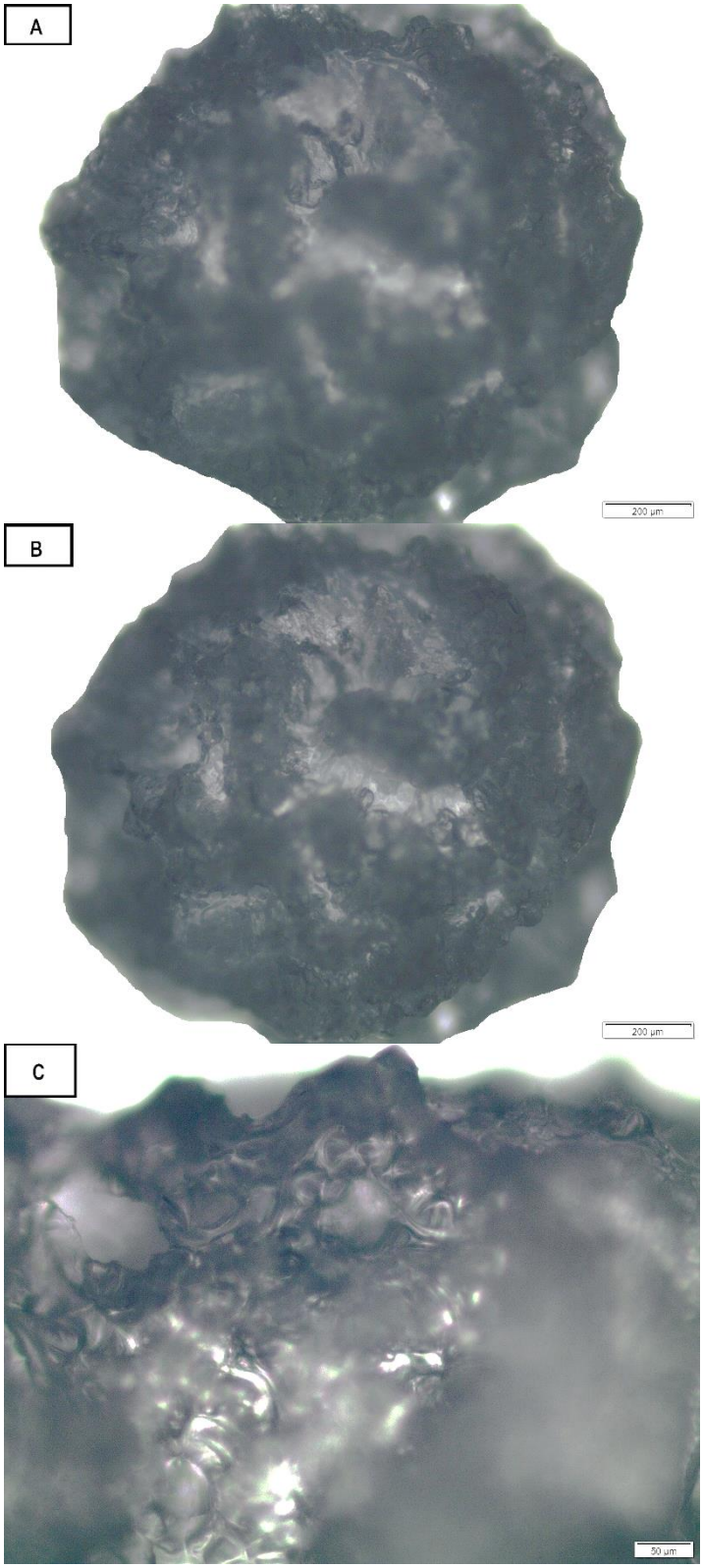

Fonte: Elaborado pelo autor.

**Figura 11 –** Microscopia óptica da amostra produzida por gelificação iônica por extrusão com recobrimento úmida (GICRU): (A) exterior (4x), (B) interior (4x) e (C) interior após amostra cortada ao meio (10x).



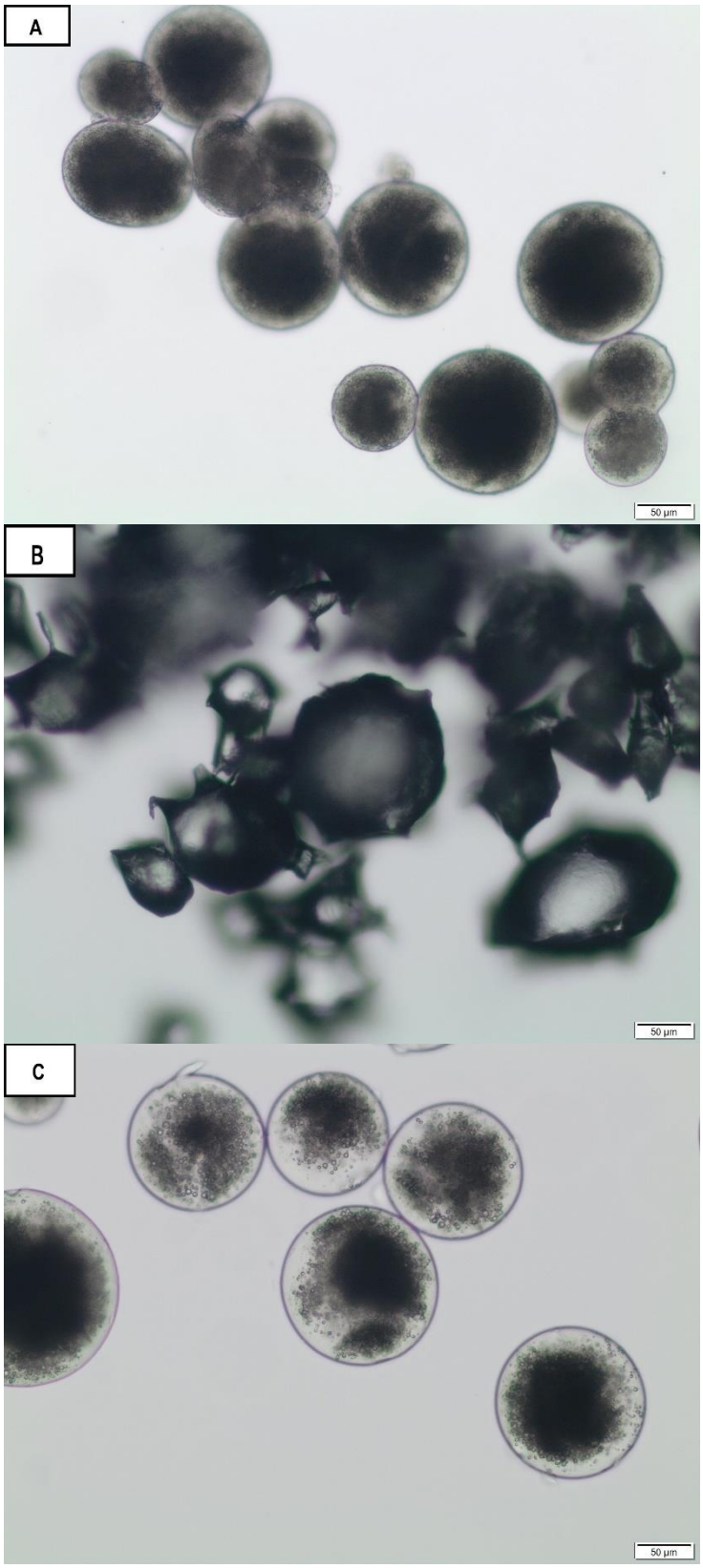

Fonte: Elaborado pelo autor.

**Figura 12 –** Microscopia óptica da amostra produzida por gelificação iônica por extrusão com recobrimento liofilizada (GICRL): (A) exterior (4x), (B) interior (4x) e (C) interior após amostra cortada ao meio (10x).



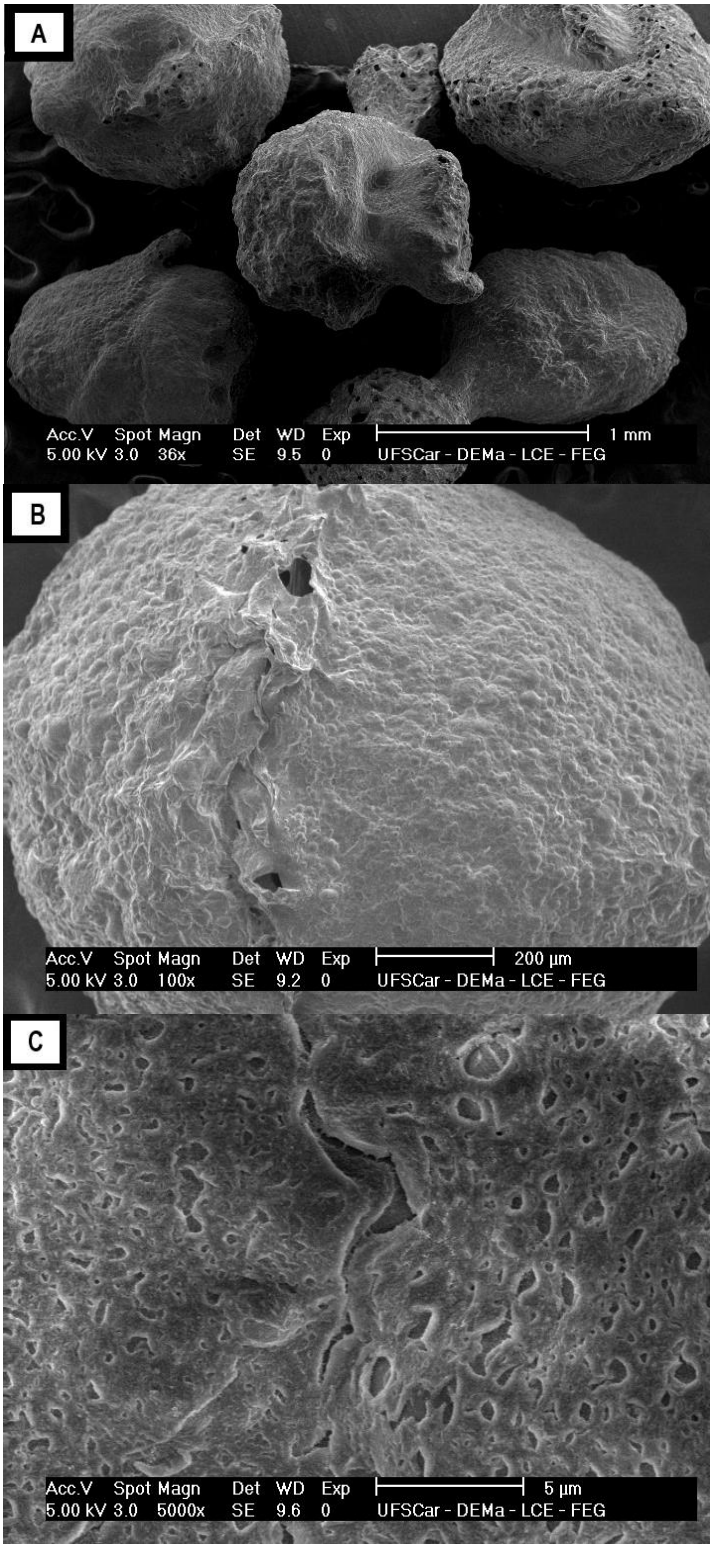

Fonte: Elaborado pelo autor.

**Figura 13 –** Microscopia óptica (10x) das amostras produzida por coacervação complexa: (A) úmida (CCU), (B) liofilizada (CCL) e (C) liofilizada reidratada (CCL).



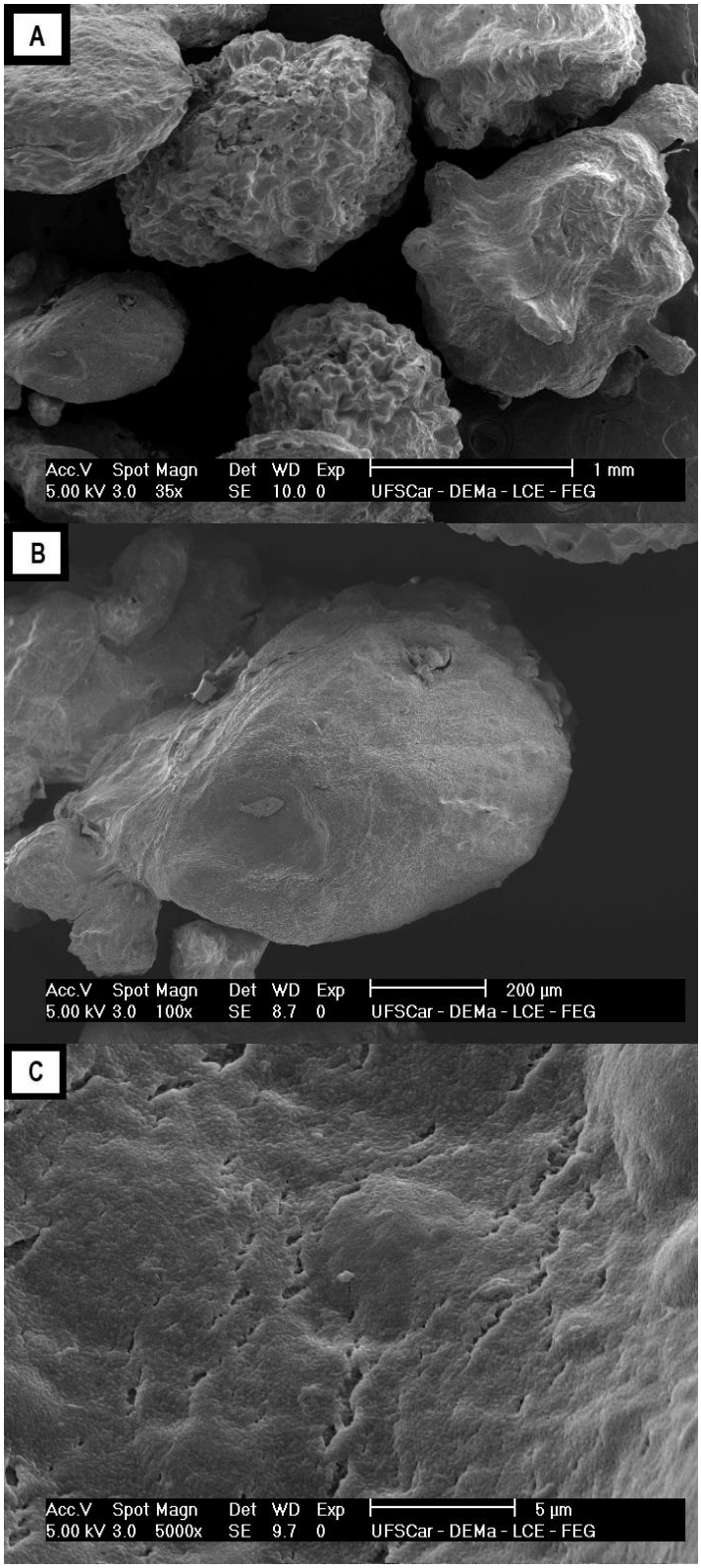

Fonte: Elaborado pelo autor.

**Figura 14 –** MEV da amostra de partículas liofilizadas de OEO encapsulado por gelificação iônica sem recobrimento com WPC (GISRL) com aumento de: (A) 36x, (B) 100x e (C) 5000x.



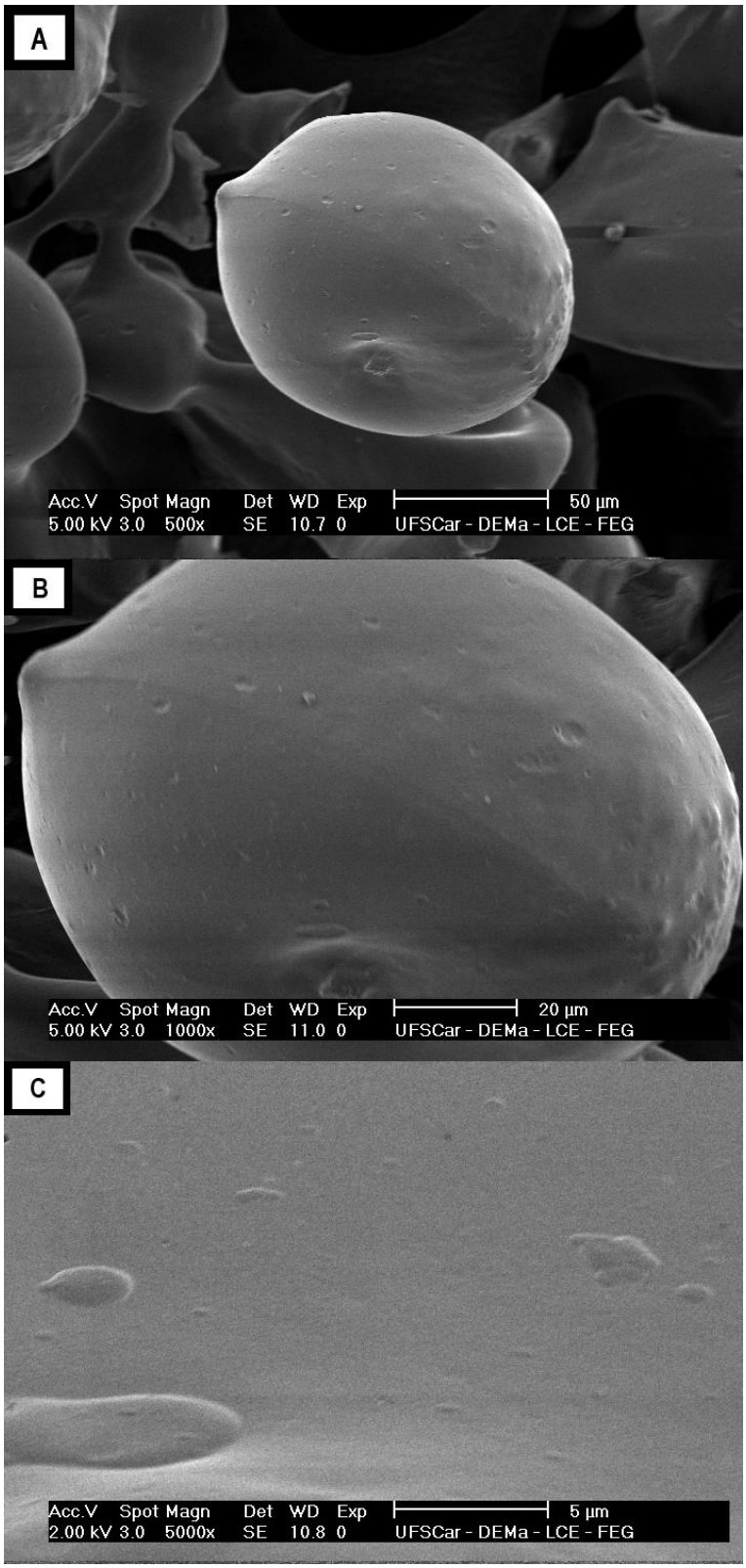

Fonte: Elaborado pelo autor.

**Figura 15 –** MEV da amostra de partículas liofilizadas de OEO encapsulado por gelificação iônica com recobrimento com WPC (GICRL) com aumento de: (A) 35x, (B) 100x e (C) 5000x.




Fonte: Elaborado pelo autor.

**Figura 16 –** MEV da amostra de partículas liofilizadas de OEO encapsulado por coacervação complexa (CCL): (A) 500x, (B) 1000x e (C) 5000x.




Fonte: Elaborado pelo autor.

As imagens demostram que ambos os processos de encapsulação formaram partículas esféricas, como esperado (RUTZ et al., 2017; SILVERIO et al., 2018), porém o processo de liofilização causou mudanças nas superfícies das partículas, deixando-as irregulares (Figuras 10(A), 12(A), 13(B), 14(A), 15(A) e 16(A)) e com presença de trincas superficiais, principalmente nas amostras produzidas por gelificação iônica (Figuras 14(C) e 15(C)). Além disso, pode-se observar, também, que a etapa de recobrimento por interação eletrostática com WPC nas amostras de OEO encapsulado por gelificação iônica por extrusão não alterou a superfície da partícula (Figuras 11(A), 12(A) e 15(A)), e aparentou, através das imagens obtidas por MEV, uma redução na porosidade da superfície da partícula liofilizada (Figura 15(C)). As partículas liofilizadas produzidas por coacervação complexa apresentaram uma superfície mais lisa e sem trincas (Figura 16), mostrando melhores resultados em relação às partículas liofilizadas produzidas por gelificação iônica por extrusão.

Através das Figuras 9(B), 11(B), percebe-se que ambos os processos de encapsulação fizeram com que o OEO ficasse disperso na matriz de alginato como pequenas gotas (Figuras 9(B) e 11(B)), o que não é tão evidente nas amostras liofilizadas (Figuras 10(B) e 12(B)), provavelmente devido à retirada de água presente na matriz de alginato, causando o deslocamento das gotas de OEO, que aparentam maior proximidade e concentração na superfície da partícula.

### 5.2.2 Diâmetro médio e distribuição de tamanho

O diâmetro médio e distribuição de tamanho das partículas foram avaliados por difração a laser. Tal análise resultou em dados de diâmetro médio ($D_{[4,3]}$ – diâmetro médio volumétrico ou de DeBroukere, em que o diâmetro é baseado no diâmetro médio de uma esfera de mesmo volume), $D_{10}$, $D_{50}$, $D_{90}$ e polidispersidade, indicada pelo *Span* (equação 6), os quais estão apresentados na Tabela 3. As Figuras 17 e 18 mostram a distribuição de tamanho para as amostras de OEO encapsulado por gelificação iônica e coacervação complexa, respectivamente.

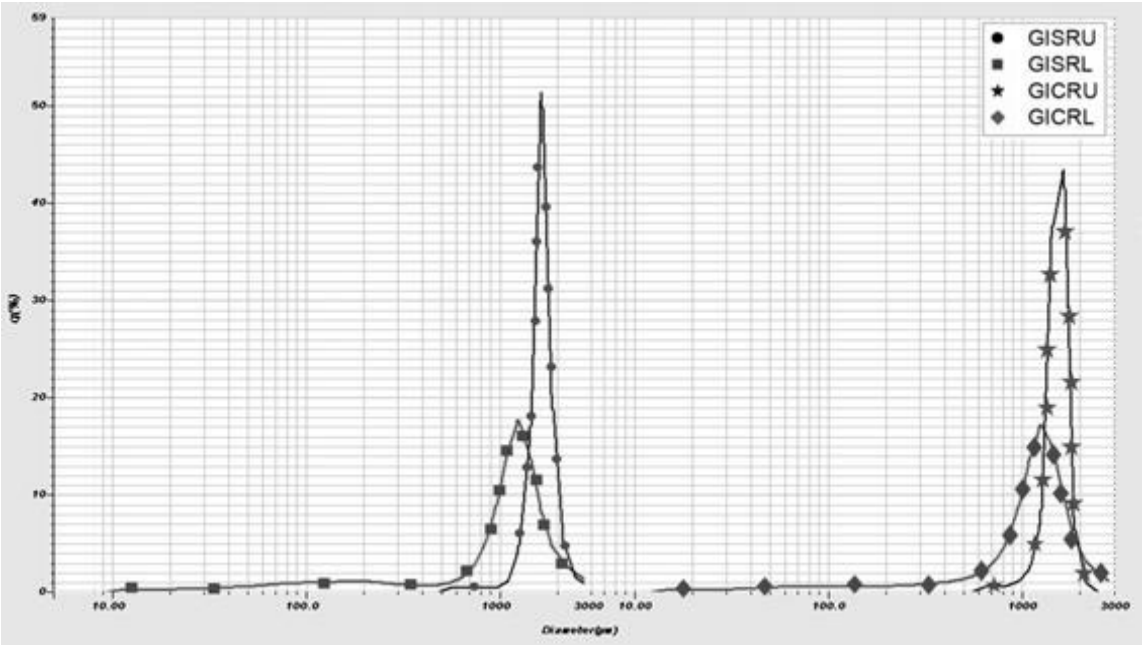
**Tabela 3 –** Diâmetro médio ($D_{[4,3]}$) e polidispersidade das amostras de OEO encapsulado por gelificação iônica e coacervação complexa.

| Amostra | $D_{[4,3]}$ (µm) | $D_{10}$ (µm) | $D_{50}$ (µm) | $D_{90}$ (µm) | *Span* |
|---|---|---|---|---|---|
| **GISRU** | 1619,2 ± 8,72$^{aA*}$ | 1285,5 ± 42,3 | 1605,7 ± 18,3$^{aA}$ | 1997,7 ± 74,3 | 0,44 ± 0,07$^{d}$ |
| **GISRL** | 1092,5 ± 43,1$^{bB}$ | 249,1 ± 45,1 | 1149,2 ± 30,2$^{bB}$ | 1707,5 ± 74,6 | 1,29 ± 0,06$^{b}$ |
| **GICRU** | 1564,5 ± 33,1$^{aA}$ | 1302,6 ± 29,8 | 1561,4 ± 29,6$^{aA}$ | 1850,7 ± 60,6 | 0,35 ± 0,01$^{d}$ |
| **GICRL** | 1144,7 ± 59,6$^{bB}$ | 289,0 ± 90,3 | 1173,3 ± 55,3$^{bB}$ | 1829,4 ± 39,1 | 1,32 ± 0,11$^{b}$ |
| **CCU** | 190,93 ± 1,36$^{cC}$ | 106,70 ± 0,91 | 177,19 ± 0,76$^{cD}$ | 296,70 ± 3,07 | 1,06 ± 0,02$^{c}$ |
| **CCL** | 177,13 ± 4,76$^{dD}$ | 67,99 ± 1,04 | 157,78 ± 3,30$_{dE}$ | 313,35 ± 11,73 | 1,55 ± 0,04$^{a}$ |

*Valores da mesma coluna com letras minúsculas diferentes e valores da mesma linha com letras maiúsculas diferentes são significativamente diferentes ($p < 0,05$).

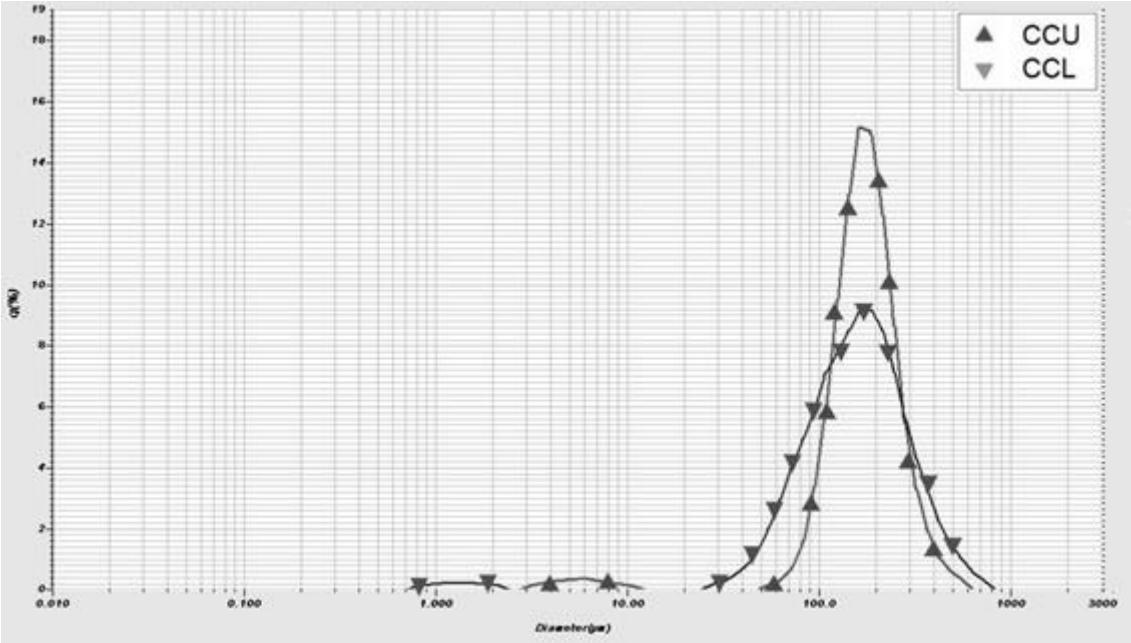
Fonte: Elaborado pelo autor.

**Figura 17 –** Distribuição de tamanho para as amostras de OEO encapsulado por gelificação iônica.




Fonte: Elaborado pelo autor.

**Figura 18 –** Distribuição de tamanho para as amostras de OEO encapsulado por coacervação complexa.




Fonte: Elaborado pelo autor.

As partículas produzidas por gelificação iônica apresentaram diâmetro médio ($D_{[4,3]}$) entre 1092,5 e 1619,2 µm, enquanto as partículas coacervadas tiveram diâmetro médio de 177,13 e 190,93 µm para a amostra liofilizada e úmida, respectivamente.

Através da comparação do tamanho médio das amostras úmidas com as amostras liofilizadas percebe-se, claramente, um efeito de encolhimento causado pelo processo de liofilização (Tabela 3 e Figuras 17 e 18). As amostras produzidas por gelificação iônica, sem e com recobrimento com WPC, tiveram uma redução de, aproximadamente, 30 %, enquanto a amostra produzida por coacervação complexa teve uma redução de, aproximadamente, 40 %. Esse efeito é principalmente atribuído à remoção de água das partículas. Além disso, o processo de liofilização também causou um aumento do índice de polidispersidade (*Span*) das amostras. Como visto na Figura 16.A, o processo de liofilização resultou na formação de pontes entre partículas que, quando úmidas estariam isoladas, o que pode ter influenciado nos resultados de diâmetro médio obtidos para as partículas produzidas por coacervação complexa.

Os gráficos apresentados nas Figuras 17 e 18 mostram que a distribuição de tamanho das amostras segue uma curva unimodal normal, apesar da presença de

uma longa cauda no início das curvas das amostras liofilizadas produzidas por gelificação iônica (GISRL e GICRL) e de ambas as amostras, úmida e liofilizada, produzidas por coacervação complexa. A cauda presente nas amostras liofilizadas pode ser explicada devido ao fato do processo de congelamento e posterior liofilização causar pequenas rupturas nas partículas, levando a muitas partículas menores e fragmentos e, consequentemente, aos maiores valores de *Span* dessas amostras. A cauda presente na amostra úmida produzida por coacervação complexa mostra que o processo produz partículas com tamanhos variados, o que causa, também, um maior *Span* em relação às amostras úmidas produzidas por gelificação iônica (Tabela 3).

O processo de revestimento por interação eletrostática com WPC não afetou significativamente o diâmetro médio das partículas e a polidispersidade de partículas de alginato úmidas e liofilizadas. Silverio et al. (2018) relataram aumento do diâmetro médio de partículas de alginato úmidas após revestimento por interação eletrostática com proteínas de soja. No entanto, os índices de polidispersidade encontrados para suas amostras (na faixa de 1,67 a 2,16) foram superiores aos observados no presente trabalho para as amostras GISRU e GICRU, o que é explicado por suas partículas terem sido produzidas por atomização ao invés de gotejamento por extrusão. Os altos índices de polidispersidade dificultam observações conclusivas sobre os efeitos do revestimento proteico no tamanho das partículas.

Através dos baixos valores de $D_{10}$ encontrados para as amostras liofilizadas (Tabela 3) e o consequente deslocamento de $D_{50}$, que representa a mediana da curva de distribuição, percebe-se que não houve diferença significativa entre o diâmetro médio volumétrico ($D_{[4,3]}$) e os valores da mediana para as amostras produzidas por gelificação iônica. Isso mostra que, apesar do surgimento de partículas menores e fragmentos devido ao processo de desidratação, a maioria das partículas continuou com diâmetros médios próximos ao $D_{[4,3]}$. Tal resultado não foi observado para as partículas produzidas por coacervação complexa, já que, neste caso, houve diferença significativa entre o $D_{[4,3]}$ e o $D_{50}$ das partículas liofilizadas e úmidas, mostrando uma maior quantidade de partículas próximas a $D_{10}$ e resultando em menores valores de $D_{50}$.

## 5.2 Desempenho de encapsulação

As Tabelas 4 e 5 mostram os resultados obtidos para o desempenho da encapsulação do óleo essencial de orégano, incluindo capacidade de retenção e capacidade de carga das partículas produzidas por gelificação iônica por extrusão, e capacidade de retenção e eficiência de encapsulação das partículas produzidas por coacervação complexa.

**Tabela 4 –** Desempenho de encapsulação das partículas carregadas com óleo essencial de orégano encapsulado por gelificação iônica por extrusão.

| Amostra | CC[1] (%) | CR[2] (%) |
|---|---|---|
| **GISRU** | 77,26 ± 0,005[ab]* | 71,33 ± 0,003[ab] |
| **GISRL** | 64,19 ± 0,017[c] | 57,58 ± 0,014[c] |
| **GICRU** | 78,64 ± 0,012[a] | 73,26 ± 0,012[a] |
| **GICRL** | 74,49 ± 0,013[b] | 67,23 ± 0,019[b] |

1: CC – capacidade de carga; 2: CR – capacidade de retenção. *Valores da mesma coluna com letras diferentes são significativamente diferentes ($p < 0,05$).

Fonte: Elaborado pelo autor.

**Tabela 5 –** Desempenho de encapsulação das partículas carregadas com óleo essencial de orégano encapsulado por coacervação complexa.

| Amostra | CR[1] (%) | EE[2] (%) |
|---|---|---|
| **CCU** | 66,12 ± 0,007[a]* | 90,84 ± 0,004[a] |
| **CCL** | 64,58 ± 0,007[a] | 88,84 ± 0,002[b] |

1: CR – capacidade de retenção; 2: EE – eficiência de encapsulação. *Valores da mesma coluna com letras diferentes são significativamente diferentes ($p < 0,05$).

Fonte: Elaborado pelo autor.

As amostras produzidas por gelificação iônica apresentaram boas capacidades de carga e retenção (Tabela 4), principalmente as partículas úmidas. Para ambos os parâmetros, a amostra GICRU apresentou os maiores resultados, enquanto a amostra GISRL apresentou os menores valores, embora as análises estatísticas tenham mostrado que não houve diferença significativa entre as amostras úmidas com recobrimento com WPC (GICRU) e sem recobrimento com WPC (GISRU), a qual, por

sua vez, não mostrou diferença significativa com a amostra com recobrimento liofilizada (GICRL). Estes resultados mostram que o processo de recobrimento por interação eletrostática com WPC aumentou o desempenho de encapsulação das partículas de alginato, principalmente para a amostra liofilizada. O processo de liofilização, por sua vez, teve o efeito oposto, já que ambas as amostras liofilizadas tiveram valores significativamente menores de CC e CR quando comparadas com as amostras úmidas correspondentes. Tais resultados podem estar relacionadas à presença de trincas nas superfícies das partículas e à possível perda de compostos voláteis juntamente com a sublimação da água durante a liofilização.

As amostras produzidas por coacervação complexa apresentaram boa capacidade de retenção e eficiência de encapsulação (Tabela 5). Para ambos os parâmetros, a amostra CCU apresentou os maiores resultados, embora as análises estatísticas tenham mostrado que não houve diferença significativa entre as amostras para a capacidade de retenção. Estes resultados mostram que o processo de liofilização causou uma leve redução dos valores de CR e EE, assim como observado para as partículas produzidas por gelificação iônica. Tal redução foi menor quando comparada às amostras de gelificação iônica, provavelmente devido à maior homogeneidade da estrutura da partícula, a qual não apresentou porosidade e trincas na superfície, como visto na Figura 16, além do fato das partículas possuírem menores diâmetros médios, o que as torna menos susceptíveis aos efeitos da formação de cristais de gelo.

Comparando-se a capacidade de retenção de óleo para ambos os processos de encapsulação, observa-se que as amostras produzidas por gelificação iônica, com exceção da amostra sem recobrimento liofilizada (GISRL), tiveram maiores valores, mostrando, assim, que tal processo é mais vantajoso quando se quer uma menor perda de óleo essencial durante a encapsulação.

Hosseini et al. (2013b) avaliaram a capacidade de retenção e de carga de óleo essencial da planta do gênero *Satureja hortensis* em partículas úmidas de alginato produzidas por gelificação iônica, as quais variaram de 52,40 a 66,37 % e 20,27 a 26,13 %, respectivamente. Arana-Sánchez et al. (2010) e Hernández-Hernández et al. (2017) encapsularam OEO mexicano por *spray-drying* em β-ciclodextrina e amido modificado, respectivamente, obtendo valores de eficiência de encapsulação entre 53,90 e 81,03 %. Dima et al. (2016) avaliaram a encapsulação de óleo essencial de

coentro por *spray drying* em alginato, inulina e quitosana e suas misturas, observando que o alginato resultou na maior eficiência de encapsulação, que variou na faixa de 51 a 63 %. Benavides et al. (2016) encapsularam óleo essencial de tomilho em microesferas de alginato e encontraram valores de eficiência de encapsulação de até 85 % e de capacidade de carga de 56 %.

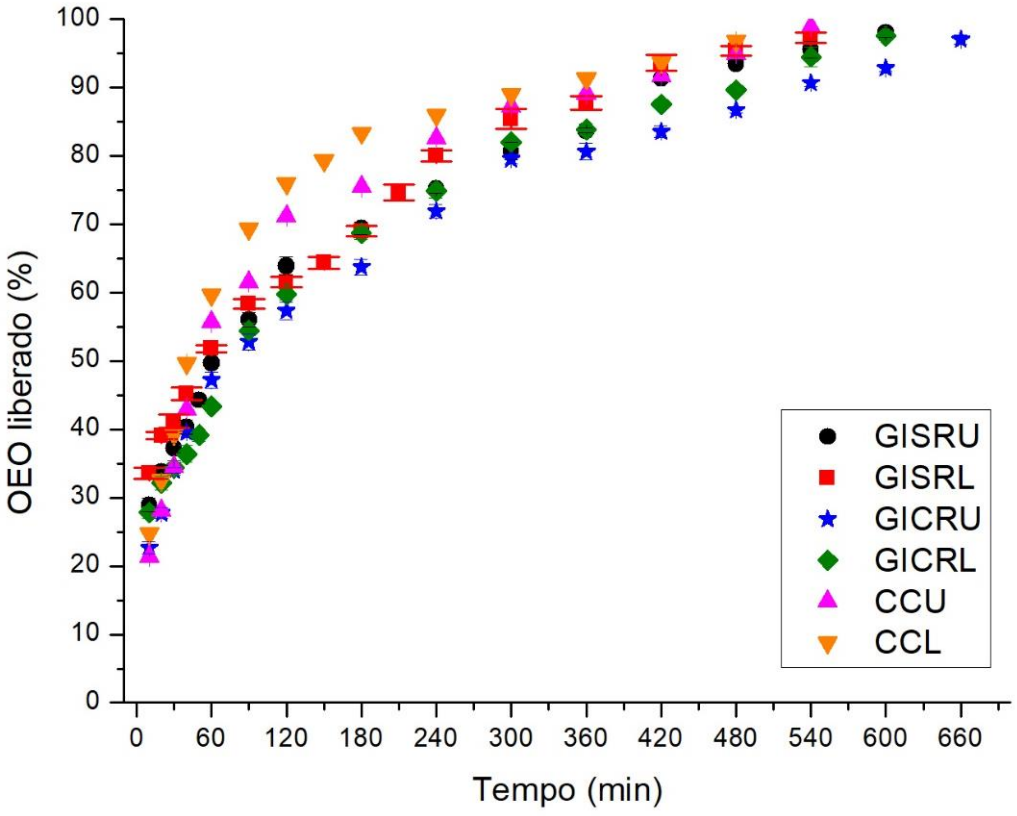
Rutz et al. (2017) encapsulou óleo de palma em quitosana/pectina e quitosana/xantana por coacervação complexa e, após secagem por liofilização e atomização, obteve eficiências de encapsulação variando de 22,25 a 62,41 %. Manaf et al. (2018) encontraram valores de 94 % de eficiência de encapsulação para partículas carregadas com óleo essencial de citronela em goma arábica e gelatina produzidas por coacervação simples e complexa. Rojas-Moreno et al. (2018) avaliaram a eficiência de encapsulação de partículas úmidas e desidratadas de óleo essencial de laranja produzidas por coacervação complexa, obtendo valores de 88 a 94 % para as primeiras e maiores que 80 % para as segundas.

Os valores de desempenho de encapsulação variam muito em função dos métodos de encapsulação e materiais de parede utilizados, dificultando uma comparação direta com estudos anteriores. No presente estudo encontraram-se resultados em uma faixa de médios a altos valores, o que indica um bom desempenho de encapsulação.

### 5.3 Cinética de liberação *in vitro*

A cinética de liberação *in vitro* foi estudada em condições análogas a uma solução de marinação dos filés de peito de frango, assim como descrito no Item 4.5. Os perfis de liberação estão apresentados na Figura 19.

**Figura 19 –** Curvas de cinética de liberação in vitro de OEO encapsulado pelos métodos de gelificação iônica e coacervação complexa.




Fonte: Elaborado pelo autor.

A avaliação da cinética de liberação de OEO encapsulado em alginato ou gelatina/goma arábica, afetadas pelo recobrimento com WPC e/ou liofilizadas, em meio líquido simulando condições análogas à solução de marinação a temperatura de refrigeração (5 ± 0,5 °C), revelou que nos primeiros 10 minutos houve uma liberação cumulativa de 20 a 30 % do OEO encapsulado nas partículas (Figura 19). No caso das partículas produzidas por coacervação complexa, pode-se considerar que aproximadamente 10 a 13 % do óleo liberado nos 10 primeiros minutos estava preso na matriz, enquanto o restante estava retido na superfície, como se conclui a partir dos resultados obtidos para eficiência de encapsulação (Tabela 5). Além disso, as amostras apresentaram uma fase inicial crescente de liberação (*burst release*) nos primeiros 60 minutos, liberando, aproximadamente 50 - 60 % do OEO retido (Figura 19). Tal fase pode estar relacionada ao óleo superficial e às gotas aprisionadas próximas à superfície da partícula, além da alta porosidade superficial das partículas produzidas por gelificação iônica (DIMA et al., 2016; HOSSEINI et al., 2013b). Após

essa liberação inicial, foi necessário um tempo de 6 horas (360 minutos) ou mais, de acordo com o tratamento, para liberar o conteúdo quase total de OEO das partículas para o meio líquido (Figura 19).

Em geral, o processo de liofilização causou uma aceleração na taxa de liberação do OEO, a qual pode ser explicada pelo acentuado efeito de encolhimento da liofilização, além do aumento da porosidade, como discutido anteriormente no item 5.1. A sublimação da água presente na partícula pode fazer com que o OEO retido no interior se torne mais acessível, causando uma liberação mais rápida. Além disso, a liofilização causou uma redução no diâmetro médio das partículas e aumentou as irregularidades da superfície, aumentando a área superficial e, então, influenciando diretamente a taxa de liberação do composto encapsulado. A mesma tendência foi observada por Hosseini et al. (2013a) e Hosseini et al. (2013b), que relataram liberação mais rápida para amostras com partículas menores. A influência do tamanho da partícula explica, também, a redução no tempo de liberação das partículas produzidas por coacervação complexa em comparação com as produzidas por gelificação iônica, uma vez que essas são, aproximadamente, 90 % menores. Uma exceção para este comportamento foi observada nos primeiros 60 minutos, após as partículas recobertas com WPC e liofilizadas (GICRL) liberarem uma quantidade menor de OEO do que as partículas úmidas correspondentes (GICRU). Isso pode estar relacionado à menor porosidade da amostra GICRL, como observado na Figura 15, que poderia desacelerar a liberação inicial, embora apenas por tempo limitado, já que essa camada protetora pode ser solubilizada devido à alta concentração de NaCl presente no meio de liberação. O efeito do recobrimento com WPC sobre a desaceleração inicial da liberação também levou a menores percentuais cumulativos de OEO liberado ao comparar as partículas recobertas com as não recobertas com proteína (GISRU versus GICRU e GISRL versus GICRL), indicando que a camada superficial de WPC adsorvida por interação eletrostática possivelmente seria capaz de modular a taxa de liberação do OEO encapsulado em partículas de alginato em meio líquido com menor força iônica do que a aplicada no presente estudo.

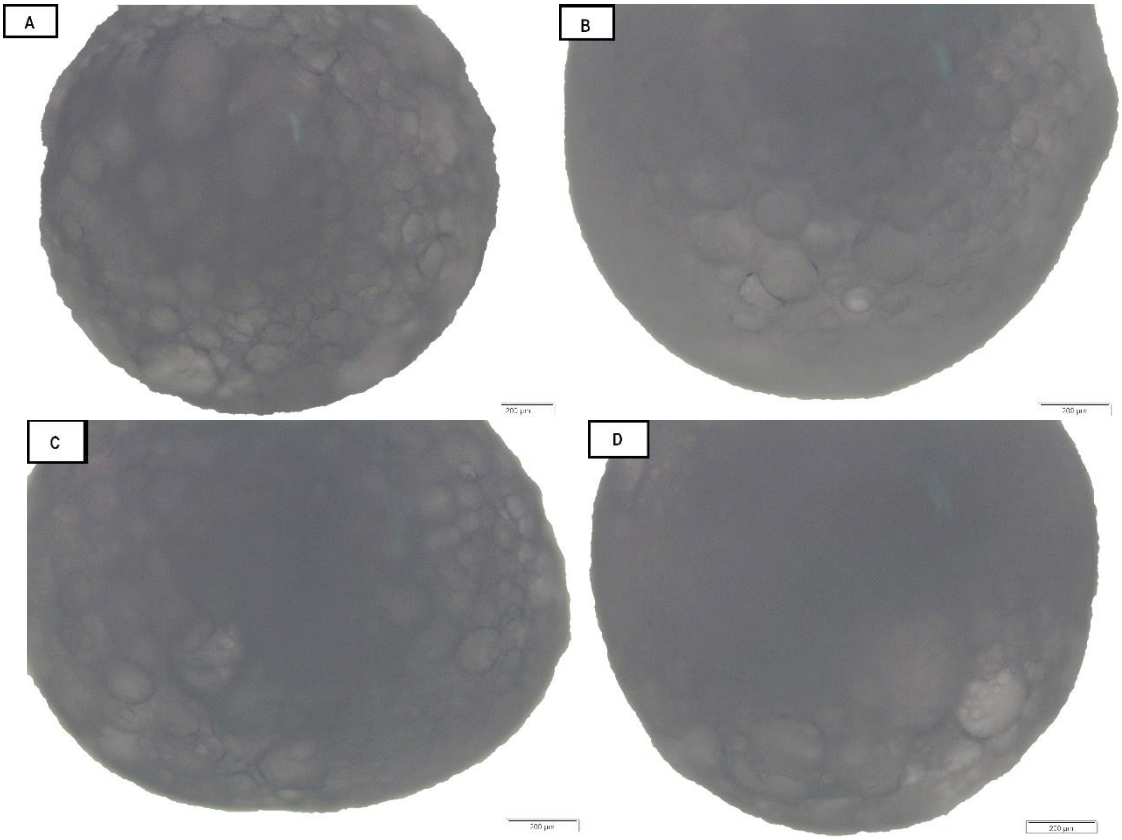
Após a fase inicial crescente de liberação (*burst* release), outros mecanismos podem desempenhar papéis paralelos e subsequentes na liberação do OEO. Possíveis mecanismos incluem difusão, inchamento, erosão e desintegração das partículas (MADERUELO; ZARZUELO; LANAO, 2011). Uma indicação do principal

mecanismo que impulsiona a liberação de um material encapsulado pode ser obtida pela modelagem dos dados experimentais da cinética de liberação (SIEPMANN; PEPPAS, 2012), a qual está apresentada no item 5.4.

### 5.3.1 Alterações morfológicas e estruturais das partículas durante os ensaios de liberação

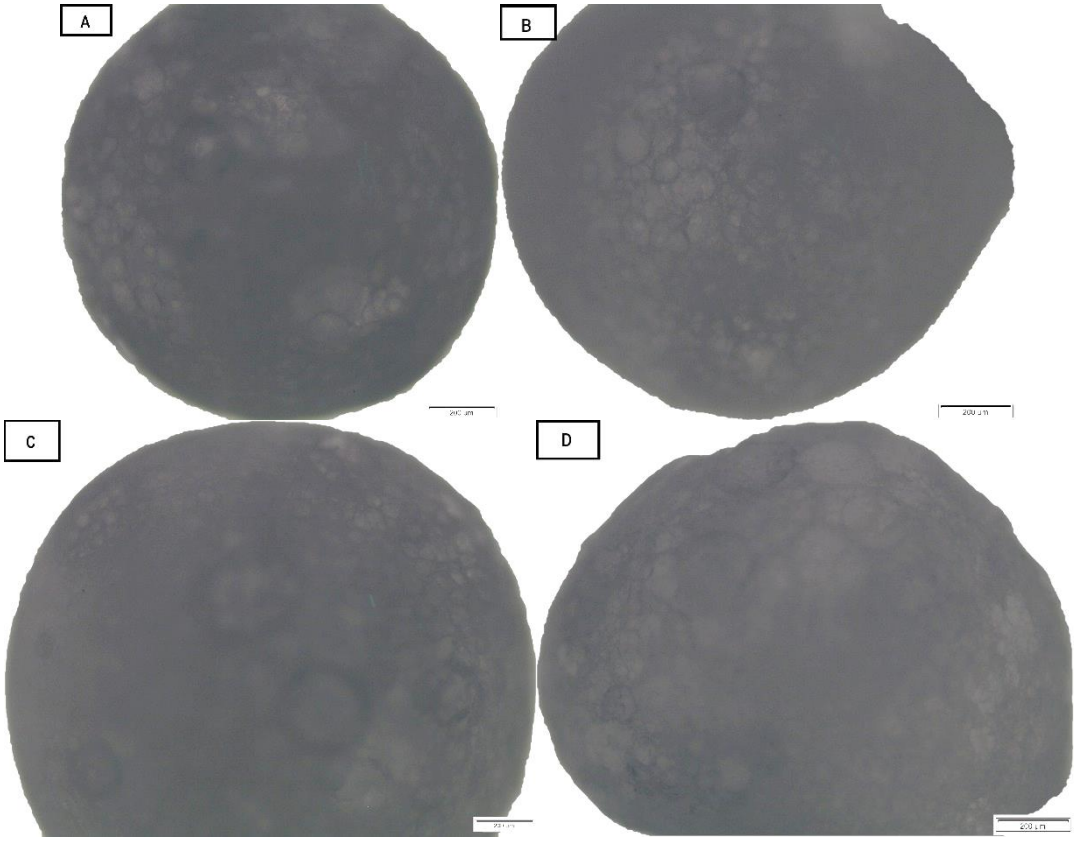
As alterações de estrutura e morfologia das partículas durante os ensaios de liberação foram avaliadas por microscopia óptica e estão apresentadas nas Figuras 20 a 25.

**Figura 20 –** Microscopia óptica (4x) das alterações estruturais e morfológicas da amostra GISRU durante a cinética de liberação: (A) 10 minutos, (B) 60 minutos, (C) 360 minutos e (D) 540 minutos.



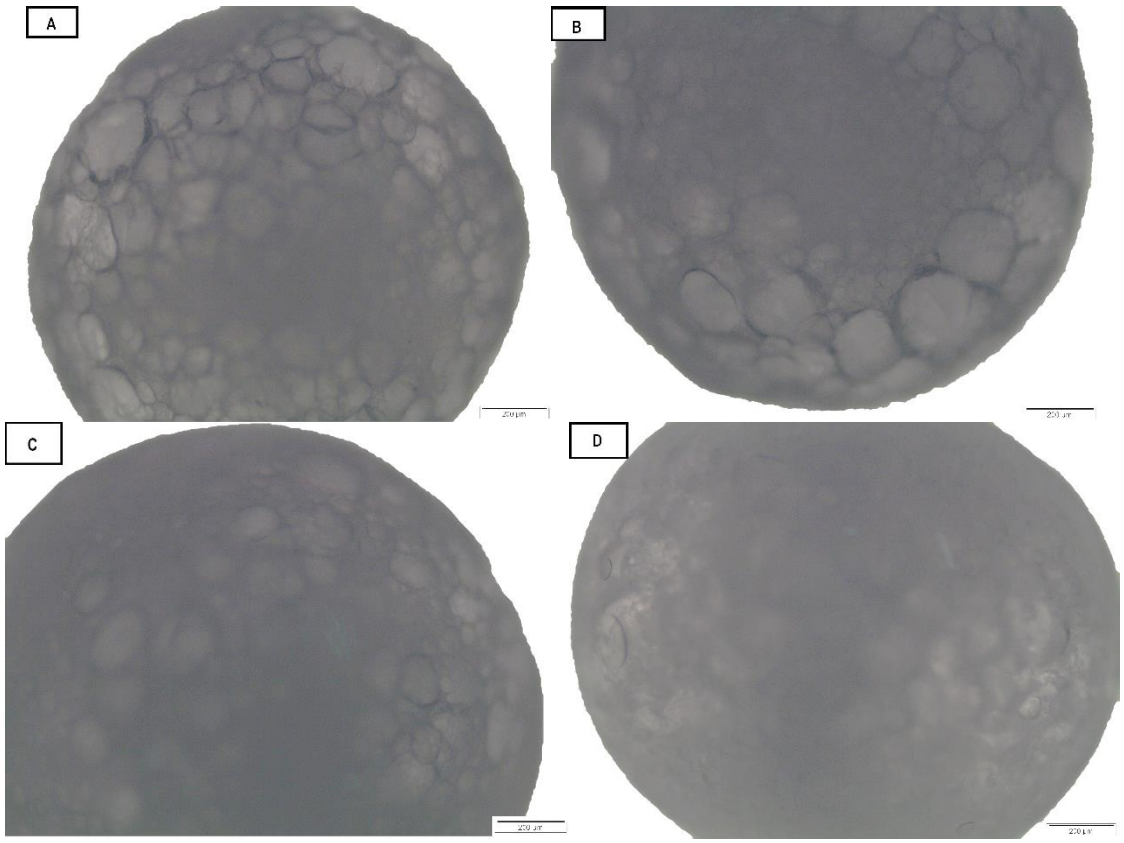

Fonte: Elaborado pelo autor.

**Figura 21 –** Microscopia óptica (4x) das alterações estruturais e morfológicas da amostra GISRL durante a cinética de liberação: (A) 10 minutos, (B) 60 minutos, (C) 360 minutos e (D) 540 minutos.



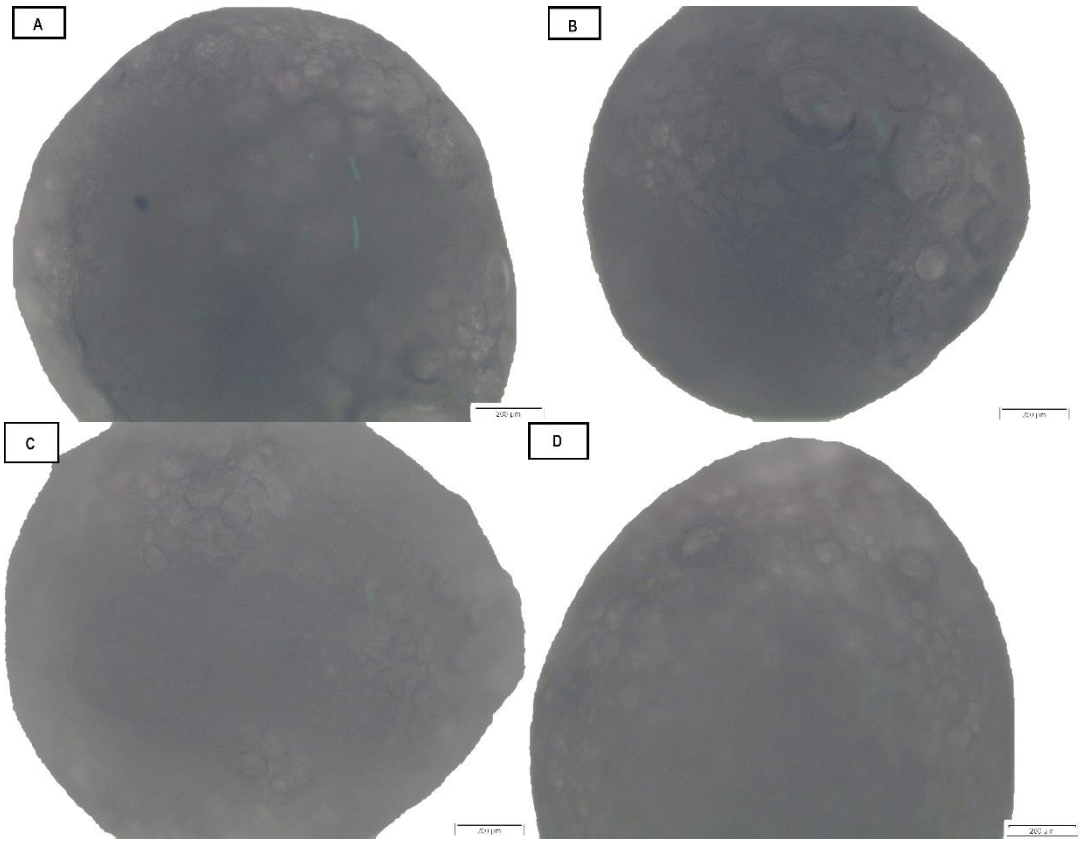

Fonte: Elaborado pelo autor.

**Figura 22 –** Microscopia óptica (4x) das alterações estruturais e morfológicas da amostra GICRU durante a cinética de liberação: (A) 10 minutos, (B) 60 minutos, (C) 360 minutos e (D) 540 minutos.



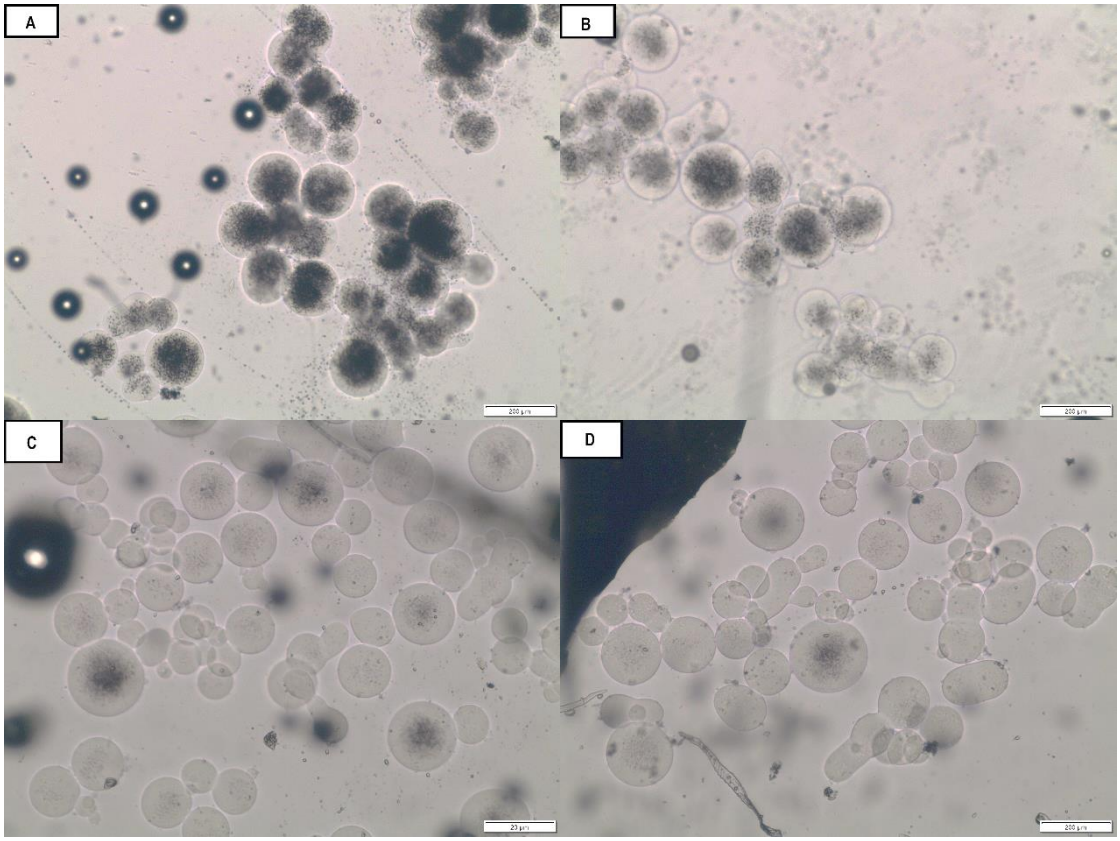

Fonte: Elaborado pelo autor.

**Figura 23 –** Microscopia óptica (4x) das alterações estruturais e morfológicas da amostra GICRL durante a cinética de liberação: (A) 10 minutos, (B) 60 minutos, (C) 360 minutos e (D) 540 minutos.



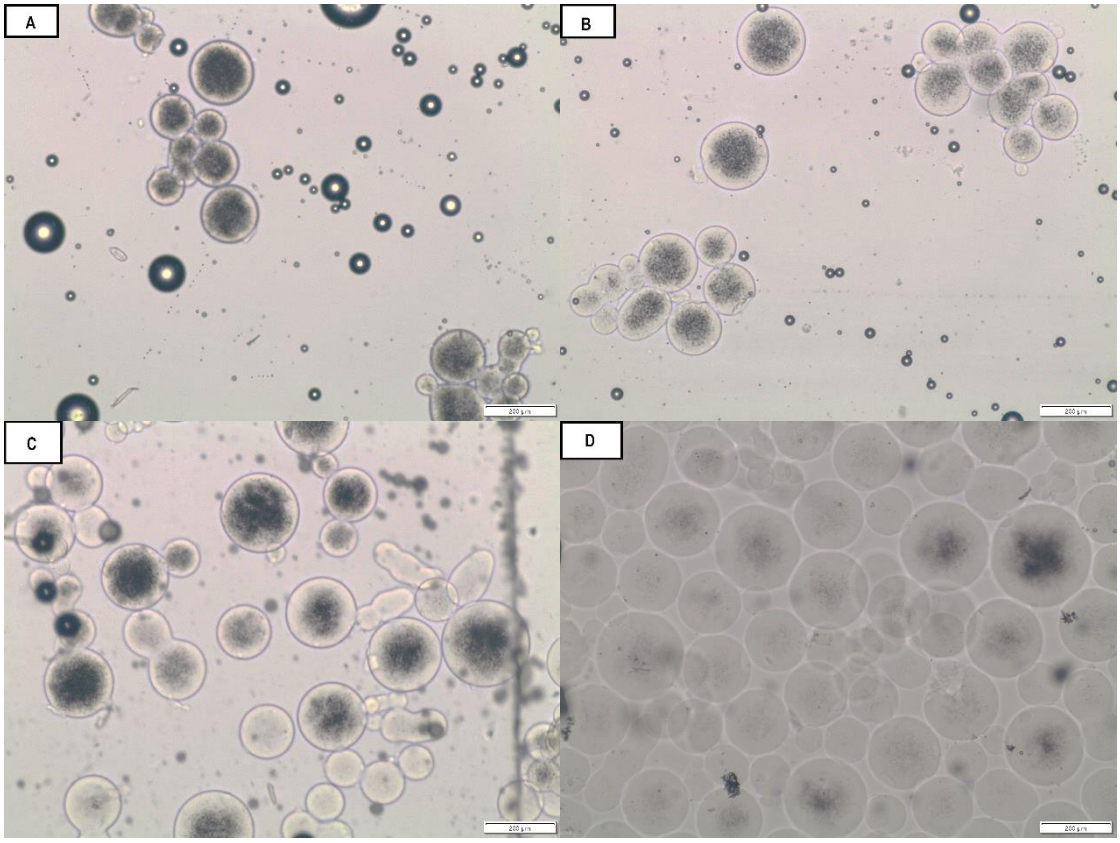

Fonte: Elaborado pelo autor.

**Figura 24 –** Microscopia óptica (10x) das alterações estruturais e morfológicas da amostra CCU durante a cinética de liberação: (A) 10 minutos, (B) 60 minutos, (C) 240 minutos e (D) 420 minutos.




Fonte: Elaborado pelo autor.

**Figura 25 –** Microscopia óptica (10x) das alterações estruturais e morfológicas da amostra CCL durante a cinética de liberação: (A) 10 minutos, (B) 60 minutos, (C) 240 minutos e (D) 420 minutos.




Fonte: Elaborado pelo autor.

A partir da análise das partículas por microscopia óptica durante os ensaios de liberação, é possível observar que nas partículas de alginato as gotas de OEO começam a ficar mais próximas da superfície, principalmente nas partículas úmidas (Figuras 20(D) e 22(D)), enquanto nas partículas de gelatina/goma arábica percebe-se o desaparecimento do OEO (Figuras 24(D) e 25(D)). Porém, observa-se que não há dissolução ou erosão das partículas, provavelmente em função da baixa temperatura (temperatura de refrigeração) utilizada nos ensaios de liberação, além da estabilidade da interação para as amostras produzidas por gelificação iônica, o que nos deixa a difusão e inchamento como possíveis causas da liberação do OEO em meio líquido simulando solução análoga a solução de marinação.

### 5.3.2 Alterações no diâmetro médio das partículas durante os ensaios de liberação

Os diâmetros médios das partículas durante a liberação estão apresentados na Tabelas 6 e 7 e as variações de tamanho estão apresentadas nas Figuras 26 e 27.

**Tabela 6 –** Diâmetro médio das amostras de OEO encapsulado por gelificação iônica durante ensaios de liberação *in vitro*.

| **Tempo (min)** | **Diâmetro médio (µm)** | | | |
|---|---|---|---|---|
| | **GISRU** | **GISRL** | **GICRU** | **GICRL** |
| 0 | 1619,2 ± 8,72[d]* | 1092,5 ± 43,1[e] | 1564,5 ± 33,1[c] | 1144,7 ± 59,6[e] |
| 10 | 1792,0 ± 255,6[c] | 1584,0 ± 229,8[d] | 1679,0 ± 233,4[b] | 1606,2 ± 218,7[d] |
| 60 | 1805,2 ± 227,9[c] | 1767,7 ± 209,3[c] | 2003,5 ± 277,9[a] | 1785,3 ± 206,6[c] |
| 360 | 1894,0 ± 278,3[b] | 1810,2 ± 227,0[b] | 2033,0 ± 214,2[a] | 1936,8 ± 184,5[b] |
| 540 | 2093,3 ± 264,8[a] | 2027,0 ± 237,5[a] | 2041,5 ± 206,0[a] | 2167,7 ± 245,5[a] |

*Valores da mesma coluna com letras diferentes são significativamente diferentes ($p < 0,05$).

Fonte: Elaborado pelo autor.

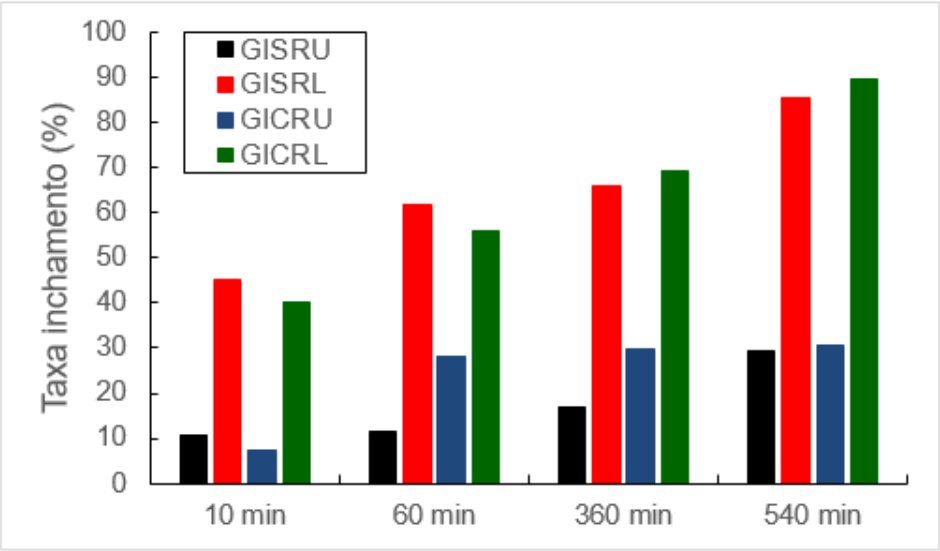
**Tabela 7 –** Diâmetro médio das amostras de OEO encapsulado por coacervação complexa durante ensaios de liberação *in vitro*.

| **Tempo (min)** | **Diâmetro médio (µm)** | |
|---|---|---|
| | **CCU** | **CCL** |
| 0 | 190,93 ± 1,36[a]* | 177,13 ± 4,76[a] |
| 10 | 141,71 ± 41,19[b] | 144,93 ± 46,59[b] |
| 60 | 125,68 ± 42,80[c] | 144,08 ± 36,92[b] |
| 240 | 124,39 ± 32,40[c] | 142,11 ± 31,26[b] |
| 420 | 122,40 ± 32,02[c] | 133,24 ± 47,34[c] |

*Valores da mesma coluna com letras diferentes são significativamente diferentes ($p < 0,05$).

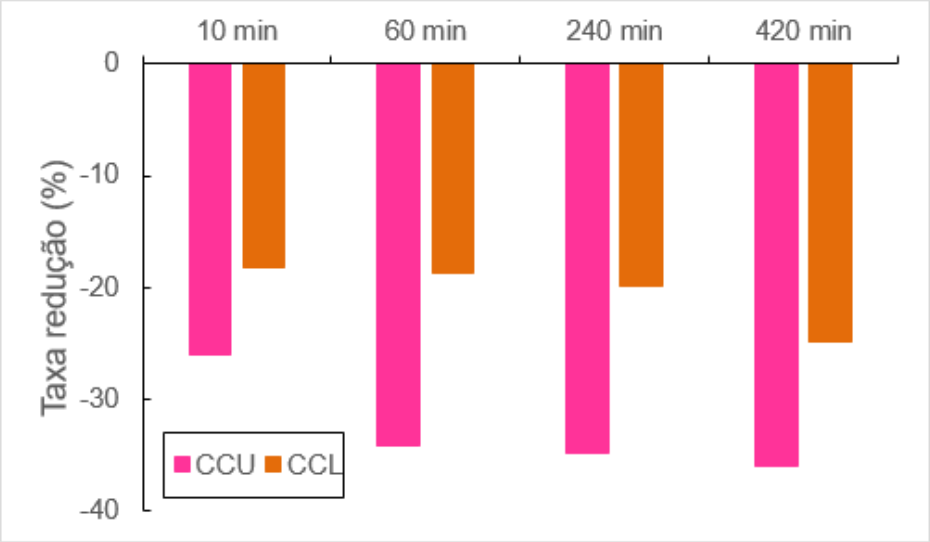
Fonte: Elaborado pelo autor.

**Figura 26 –** Variação de tamanho das amostras de OEO encapsulado em alginato pelo método de gelificação iônica.




Fonte: Elaborado pelo autor.

**Figura 27 –** Variação de tamanho das amostras de OEO encapsulado em gelatina/goma arábica pelo método de coacervação complexa.




Fonte: Elaborado pelo autor.

A porcentagem de alteração de tamanho ($\Delta D_t$) (Figuras 26 e 27), calculada com base na variação do diâmetro usando a equação (11), foi fortemente afetada pelo tempo de imersão no meio líquido simulando uma solução marinada, bem como pelo processo de produção das partículas.

Para as amostras de OEO encapsulado em alginato pelo método de gelificação iônica, a taxa de alteração apresentou valores positivos, mostrando que as partículas incharam durante a liberação do ativo. Porém, apesar das diferentes cinéticas de intumescimento, as quatro amostras (GISRU, GISRL, GICRU e GICRL) atingiram diâmetros finais médios semelhantes após 540 min, variando na faixa de 2020 a 2168 µm. Altas proporções de inchamento para esferas de alginato em comparação com esferas de quitosana e alginato-quitosana foram observadas por Unagolla e Jayasuriya (2018), bem como por partículas liofilizadas como consequência de sua estrutura porosa.

Amostras úmidas com (GICRU) e sem (GISRU) recobrimento com WPC tiveram um aumento de seu diâmetro médio final de cerca de 30 %, mas a cinética de inchamento foi diferente para essas amostras: enquanto as amostras não recobertas (GISRU) apresentaram um aumento gradual no diâmetro médio das partículas até 540 min, a amostra recoberta com proteína (GICRU) teve um inchamento inicial menor, mas as partículas atingiram o seu diâmetro médio máximo 60 min após contato com o meio de liberação e depois permaneceram constantes. As amostras liofilizadas (GISRL e GICRL) apresentaram um aumento muito maior no diâmetro devido ao seu tamanho inicial menor (Tabela 3), mas também apresentaram diferenças quanto à taxa de intumescimento afetada pela presença ou ausência da camada de proteína: a amostra com recobrimento (GICRL) apresentou, inicialmente, menor razão de inchaço do que a amostra sem recobrimento (GISRL), mas essa razão se tornou maior nos tempos finais de análise. O diferente comportamento de intumescimento para as partículas de alginato recobertas e não recobertas com proteína pode estar relacionado à composição do meio líquido, que continha alta concentração de NaCl. A interação associativa entre proteínas e polissacarídeos pode ser suprimida em altas forças iônicas, com a adição de NaCl inibindo a interação eletrostática que impulsiona a complexação entre os biopolímeros de carga oposta (DOUBLIER et al., 2000). Assim, o revestimento proteico poderia ter sido eficaz para abrandar a taxa inicial de dilatação em comparação com as partículas não recobertas, mas decorrido o tempo necessário para quebrar os complexos eletrostáticos de proteína de soro de leite-alginato, a superfície da partícula ficaria desprotegida e susceptível a um inchamento rápido.

O inchamento de partículas de alginato não recobertas com proteína também é afetado pela presença de NaCl no meio líquido. Corstens et al. (2017) observaram que a exposição de esferas de alginato preenchidas com emulsão a soluções salinas (na ausência de cálcio no meio) resultou em um forte efeito de força iônica, com inchamento e provável desintegração e com maior taxa de inchamento em maior concentração iônica, o que foi atribuído a uma troca rápida entre $Na^+$ e $Ca^{2+}$ no gel de alginato, quebrando, assim, a estrutura de caixa de ovo. Tal comportamento foi observado por Bajpai e Sharma (2004) e Fu et al. (2019), que afirmaram que em soluções de água com presença de NaCl há troca iônica entre $Ca^{2+}$ e $Na^+$, o qual não é capaz de ligar suficientemente os grupos $COO^-$ nas cadeias, diminuindo a reticulação e afrouxando a estrutura de caixa de ovo, aumentando a captação de água pela matriz do biopolímero.

Para as amostras de OEO encapsulado em gelatina/goma arábica pelo método de coacervação complexa, a variação de diâmetro apresentou valores negativos, mostrando que o tamanho das partículas foi reduzido durante a liberação do ativo. Porém, apesar das diferentes cinéticas de redução de tamanho, as duas amostras (CCU e CCL) atingiram diâmetros finais médios semelhantes após 420, variando na faixa de 122 a 133 µm. Apesar de diâmetros finais semelhantes, a amostra úmida (CCU) teve uma redução de 36 % em seu diâmetro final, enquanto a amostra liofilizada (CCL) teve uma redução de 25 %. Enquanto a amostra úmida apresentou uma pequena redução nos primeiros 10 minutos e então uma redução acentuada aos 60 minutos, mantendo-se constante após esse tempo, a amostra liofilizada teve uma redução gradual até os 240 minutos e, então, uma redução acentuada até os 420 minutos. A redução do diâmetro médio da partícula pode estar relacionada com a saída de óleo do interior da partícula, sem o efeito de inchamento dos materiais de parede, além da perda de água da matriz devido à diferença de pressão osmótica entre as partículas e a solução de salmoura. Além disso, tal comportamento pode estar relacionado com as características dos materiais quando em soluções salinas. Bakravi et al. (2018) estudaram o efeito de encolhimento de nanocompósitos de hidrogel a base de gelatina contendo nanopartículas de CuO em solução aquosa de NaCl à temperatura ambiente e todos os hidrogéis tenderam a encolher e perder até 40 % da água retida quando em solução salina. Kaith, Singha e Ranjta (2010) observaram que redes poliméricas de goma arábica enxertadas com ácido metacrílico

mostraram resistência ao intumescimento quando em soluções salinas e quanto maior a concentração de sal, maior a resistência.

## 5.4 Modelagem e transferência de massa

### 5.4.1 Modelagem das curvas de cinética de liberação

Com base nas curvas resultantes de liberação cumulativa do OEO, estas foram ajustadas aos modelos propostos no item 4.6, por regressão não-linear utilizando-se o programa Origin 8.0. A Tabela 8 apresenta os valores dos parâmetros estatísticos utilizados para comparação dos ajustes e escolha do melhor modelo ajustável aos dados experimentais obtidos, mostrando que o modelo de Peppas resultou em boa qualidade de ajuste dos dados experimentais, com $R^2 > 0,94$ e $E < 10$ %. Assim, a Figura 28 apresenta os perfis de liberação das diferentes amostras ajustadas ao modelo de Peppas, onde as linhas representam as curvas ajustadas, e a Tabela 9 mostra os valores dos parâmetros de ajuste do modelo.

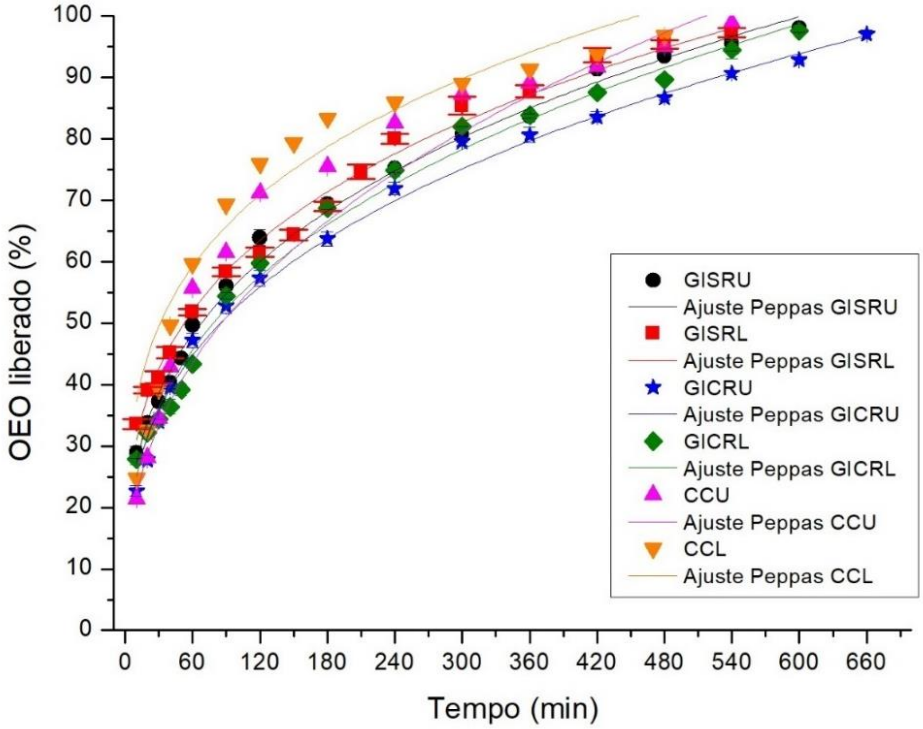
**Tabela 8 –** Valores do coeficiente de determinação ($R^2$) e erro residual médio relativo (E) obtidos após ajuste dos modelos aos dados experimentais.

| Amostra | Ordem Zero | | Primeira Ordem | | Higuchi | | Peppas | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | $R^2$ | E (%) | $R^2$ | E (%) | $R^2$ | E (%) | $R^2$ | E (%) |
| **GISRU** | -* | 48,9 | - | 79,8 | 0,833 | 19,5 | 0,995 | 2,5 |
| **GISRL** | - | 46,9 | - | 81,4 | 0,652 | 17,9 | 0,993 | 2,5 |
| **GICRU** | - | 46,8 | - | 77,7 | 0,769 | 17,4 | 0,997 | 3,3 |
| **GICRL** | 0,135 | 48,7 | - | 79,9 | 0,886 | 18,3 | 0,992 | 4,1 |
| **CCU** | 0,112 | 43,3 | - | 69,4 | 0,891 | 15,2 | 0,990 | 7,2 |
| **CCL** | - | 44,1 | - | 71,5 | 0,369 | 17,1 | 0,935 | 10,0 |

*Valores de $R^2$ menores que 0,1 não são apresentados na Tabela.

Fonte: Elaborado pelo autor.

**Figura 28 –** Ajuste dos dados da cinética de liberação de OEO encapsulado pelos métodos de gelificação iônica e coacervação complexa utilizando-se o modelo de Peppas.




Fonte: Elaborado pelo autor.

**Tabela 9 –** Parâmetros de ajuste do modelo de Peppas para as curvas de cinética de liberação obtidas experimentalmente.

| Amostra | Parâmetros do modelo | |
|---|---|---|
| | k ($min^{-n}$) | n |
| **GISRU** | 13,55 ± 0,51$^{c*}$ | 0,31 ± 0,007$^{ab}$ |
| **GISRL** | 15,56 ± 0,67$^{b}$ | 0,29 ± 0,008$^{b}$ |
| **GICRU** | 11,84 ± 0,58$^{d}$ | 0,32 ± 0,008$^{a}$ |
| **GICRL** | 11,56 ± 0,67$^{d}$ | 0,33 ± 0,010$^{a}$ |
| **CCU** | 14,58 ± 0,36$^{bc}$ | 0,31 ± 0,003$^{ab}$ |
| **CCL** | 17,67 ± 0,43$^{a}$ | 0,29 ± 0,006$^{b}$ |

*Valores da mesma coluna com letras diferentes são significativamente diferentes ($p < 0,05$).

Fonte: Elaborado pelo autor.

Segundo Siepmann e Peppas (2012), o modelo de Peppas, também conhecido como Lei de Potência, expressa, de forma generalizada, a superposição de dois

mecanismos aparentemente independentes de transporte de ativos: difusão Fickiana e não-Fickiana (transporte do tipo II, controlado pela relaxação das cadeias poliméricas). Neste modelo, o parâmetro *n* é o exponente difusional, o qual indica o mecanismo de liberação do composto encapsulado. Ritger e Peppas (1987) mostraram que para a liberação dos primeiros 60 % de fármaco encapsulado em partículas esféricas de diâmetro uniforme seguindo uma difusão Fickiana, o expoente *n* assumiria um valor de cerca de 0,43. No entanto, no mesmo trabalho, os autores analisaram uma população hipotética com uma distribuição de tamanho polidispersa e demonstraram que o expoente da lei da potência correspondente à difusão de Fick seria, neste caso, de 0,30. O menor valor de *n* refletiria o fato de que partículas menores apresentariam uma liberação mais rápida, acelerando, assim, a taxa de liberação inicial, enquanto a liberação lenta de partículas maiores retardaria a liberação para tempos mais longos. Os autores alegaram que o efeito da distribuição de tamanho da partícula no valor de *n* varia com a forma e a largura da distribuição, de tal forma que nenhum limite típico pode ser indistintamente considerado nesses casos.

O ajuste das curvas ao modelo de Peppas resultou em valores de *n* na faixa de 0,29 a 0,33, concordando com a hipótese de predominância de difusão Fickiana de uma população monomodal polidispersa de partículas esféricas. Além disso, durante a análise de liberação, as partículas sofreram modificação em seu diâmetro médio, o que pode estar relacionado aos diferentes valores de *n* entre as amostras. Expoentes difusionais em torno de 0,3 também foram observados em outros trabalhos (AMIRYOUSEFI et al., 2016; HOSSEINI et al., 2013b; UNAGOLLA; JAYASURIYA, 2018). No entanto, é difícil fazer comparações diretas devido às grandes diferenças entre as características das partículas (tipo de biopolímero, estrutura, processo de produção, distribuição de tamanho) e condições de liberação (composição, temperatura, pH, força iônica), que afetam fortemente a cinética de liberação, assim como mostrado, por exemplo, nos resultados obtidos por Dima et al. (2016).

Comparações entre os valores de *k* obtidos para as diferentes amostras estudadas no presente trabalho confirmam as observações gerais sobre os efeitos do revestimento proteico na cinética de liberação do OEO em meio líquido: *k* foi menor para as amostras com revestimento com WPC (GICRU e GICRL), indicando uma liberação mais lenta para estes tratamentos. Já os valores de *k* para as partículas

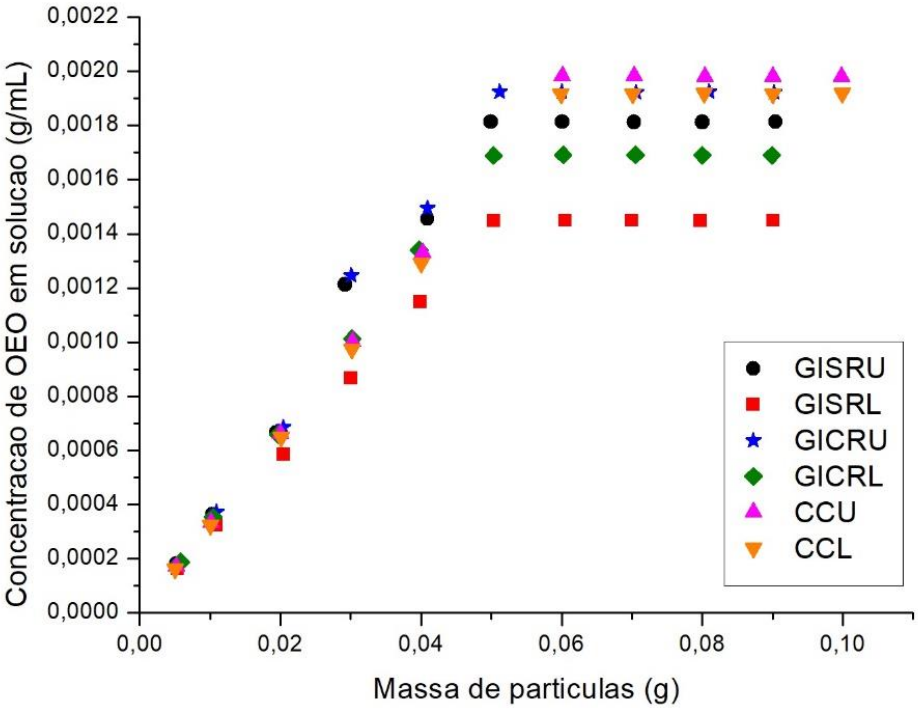
liofilizadas produzidas por gelificação iônica sem recobrimento (GISRL) e coacervação complexa (CCL) apresentaram os maiores valores, indicando uma liberação mais rápida.

Os valores do expoente não tiveram ou tiveram apenas uma pequena diferença significativa entre as amostras de gelificação iônica. A falta de diferenças significativas entre os valores de *n*, mesmo considerando a análise das partículas liofilizadas, para as quais o inchamento da matriz e consequente relaxamento das cadeias poliméricas poderia afetar a cinética de transporte, pode ser explicada pela rápida taxa de dilatação das partículas (Figura 26). Após 10 minutos, as partículas liofilizadas já haviam aumentado seus tamanhos médios de partícula em quase 50 % e atingiram diâmetro médio semelhante às amostras úmidas. Isso indica que a relaxação da matriz ocorreu muito rapidamente, não causando um efeito de desaceleração na difusão do OEO. O processo de interação eletrostática com proteína de soro de leite para produção da camada superficial proteica provavelmente teria capacidade de modular a taxa de liberação de óleo das partículas de alginato se o meio líquido de liberação possuísse menor força iônica do que a utilizada no presente trabalho. Além disso, comparando-se os valores do expoente das amostras produzidas por gelificação iônica com o das amostras produzidas por coacervação complexa, é possível perceber que também não há ou há apenas uma pequena diferença significativa entre os valores, o que mostra que a redução do diâmetro das partículas não teve efeito de aceleração na difusão do OEO.

### 5.4.1 Cálculo do coeficiente de transferência de massa instantâneo (*h*)

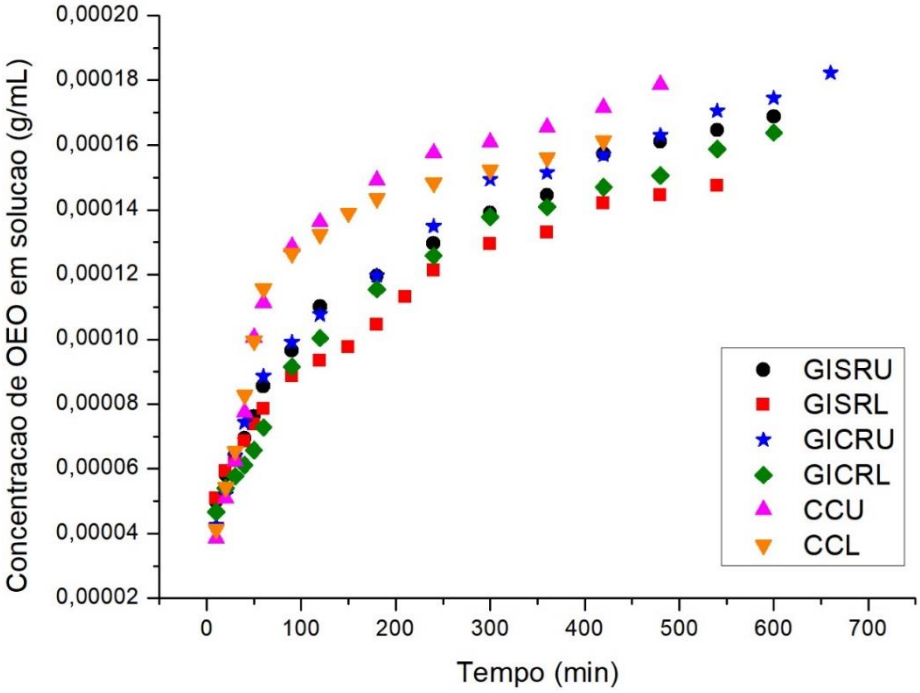
As Figuras 29 e 30 apresentam, respectivamente, os resultados obtidos para a análise de concentração de equilíbrio e as curvas de liberação, em termos de concentração do OEO liberado ao longo do tempo, das diferentes partículas de OEO encapsulado em alginato ou gelatina/goma arábica em meio líquido com condições análogas à solução de marinação. A partir dos resultados de concentração de OEO presentes na solução, determinaram-se os valores da concentração de equilíbrio (Tabela 10) e os valores do coeficiente de transferência de massa instantâneo após aplicação dos valores de $c_{eq}$ na equação (13), para os tempos de 10 e 60 minutos.

**Figura 29 –** Curvas obtidas para a concentração de equilíbrio do OEO em meio líquido com condições análogas à solução de marinação.




Fonte: Elaborado pelo autor.

**Figura 30 –** Curvas de liberação em termos da concentração de OEO liberado em função do tempo em solução análoga à solução de marinação, para uma massa de amostra de 5 mg.




Fonte: Elaborado pelo autor.

**Tabela 10 –** Concentração de equilíbrio e coeficientes de transferência de massa instantâneos de partículas de OEO encapsulado em meio líquido com condições análogas a solução de marinação.

| Tratamento | $C_{eq}$ (g/mL) | $h_{10\ min}$ (m/s) | $h_{60\ min}$ (m/s) |
|---|---|---|---|
| **GISRU** | $(1,81 \pm 0,02) \times 10^{-3\ c*}$ | $(2,05 \pm 0,04) \times 10^{-8\ d}$ | $(1,09 \pm 0,03) \times 10^{-8\ d}$ |
| **GISRL** | $(1,45 \pm 0,01) \times 10^{-3\ e}$ | $(2,17 \pm 0,05) \times 10^{-8\ c}$ | $(1,25 \pm 0,04) \times 10^{-8\ c}$ |
| **GICRU** | $(1,92 \pm 0,02) \times 10^{-3\ b}$ | $(1,40 \pm 0,04) \times 10^{-8\ f}$ | $(0,89 \pm 0,03) \times 10^{-8\ f}$ |
| **GICRL** | $(1,69 \pm 0,01) \times 10^{-3\ d}$ | $(1,69 \pm 0,04) \times 10^{-8\ e}$ | $(0,97 \pm 0,03) \times 10^{-8\ e}$ |
| **CCU** | $(1,98 \pm 0,03) \times 10^{-3\ a}$ | $(1,40 \pm 0,04) \times 10^{-8\ b}$ | $(3,07 \pm 0,05) \times 10^{-8\ b}$ |
| **CCL** | $(1,92 \pm 0,02) \times 10^{-3\ b}$ | $(2,91 \pm 0,05) \times 10^{-8\ a}$ | $(5,06 \pm 0,06) \times 10^{-8\ a}$ |

*Valores da mesma coluna com letras diferentes são significativamente diferentes ($p < 0,05$).

Fonte: Elaborado pelo autor.

**Tabela 11 –** Valores de coeficiente de transferência de massa instantâneo em relação aos diâmetros médios de partículas de OEO encapsulado.

| Tratamento | $(h/D)_{10\ min}$ ($s^{-1}$) | $(h/D)_{60\ min}$ ($s^{-1}$) | $\Delta$ (h/D) $_{60\ min \rightarrow 10\ min}$ |
|---|---|---|---|
| **GISRU** | $(1,14 \pm 0,04) \times 10^{-5\ d*}$ | $(5,38 \pm 0,03) \times 10^{-6\ e}$ | $- 6,02 \times 10^{-6}$ |
| **GISRL** | $(1,37 \pm 0,05) \times 10^{-5\ c}$ | $(7,10 \pm 0,04) \times 10^{-6\ c}$ | $- 6,60 \times 10^{-6}$ |
| **GICRU** | $(8,34 \pm 0,04) \times 10^{-6\ f}$ | $(4,45 \pm 0,03) \times 10^{-6\ f}$ | $- 3,89 \times 10^{-6}$ |
| **GICRL** | $(1,05 \pm 0,04) \times 10^{-5\ e}$ | $(6,08 \pm 0,03) \times 10^{-6\ d}$ | $- 4,42 \times 10^{-6}$ |
| **CCU** | $(7,39 \pm 0,04) \times 10^{-5\ b}$ | $(2,44 \pm 0,05) \times 10^{-4\ b}$ | $1,70 \times 10^{-4}$ |
| **CCL** | $(2,01 \pm 0,05) \times 10^{-4\ a}$ | $(3,51 \pm 0,06) \times 10^{-4\ a}$ | $1,50 \times 10^{-4}$ |

*Valores da mesma coluna com letras diferentes são significativamente diferentes ($p < 0,05$).

Fonte: Elaborado pelo autor.

Comparando os valores de concentração de OEO em solução (Figuras 29 e 30) observa-se que a concentração de equilíbrio é aproximadamente 10 vezes maior que a concentração máxima de OEO liberado no meio, mostrando que o OEO presente nas partículas não foi capaz de saturar a solução e estabelecer um equilíbrio entre concentração de OEO na solução e nas partículas.

Comparando-se os valores do coeficiente de transferência de massa instantâneo (Tabela 10) com os resultados do ajuste do modelo de Peppas, percebe-se que as tendências são similares, ou seja, em ambos os tempos (10 e 60 minutos) tem-se uma transferência mais rápida do OEO para o meio de liberação para as amostras

produzidas por coacervação complexa, enquanto a transferência é mais lenta para as partículas produzidas por gelificação iônica recobertas com WPC (GICRU e GICRL). Tal resultado também vai ao encontro das observações feitas para as análises de diâmetro médio, uma vez que as partículas coacervadas são menores e, por isso, aumentam a superfície de contato com o meio, acelerando a liberação do óleo essencial encapsulado em seu interior, enquanto as partículas produzidas por gelificação iônica recobertas com WPC têm diâmetros médios maiores, além da proteção inicial do camada proteica nos primeiros minutos de liberação, como já discutido anteriormente.

Os resultados apresentados na Tabela 11 também confirmam o que foi observado na análise de cinética de liberação, mostrando que a liberação é mais rápida para partículas menores. O $\Delta$(h/D) apresentou valores positivos para as partículas produzidas por coacervação complexa, mostrando correlação com os resultados obtidos na análise de alteração de diâmetro durante a cinética de liberação, uma vez que as partículas diminuíram seu tamanho, fazendo com que o coeficiente de transferência de massa fosse maior. Tal relação foi válida, também, para as partículas produzidas por gelificação iônica, uma vez que incharam durante o processo da cinética, fazendo com que o coeficiente de transferência de massa diminuísse devido ao maior diâmetro médio das partículas.

Lewińska et al. (2002) estudaram a transferência de massa de vitamina $B_{12}$ de uma solução para esferas de alginato e microcápsulas de poliguanidina-alginato-celulose e encontraram valores de coeficiente de transferência de massa entre $5{,}00 \times 10^{-7}$ e $6{,}83 \times 10^{-6}$ m/s e valores de h/D entre 0,058 e 0,136 $s^{-1}$. O fato desses valores serem maiores do que os encontrados no presente estudo pode estar relacionado ao composto estudado, uma vez que a vitamina $B_{12}$ é um composto hidrofílico de baixa massa molecular. Além disso, o sentido de transferência do composto é contrário ao do presente estudo e, apesar de um dos materiais de parede ser o mesmo (alginato), a preparação das esferas ocorreu de modo diferente, uma vez que se usou um gerador eletrostático de gotas, além do uso de uma solução de cloreto de cálcio menos concentrada (1 %).

Não foi possível o ajuste dos dados dos perfis de liberação na equação (13) por regressão não-linear do conjunto de dados. Tal impossibilidade pode estar relacionada às considerações assumidas para desenvolvimento de tal equação, uma

vez que se considerou volume do sistema constante e o interior da partícula como homogêneo, com mesma concentração de saturação em qualquer tempo. Tal consideração de homogeneidade e concentração constante de saturação pode ter grande relação com a impossibilidade do ajuste, uma vez que as partículas produzidas por gelificação iônica absorveram água e as produzidas por coacervação complexa reduziram seu tamanho, o que, além de alterar a distribuição das gotas de OEO no interior das partículas, fez com que a concentração de saturação no interior particuladas mesmas variasse ao longo do tempo de liberação. O presente estudo também considerou somente o diâmetro médio no tempo escolhido, desprezando a variação do diâmetro médio das partículas durante o processo de liberação. É possível que o acoplamento de uma função que represente a variação do tamanho médio das partículas à equação (13) possa fornecer um valor mais preciso de h, sendo um tema interessante para possíveis trabalhos futuros.

# 6 CONCLUSÃO

A encapsulação de óleo essencial de orégano pelos métodos de gelificação iônica e coacervação complexa resultou em partículas esféricas, com o OEO disperso nas partículas na forma de pequenas gotículas, e com bom desempenho de encapsulação.

A liofilização causou encolhimento nas amostras produzidas por ambos os processos, aumentando a polidispersidade da distribuição de tamanho, além de aumentar também a porosidade da superfície das partículas produzidas por gelificação iônica, fazendo com que a liberação do OEO ocorresse mais rapidamente. Além disso, reduziu o desempenho de encapsulação quando comparado às respectivas amostras úmidas e ocasionou mudanças nas superfícies das partículas, deixando-as mais rugosas, o que interferiu diretamente na cinética de liberação.

O processo de recobrimento por interação eletrostática com proteína de soro de leite nas partículas produzidas por gelificação iônica apresentou um leve efeito de desaceleração na taxa de inchamento e nas taxas de liberação do OEO, embora a alta concentração de NaCl no meio de liberação, adotada para simular uma solução de marinação de carnes, provavelmente causou rápida remoção da camada de proteína da superfície, dificultando, assim, o efeito de modulação desejável para retardar a liberação.

Apesar dos processos de recobrimento com WPC e liofilização apresentarem bons resultados, estes não resultaram em diferenças significativas. Assim, devido ao gasto energético, tempo de preparação e custo, conclui-se que o uso desses processos não é recomendável. Além disso, no caso particular do processo de recobrimento, pode haver problemas devido ao uso do concentrado proteico de soro de leite, o qual é um subproduto do leite e pode se relacionar a reações alérgicas.

O ajuste do modelo de Peppas para os perfis de liberação indicou que o transporte de OEO nas amostras é controlado por difusão de Fick. Os valores de coeficiente de transferência de massa instantâneo bem como os do coeficiente de transferência de massa em relação ao diâmetro mostraram uma concordância com os perfis de liberação e forte relação com o diâmetro médio das partículas, sendo necessário estudos futuros sobre a influência da variação do diâmetro médio das amostras no coeficiente médio de transferência de massa.

# LISTA DE SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Após a conclusão deste trabalho, percebeu-se que alguns parâmetros tiveram influência nas análises realizadas, abrindo possibilidades para trabalhos futuros que possam complementar e até explicar melhor alguns resultados obtidos. Assim, sugere-se que os seguintes tópicos componham trabalhos futuros:

(i) Produção e estudo da cinética de liberação de partículas de gelificação iônica com menor teor de óleo essencial de orégano;

(ii) Análise da influência da concentração de NaCl na solução de salmoura em relação à liberação de óleo essencial e alterações morfológicas e estruturais sofridas pelas partículas;

(iii) Análise da influência da alteração do diâmetro médio das partículas no cálculo do coeficiente de transferência de massa global.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGÜERO, L.; ZALDIVAR-SILVA, D.; PEÑA, L.; DIAS, M. L. Alginate microparticles as oral colon drug delivery device: A review. **Carbohydrate Polymers**, v. 168, p. 32–43, 2017.

AMIRYOUSEFI, M. R.; MOHEBBI, M.; GOLMOHAMMADZADEH, S.; KOOCHEKI, A. Encapsulation of caffeine in hydrogel colloidosome: Optimization of fabrication, characterization and release kinetics evaluation. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 31, n. 2, p. 163–172, 2016.

ARANA-SÁNCHEZ, A.; ESTARRÓN-ESPINOSA, M.; OBLEDO-VÁZQUEZ, E. N.; PADILLA- CAMBEROS, E.; SILVA-VÁZQUEZ, R.; LUGO-CERVANTES, E. Antimicrobial and antioxidant activities of Mexican oregano essential oils (*Lippia graveolens* H. B. K.) with different composition when microencapsulated inβ-cyclodextrin. **Letters in Applied Microbiology**, v. 50, n. 6, p. 585–590, 2010.

ARANCIBIA, C.; RIQUELME, N.; ZÚÑIGA, R.; MATIACEVICH S. Comparing the effectiveness of natural and synthetic emulsifiers on oxidative and physical stability of avocado oil-based nanoemulsions. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 44, n. May, p. 159–166, 2017.

ARANHA, C. P. M. **Microencapsulação por gelificação iônica e interação eletrostática do corante de buriti (Mauritia flexuosa L . f .)**. 117 f. Tese (Doutorado em Engenharia e Ciência de Alimentos). Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, São José do Rio Preto, 2015.

ASBAHANI, A. E.; MILADI, K.; BADRI, W.; SALA, M.; ADDI, E. H. A.; CASABIANCA, H.; MOUSADIK, A. E.; HARTMANN, D.; JILALE, A.; RENAUD, F. N. R.; ELAISSARI, A. Essential oils: From extraction to encapsulation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 483, n. 1–2, p. 220–243, 2015.

AZEREDO, H. M. C. Encapsulação: Aplicação à Tecnologia de Alimentos. **Alimentos e Nutrição**, v. 16, n. 1, p. 89–97, 2015.

AZIZI, A.; YAN, F.; HONERMEIER, B. Herbage yield, essential oil content and composition of three oregano (Origanum vulgare L.) populations as affected by soil moisture regimes and nitrogen supply. **Industrial Crops and Products**, v. 29, n. 2–3, p. 554–561, 2009.

BAJPAI, S. K.; SHARMA, S. Investigation of swelling/degradation behaviour of alginate beads crosslinked with $Ca^{2+}$ and $Ba^{2+}$ ions. **Reactive and Functional Polymers**, v. 59, n. 2, p. 129–140, 2004.

BAKRAVI, A.; AHAMADIAN, Y.; HASHEMI, H.; NAMAZI, H. Synthesis of gelatin-based biodegradable hydrogel nanocomposite and their application as drug delivery agent. **Advances in Polymer Technology**, v. 37, n. 7, p. 2625–2635, 2018.

BAKRY, A. M.; ABBAS, S.; ALI, B.; MAJEED, H.; ABOUELWAFA, M. Y.; MOUSA, A.; LIANG, L. Microencapsulation of Oils: A Comprehensive Review of Benefits, Techniques, and Applications. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 15, n. 1, p. 143–182, 2016.

BANERJEE, S.; CHATTOPADHYAY, P.; GHOSH, A.; GOYARY, D.; KARMAKAR, S.; VEER, V. Influence of process variables on essential oil microcapsule properties by carbohydrate polymer-protein blends. **Carbohydrate Polymers**, v. 93, n. 2, p. 691–697, 2013.

BEIRÃO-DA-COSTA, S.; DUARTE, C.; BOURBON, A. I.; PINHEIRO, A. C.; JANUÁRIO, M. I. N.; VICENTE, A. A.; BEIRÃO-DA-COSTA, M. L.; DELGADILLO, I. Inulin potential for encapsulation and controlled delivery of *Oregano* essential oil. **Food Hydrocolloids**, v. 33, n. 2, p. 199–206, 2013.

BENAVIDES, S.; CORTÉS, P.; PARADA, J.; FRANCO, W. Development of alginate microspheres containing thyme essential oil using ionic gelation. **Food Chemistry**, v. 204, p. 77–83, 2016.

BENDALL, J. R. The swelling effect of polyphosphates on lean meat. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 5, n. 10, p. 468–475, 1954.

BERK, Z. Freeze drying (lyophilization) and freeze concentration. **Food Process Engineering and Technology**, p. 567–581, 2018.

BERNABÉ, P.; PENICHE, C.; ARGÜELLES-MONAL, W. Swelling behavior of chitosan/pectin polyelectrolyte complex membranes. Effect of thermal cross-linking. **Polymer Bulletin**, v. 55, n. 5, p. 367–375, 2005.

BJÖRKROTH, J. Microbiological ecology of marinated meat products. **Meat Science**, v. 70, n. 3 SPEC. ISS., p. 477–480, 2005.

BONFANTI, C.; IANNÌ, R.; MAZZAGLIA, A.; LANZA, C. M.; NAPOLI, E. M.; RUBERTO, G. Emerging cultivation of oregano in Sicily: Sensory evaluation of plants and chemical composition of essential oils. **Industrial Crops and Products**, v. 35, n. 1, p. 160–165, 2012.

BOTSOGLOU, N. A.; GRIGOROPOULOU, S. H.; BOTSOGLOU, E.; GOVARIS, A.; PAPAGEORGIOU, G. The effects of dietary oregano essential oil and α-tocopheryl acetate on lipid oxidation in raw and cooked Turkey during refrigerated storage. **Meat Science**, v. 65, n. 3, p. 1193–1200, 2003.

BUREY, P.; BHANDARI, B. R.; HOWES, T.; GIDLEY, M. J. Hydrocolloid gel particles: Formation, characterization, and application. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 48, n. 5, p. 361–377, 2008.

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

CALVO, P.; CASTAÑO, A. L.; LOZANO, M.; GONZÁLEZ-GÓMEZ, D. Influence of the microencapsulation on the quality parameters and shelf-life of extra-virgin olive oil encapsulated in the presence of BHT and different capsule wall components. **Food Research International**, v. 45, n. 1, p. 256–261, 2012.

CHANG, Y.; CHOI, I.; CHO, A. R.; HAN, J. Reduction of Dickeya *chrysanthemi* on fresh-cut iceberg lettuce using antimicrobial sachet containing microencapsulated oregano essential oil. **LWT - Food Science and Technology**, v. 82, p. 361–368, 2017.

CHARLES, D. J. **Antioxidant Properties of Spices, Herbs and Other Sources**. 1. ed. New York: Springer Science & Business Media, 2012.

CHARVE, J.; REINECCIUS, G. A. Encapsulation performance of proteins and traditional materials for spray dried flavors. **Food Science and Nutrition**, v. 57, n. 6, p. 2486–2492, 2009.

CHING, S. H.; BANSAL, N.; BHANDARI, B. Physical stability of emulsion encapsulated in alginate microgel particles by the impinging aerosol technique. **Food Research International**, v. 75, p. 182–193, 2015.

CHISHTI, S.; KALOO, Z. A.; SULTAN, P. Medicinal importance of genus Origanum : A review. **Journal of Pharmacognosy and Phytotherapy**, v. 5, n. 10, p. 170–177, 2013.

CHOU, T. H.; DING, H. Y.; CHAN, L. P.; LIANG, J. Y.; LIANG, C. H. Novel phenolic glucoside, origanoside, protects against oxidative damage and modulates antioxidant enzyme activity. **Food Research International**, v. 44, p. 1496-1503, 2011.

COOK, M. T.; TZORTZIS, G.; CHARALAMPOPOULOS, D.; KHUTORYANSKIY, V. V. Microencapsulation of probiotics for gastrointestinal delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 162, n. 1, p. 56–67, 2012.

CORSTENS, M. N.; BERTON-CARABIN, C. C.; ELICHIRY-ORTIZ, P. T.; HOL, K.; TROOST, F. J.; MASCLEE, A. A. M.; SCHROËN, K. Emulsion-alginate beads designed to control in vitro intestinal lipolysis: Towards appetite control. **Journal of Functional Foods**, v. 34, p. 319–328, 2017.

COSTA, P.; LOBO, J. M. S. Modeling and comparison of dissolution profiles. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 13, p. 123–133, 2001.

DAMODARAM, S. Amino acids, peptides, and proteins. In: FENNEMA, O. R. (Ed.). **Food Chemistry**. 3rd. ed. New York: Marcel Dekker, 2008. p. 179–262.

DE KRUIF, C. G.; WEINBRECK, F.; DE VRIES, R. Complex coacervation of proteins and anionic polysaccharides. **Current Opinion in Colloid and Interface Science**, v. 9, n. 5, p. 340–349, 2004.

DIMA, C.; PATRASCU, L.; CANTARAGIU, A.; ALEXE, P.; DIMA, S. The kinetics of the swelling process and the release mechanisms of *Coriandrum sativum* L. essential oil from chitosan / alginate / inulin microcapsules. **Food Chemistry**, v. 195, p. 39–48, 2016.

DOUBLIER, J. L.; GARNIER, C.; RENARD, D.; SANCHEZ, C. Protein-polysaccharide interactions. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 5, n. 3-4, p. 202–214, 2000.

DU PLOOY, W.; REGNIER, T.; COMBRINCK, S. Essential oil amended coatings as alternatives to synthetic fungicides in citrus postharvest management. **Postharvest Biology and Technology**, v. 53, n. 3, p. 117–122, 2009.

FERNANDES, R. V. B.; GUIMARÃES, I. C.; FERREIRA, C. L. R.; BOTREL, D. A.; BORGES, S. V.; SOUZA, A. U. Microencapsulated Rosemary (*Rosmarinus officinalis*) Essential Oil as a Biopreservative in Minas Frescal Cheese. **Journal of Food Processing and Preservation**, p. 1–9, 2017.

FU, Y.; YAO, J.; ZHAO, H.; ZHAO, G.; QIU, Y. Investigation into fabrication, characterization and swelling behaviour of the alginate-gelatin magnetic microbeads. **Materials Research Express**, v. 6, n. 5, p. 056102, 2019.

GIRARDI, N. S.; GARCÍA, D.; PASSONE, M. A.; NESCI, A.; ETCHEVERRY, M. Microencapsulation of *Lippia turbinata* essential oil and its impact on peanut seed quality preservation. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 116, p. 227–233, 2017.

GOÑI, P.; LÓPEZ, P.; SÁNCHEZ, C.; GÓMEZ-LUS, R.; BECERRIL, R.; NERÍN, C. Antimicrobial activity in the vapour phase of a combination of cinnamon and clove essential oils. **Food Chemistry**, v. 116, n. 4, p. 982–989, 2009.

GOUNARIS, Y.; SKOULA, M.; FOURNARAKI, C.; DRAKAKAKI, G.; MAKRIS, A. Comparison of essential oils and genetic relationship of *Origanum x intercedens* to its parental taxa in the island of Crete. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 30, n. 3, p. 249–258, 2002.

GULLUCE, M.; KARADAYI, M.; GUVENALP, Z.; OZBEK, H.; ARASOGLU, T.; BARIS, O. Isolation of some active compounds from *Origanum vulgare* L. ssp. vulgare and determination of their genotoxic potentials. **Food Chemistry**, v. 130, n. 2, p. 248–253, 2012.

HAMMAMI, C.; RENÉ, F. Determination of Freeze-drying Process Variables for Strawberries. **Journal of Food Engineering**, v. 32, n. 2, p. 133–154, 1997.

HERNÁNDEZ-HERNÁNDEZ, E.; LIRA-MORENO, C. Y.; GUERRERO-LEGARRETA, I.; WILD-PADUA, G.; PIERRO, P. D.; GARCÍA-ALMENDÁREZ, B. E.; REGALADO-GONZÁLEZ, C. Effect of Nanoemulsified and Microencapsulated Mexican Oregano (*Lippia graveolens* Kunth) Essential Oil Coatings on Quality of Fresh Pork Meat. **Journal of Food Science**, v. 82, n. 6, p. 1423–1432, 2017.

HOSSEINI, S. F.; ZANDI, M.; REZAEI, M.; FARAHMANDGHAVI, F. Two-step method for encapsulation of oregano essential oil in chitosan nanoparticles: Preparation, characterization and in vitro release study. **Carbohydrate Polymers**, v. 95, n. 1, p. 50–56, 2013a.

HOSSEINI, S. M.; HOSSEINI, H.; MOHAMMADIFAR, M. A.; MORTAZAVIAN, A. M.; MOHAMMADI, A.; KHOSRAVI-DARANI, K.; SHOJAEE-ALIABADI, S.; DEHGHAN, S.; KHAKSAR, R. Incorporation of essential oil in alginate microparticles by multiple emulsion/ionic gelation process. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 62, p. 582–588, 2013b.

HUANG, X.; BRAZEL, C. S. On the importance and mechanisms of burst release in matrix-controlled drug delivery systems. **Journal of Controlled Release**, v. 73, n. 2–3, p. 121–136, 2001.

HUMBLET-HUA, K. N. P.; SCHELTENS, G.; LINDEN, E. V. D.; SAGIS, L. M. C. Encapsulation systems based on ovalbumin fibrils and high methoxyl pectin. **Food Hydrocolloids**, v. 25, n. 3, p. 307–314, 2011.

JIMÉNEZ-ALVARADO, R.; BERISTAIN, C. I.; MEDINA-TORRES, L.; ROMÁN-GUERRERO, A.; VERNON-CARTER, E. J. Ferrous bisglycinate content and release in $W_1/O/W_2$ multiple emulsions stabilized by protein-polysaccharide complexes. **Food Hydrocolloids**, v. 23, n. 8, p. 2425–2433, 2009.

KAITH, B. S.; SINGHA, A. S.; RANJTA, S. Synthesis, characterization, and swelling studies of gum arabic-grafted methacrylic acid polymeric network. **International Journal of Polymer Analysis and Characterization**, v. 15, n. 4, p. 222–234, 2010.

KALEMBA, D.; KUNICKA, A. Antibacterial and Antifungal Properties of Essential Oils. **Current Medicinal Chemistry**, v. 10, n. 10, p. 813-829, 2003.

KAUSHIK, P.; DOWLING, K.; BARROW, C. J.; ADHIKARI, B. Microencapsulation of omega-3 fatty acids: A review of microencapsulation and characterization methods. **Journal of Functional Foods**, v. 19, p. 868–881, 2015.

KOKKINI, S.; KAROUSOU, R.; DARDIOTI, A.; KRIGAS, N.; LANARAS, T. Autumn essential oils of Greek oregano. **Phytochemistry**, v. 44, n. 5, p. 883–886, 1997.

KRALOVEC, J. A.; ZHANG, S.; ZHANG, W.; BARROW, C. J. A review of the progress in enzymatic concentration and microencapsulation of omega-3 rich oil from fish and microbial sources. **Food Chemistry**, v. 131, n. 2, p. 639–644, 2012.

LAKKIS, J. M. Introduction. In: LAKKIS, J. M. (Ed.). **Encapsulation and Controlled Release Technologies in Food Systems2**. 1st. ed. Oxford: Blackwell Publishing, p 1-12, 2007.

LEE, K. Y.; MOONEY, D. J. Alginate: Properties and biomedical applications. **Progress in Polymer Science (Oxford)**, v. 37, n. 1, p. 106–126, 2012.

LEWIŃSKA, D.; ROSIŃSKI, S.; HUNKELER, D.; PONCELET, D.; WERYŃSKI, A. Mass transfer coefficient in characterization of gel beads and microcapsules. **Journal of Membrane Science**, v. 209, n. 2, p. 533–540, 2002.

LIU, C.; DESAI, K. G. H.; TANG, X.; CHEN, X. Drug release kinetics of spray-dried chitosan microspheres. **Drying Technology**, v. 24, n. 6, p. 769–776, 2006.

LIU, H.; ZHENG, A.; LIU, H.; YU, H.; WU, X.; XIAO, C.; DAI, H.; HAO, F.; ZHANG, L.; WANG, Y.; TANG, H. Identification of Three Novel Polyphenolic Compounds, Origanine A–C, with Unique Skeleton from *Origanum vulgare* L. Using the Hyphenated LC-DAD-SPE-NMR/MS Methods. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 1, p. 129–135, 2012.

LUKAS, B.; SCHMIDERER, C.; NOVAK, J. Essential oil diversity of European *Origanum vulgare* L. (Lamiaceae). **Phytochemistry**, v. 119, p. 32–40, 2015.

LYTOU, A.; PANAGOU, E. Z.; NYCHAS, G. J. E. Development of a predictive model for the growth kinetics of aerobic microbial population on pomegranate marinated chicken breast fillets under isothermal and dynamic temperature conditions. **Food Microbiology**, v. 55, p. 25–31, 2016.

MADERUELO, C.; ZARZUELO, A.; LANAO, J. M. Critical factors in the release of drugs from sustained release hydrophilic matrices. **Journal of Controlled Release**, v. 154, n. 1, p. 2–19, 2011.

MANAF, M. A.; SUBUKI, I.; JAI, J.; RASLAN, R.; MUSTAPA, A. N. Encapsulation of Volatile Citronella Essential Oil by Coacervation: Efficiency and Release Study. **IOP Conference Series: Materials Science and Engineering**, v. 358, n. 1, 2018.

MARFIL, P. H. M.; VASCONCELOS, F. H. T.; PONTIERI, M. H.; TELIS, V. R. N. Development and Validation of Analytical Method for Palm Oil Determination in Microcapsules Produced by Complex Coacervation. **Química Nova**, v. 39, n. 1, p. 94–99, 2016.

MARQUES, L. G.; PRADO, M. M.; FREIRE, J. T. Rehydration characteristics of freeze-dried tropical fruits. **LWT - Food Science and Technology**, v. 42, n. 7, p. 1232–1237, 2009.

MARTINS, I. M.; RODRIGUES, S. N.; BARREIRO, F.; RODRIGUES, A. E. Microencapsulation of thyme oil by coacervation. **Journal of Microencapsulation**, v. 26, n. 8, p. 667–675, 2009.

MARTINS, I. M.; BARREIRO, M. F.; COELHO, M.; RODRIGUES, A. E. Microencapsulation of essential oils with biodegradable polymeric carriers for cosmetic applications. **Chemical Engineering Journal**, v. 245, p. 191–200, 2014.

MCCLEMENTS, D. J. Non-covalent interactions between proteins and polysaccharides. **Biotechnology Advances**, v. 24, n. 6, p. 621–625, 2006.

MCCLEMENTS, D. J.; JAFARI, S. M. Chapter 1 - General Aspects of Nanoemulsions and Their Formulation. In: JAFARI, S. M.; MCCLEMENTS, D. J. B. T.-N. (Eds.). Academic Press, p. 3-20, 2018.

MORAES-LOVISON, M.; MAROSTEGAN, L. F. P.; PERES, M. S.; MENEZES, I. F.; GHIRALDI, M.; RODRIGUES, R. A. F.; FERNANDES, A. M.; PINHO, S. C. Nanoemulsions encapsulating oregano essential oil: Production, stability, antibacterial

activity and incorporation in chicken pâté. **LWT - Food Science and Technology**, v. 77, p. 233–240, 2017.

NAZZARO, F.; ORLANDO, P.; FRATIANNI, F.; COPPOLA, R. Microencapsulation in food science and biotechnology. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 23, n. 2, p. 182–186, 2012.

NIEMINEN, T. T.; KOSKINEN, K.; LAINE, P.; HULTMAN, J.; SÄDE, E.; PAULIN, L.; PALORANTA, A.; JOHANSSON, P.; BJÖRKROTH, J.; AUVINEN, P. Comparison of microbial communities in marinated and unmarinated broiler meat by metagenomics. **International Journal of Food Microbiology**, v. 157, n. 2, p. 142–149, 2012.

NOPPAKUNDILOGRAT, S.; PIBOON, P.; GRAISUWAN, W.; NUISIN, R.; KIATKAMJORNWONG, S. Encapsulated eucalyptus oil in ionically cross-linked alginate microcapsules and its controlled release. **Carbohydrate Polymers**, v. 131, p. 23–33, 2015.

NUÑEZ-GONZÁLEZ, F. A. Marination, cooking and curing: Principles. In: GUERRERO-LEGARRETA, I. (Ed.). **Handbook of Poultry Science and Technology, Volume 2**. 1st. ed. New Jersey: John Wiley & Sons, p. 81-88, 2010.

OLIVEIRA, H.; AZEREDO, J.; LAVIGNE, R.; KLUSKENS, L. D. Bacteriophage endolysins as a response to emerging foodborne pathogens. **Trends in Food Science and Technology**, v. 28, n. 2, p. 103–115, 2012.

ORREGO-ALZATE, C. E. **Congelación y liofilización de alimentos**. Colombia: Repositorio Institucional UN / Universidad Nacional de Colombia, 2008.

OTÁLORA, M. C.; CARRIAZO, J. G.; ITURRIAGA, L.; OSORIO, C.; NAZARENO, M. A. Encapsulating betalains from Opuntia ficus-indica fruits by ionic gelation: Pigment chemical stability during storage of beads. **Food Chemistry**, v. 202, p. 373–382, 2016.

PATIL, J. S.; KAMALAPUR, M. V.; MARAPUR, S. C.; KADAM, D. V. Ionotropic Gelation and Polyelectrolyte Complexation: the Novel Techniques To Design Hydrogel Particulate Sustained, Modulated Drug Delivery System: a Review. **Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures**, v. 5, n. 1, p. 241–248, 2010.

PAYS, K.; GIERMANSKA-KAHN, J.; POULIGNY, B.; BIBETTE, J.; LEAL-CALDERON, F. Double emulsions: How does release occur? **Journal of Controlled Release**, v. 79, n. 1–3, p. 193–205, 2002.

PESAVENTO, G.; CALONICO, C.; BILIA, A. R.; BARNANEI, M.; CALESINI, F.; ADDONA, R.; MENCARELLI, L.; CARMAGNINI, L.; MARTINO, M. C. D.; NOSTRO, A. L. Antibacterial activity of Oregano, Rosmarinus and Thymus essential oils against *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes* in beef meatballs. **Food Control**, v. 54, p. 188–199, 2015.

PRATA, A. S. **Estudo dos Parâmetros Físico-Químicos Envolvidos na Formação de Microcápsulas Produzidas por Coacervação Compleza**. 267 f. Tese (Doutorado em Alimentos e Nutrição). Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2006.

PREUSS, H. G.; ECHARD, B.; DADGAR, A.; TALPUR, N.; MANOHAR, V.; ENIG, M.; BAGCHI, D.; INGRAM, C. Effects of Essential Oils and Monolaurin on *Staphylococcus aureus*: In Vitro and In Vivo Studies. **Toxicology Mechanisms and Methods**, v. 15, n. 4, p. 279–285, 1 jan. 2005.

RAUT, J. S.; KARUPPAYIL, S. M. A status review on the medicinal properties of essential oils. **Industrial Crops and Products**, v. 62, p. 250–264, 2014.

RITGER, P. L.; PEPPAS, N. A. A simple equation for description of solute release. I. Fickian and non Fickian. **J Control Release**, v. 5, n. 1, p. 23–26, 1987.

RODRIGUEZ-GARCIA, I.; SILVA-ESPINOZA, B. A.; ORTEGA-RAMIREZ, L. A.; LEVYA, J. M.; SIDDIQUI, M. W.; CRUZ-VALENZUELA, M. R.; GONZALEZ-AGUILAR, G. A.; AYALA-ZAVALA, J. F. Oregano Essential Oil as an Antimicrobial and Antioxidant Additive in Food Products. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 56, n. 10, p. 1717–1727, 2016.

ROJAS-MORENO, S.; OSORIO-REVILLA, G.; GALLARDO-VELÁZQUEZ, T.; CÁRDENAS-BAILÓN, F.; MEZA-MÁRQUEZ, G. Effect of the cross-linking agent and drying method on encapsulation efficiency of orange essential oil by complex coacervation using whey protein isolate with different polysaccharides. **Journal of Microencapsulation**, v. 35, n. 2, p. 165–180, 17 fev. 2018.

RUTZ, J. K.; BORGES, C. D.; ZAMBIAZI, R. C.; CRIZEL-CARDOZO, M. M.; KUCK, L. S.; NOREÑA, C. P. Z. Microencapsulation of palm oil by complex coacervation for application in food systems. **Food Chemistry**, v. 220, p. 59–66, 2017.

SARIKURKCU, C.; ZENGIN, G.; OSKAY, M.; UYSAL, S.; CEYLAN, R.; AKTUMSEK, A. Composition, antioxidant, antimicrobial and enzyme inhibition activities of two *Origanum vulgare* subspecies (subsp. vulgare and subsp. hirtum) essential oils. **Industrial Crops and Products**, v. 70, p. 178–184, 2015.

SCHMITT, C.; SANCHEZ, C.; DESOBRY-BANON, S.; HARDY, J. Structure and Technofunctional Properties of Protein-Polysaccharide Complexes: A Review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 38, n. 8, p. 689–753, 1998.

SCHMITT, C.; TURGEON, S. L. Protein/polysaccharide complexes and coacervates in food systems. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 167, n. 1–2, p. 63–70, 2011.

SHAHIDI, F.; HAN, X.-Q. Encapsulation of Food Ingredients. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 33, n. 6, p. 501–547, 1993.

SHAMAEI, S.; SEIIEDLOU, S. S.; AGHBASHLO, M.; TSOTSAS, E.; KHARAGHANI, A. Microencapsulation of walnut oil by spray drying: Effects of wall material and drying conditions on physicochemical properties of microcapsules. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 39, p. 101–112, 2017.

SHI, L. E.; LI, Z. H.; ZHANG, Z. L.; ZHANG, T. T.; YU, W. M.; ZHOU, M. L.; TANG, Z. X. Encapsulation of *Lactobacillus bulgaricus* in carrageenan-locust bean gum coated

milk microspheres with double layer structure. **LWT - Food Science and Technology**, v. 54, n. 1, p. 147–151, 2013.

SIEPMANN, J.; PEPPAS, N. A. Modeling of drug release from delivery systems based on hydroxypropyl methylcellulose (HPMC). **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 64, n. SUPPL., p. 163–174, 2012.

SILVA, A. C.; LOPES, C. M.; FONSECA, J.; SOARES, M. E.; SANTOS, D.; SOUTO, E. B.; FERREIRA, D. Risperidone Release from Solid Lipid Nanoparticles (SLN): Validated HPLC Method and Modelling Kinetic Profile. **Current Pharmaceutical Analysis**, v. 8, n. 4, p. 307–316, 2012a.

SILVA, D. F.; FAVARO-TRINDADE, C. S.; ROCHA, G. A.; THOMAZINI, M. Microencapsulation of lycopene by gelatin-pectin complex coacervation. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 36, n. 2, p. 185–190, 2012b.

SILVERIO, G. B.; SAKANAKA, L. S.; ALVIM, I. D.; SHIRAI, M. A.; GROSSO, C. R. F. Production and characterization of alginate microparticles obtained by ionic gelation and electrostatic adsorption of concentrated soy protein. **Ciência Rural**, v. 48, n. 12, p. 1–12, 2018.

SINGHVI, G.; SINGH, R. Review: In-vitro drug release characterization models. **International Journal of Pharmaceutical Studies and Research**, v. II, n. I, p. 77–84, 2011.

SIYAL, F. A.; BABAZADEH, D.; WANG, C.; ARAIN, M. A.; SAEED, M.; AYASAN, T.; ZHANG, L.; WANG, T. Emulsifiers in the poultry industry. **World's Poultry Science Journal**, v. 73, n. 3, p. 611–620, 2017.

SÖZMEN, F.; UYSAL, B.; KÖSE, E. O.; AKTAS, Ö.; CINBILGEL, I.; OKSAL, B. S. Extraction of the essential oil from endemic *Origanum bilgeri* P.H.Davis with two different methods: Comparison of the oil composition and antibacterial activity. **Chemistry and Biodiversity**, v. 9, n. 7, p. 1356–1363, 2012.

TACO. **Tabela Brasileira de Composição de Alimentos**. 4. ed. Campinas: NEPA-UNICAMP, 161 p., 2011.

TEODORO, R. A. R.; FERNANDES, R. V. B.; BOTREL, D. A.; BORGES, S. V.; SOUZA, A. U. Characterization of Microencapsulated Rosemary Essential Oil and Its Antimicrobial Effect on Fresh Dough. **Food and Bioprocess Technology**, v. 7, n. 9, p. 2560–2569, 2014.

TERAMOTO, J. R. S.; FABRI, E. G.; PRELA-PANTANO, A.; MINAMI, K.; SUGIO, P. A.; PACHECO, S. G. A. **Produção de orégano: do plantio a comercialização.** Campinas: Instituto Agronômido de Campinas, 19 p., 2009.

THIES, C. Microencapsulation of Flavors by Complex Coacervation. In: LAKKIS, J. M. (Ed.). **Encapsulation and Controlled Release Technologies in Food Systems**. 1st. ed. Oxford: Blackwell Publishing, p. 149–170, 2007.

THOMAS, R. H.; BERNARDS, M. A.; DRAKE, E. E.; GUGLIELMO, C. G. Changes in the antioxidant activities of seven herb- and spice-based marinating sauces after cooking. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 23, n. 3, p. 244–252, 2010.

TOLSTOGUZOV, V. Some thermodynamic considerations in food formulation. **Food Hydrocolloids**, v. 17, p. 1, 2003.

TOPUZ, O. K.; YERLIKAYA, P.; UCAK, I.; GUMUS, B.; BÜYÜKBENLI, H. A. Effects of olive oil and olive oil-pomegranate juice sauces on chemical, oxidative and sensorial quality of marinated anchovy. **Food Chemistry**, v. 154, p. 63–70, 2014.

UNAGOLLA, J. M.; JAYASURIYA, A. C. Drug transport mechanisms and in vitro release kinetics of vancomycin encapsulated chitosan-alginate polyelectrolyte microparticles as a controlled drug delivery system. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 114, n. December 2017, p. 199–209, 2018.

USDA, NRCS. The PLANTS Database. National Plant Data Team, Greensboro, NC 27401-4901 USA. Disponível em: <http://plants.usda.gov>. Acesso em: 30 de janeiro de 2019.

WEISS, J.; LOEFFLER, M.; TERJUNG, N. The antimicrobial paradox: Why preservatives loose activity in foods. **Current Opinion in Food Science**, v. 4, n. May, p. 69–75, 2015.

XIAO, Z.; LIU, W.; ZHU, G.; ZHOU, R.; NIU, Y. A review of the preparation and application of flavour and essential oils microcapsules based on complex coacervation technology. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 94, n. 8, p. 1482–1494, 2014.

YANG, J.; HAN, S.; ZHENG, H.; DONG, H.; LIU, J. Preparation and application of micro/nanoparticles based on natural polysaccharides. **Carbohydrate Polymers**, v. 123, p. 53–66, 2015.

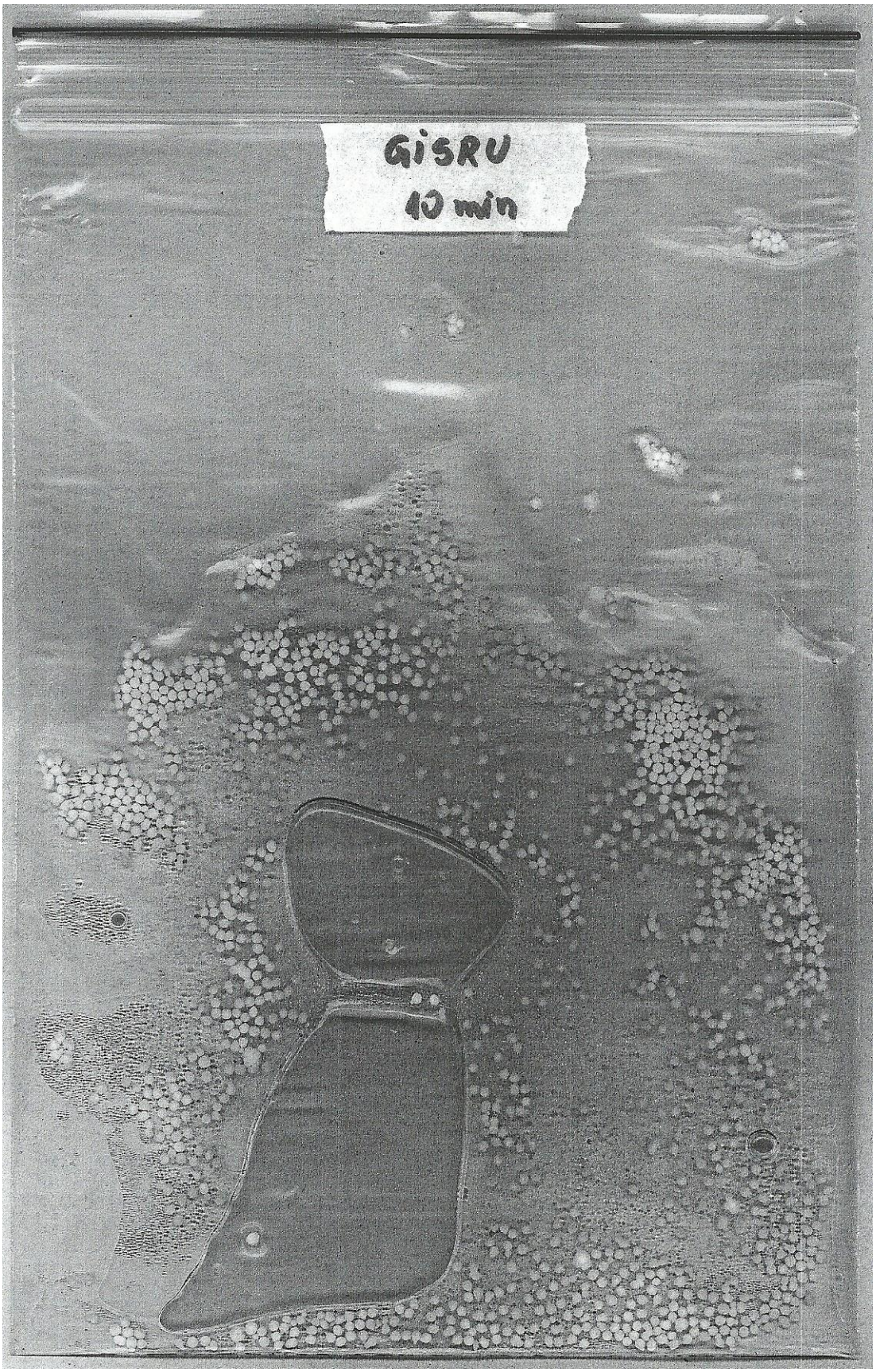
YANG, J. S.; XIE, Y. J.; HE, W. Research progress on chemical modification of alginate: A review. **Carbohydrate Polymers**, v. 84, n. 1, p. 33–39, 2011.

YE, A. Complexation between milk proteins and polysaccharides via electrostatic interaction: Principles and applications - A review. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 43, n. 3, p. 406–415, 2008.

YUSOP, S. M.; O'SULLIVAN, M. G.; KERRY, J. F.; KERRY, J. P. Influence of processing method and holding time on the physical and sensory qualities of cooked marinated chicken breast fillets. **LWT - Food Science and Technology**, v. 46, n. 1, p. 363–370, 2012.

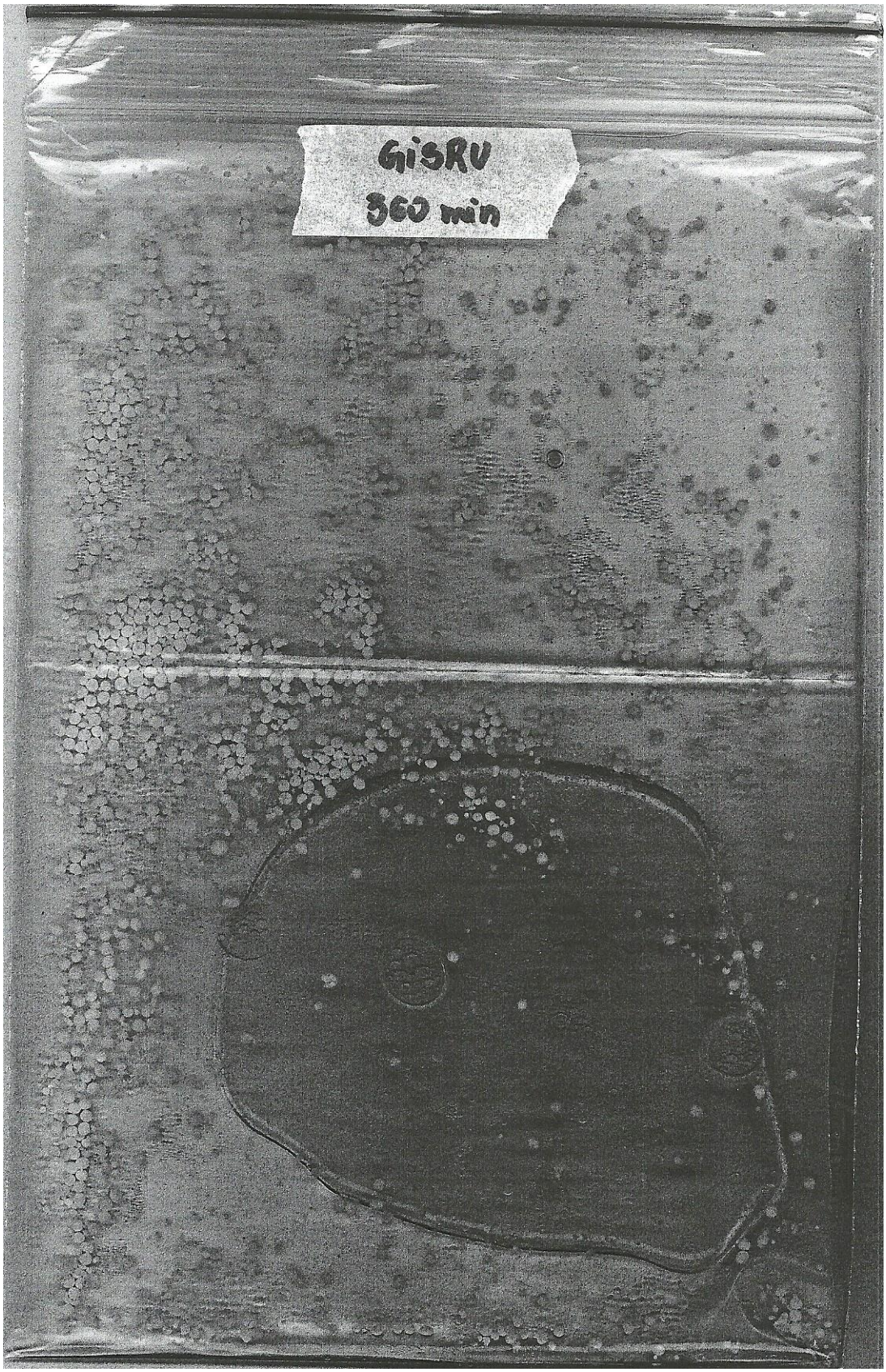
ZOU, X.; ZHAO, X.; YE, L.; WANG, Q.; LI, H. Preparation and drug release behavior of pH-responsive bovine serum albumin-loaded chitosan microspheres. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v. 21, p. 1389–1397, 2015.

APÊNDICE A – Imagem digitalizada da amostra GISRU após 10 minutos em contato com meio líquido com condições análogas à solução de salmoura.

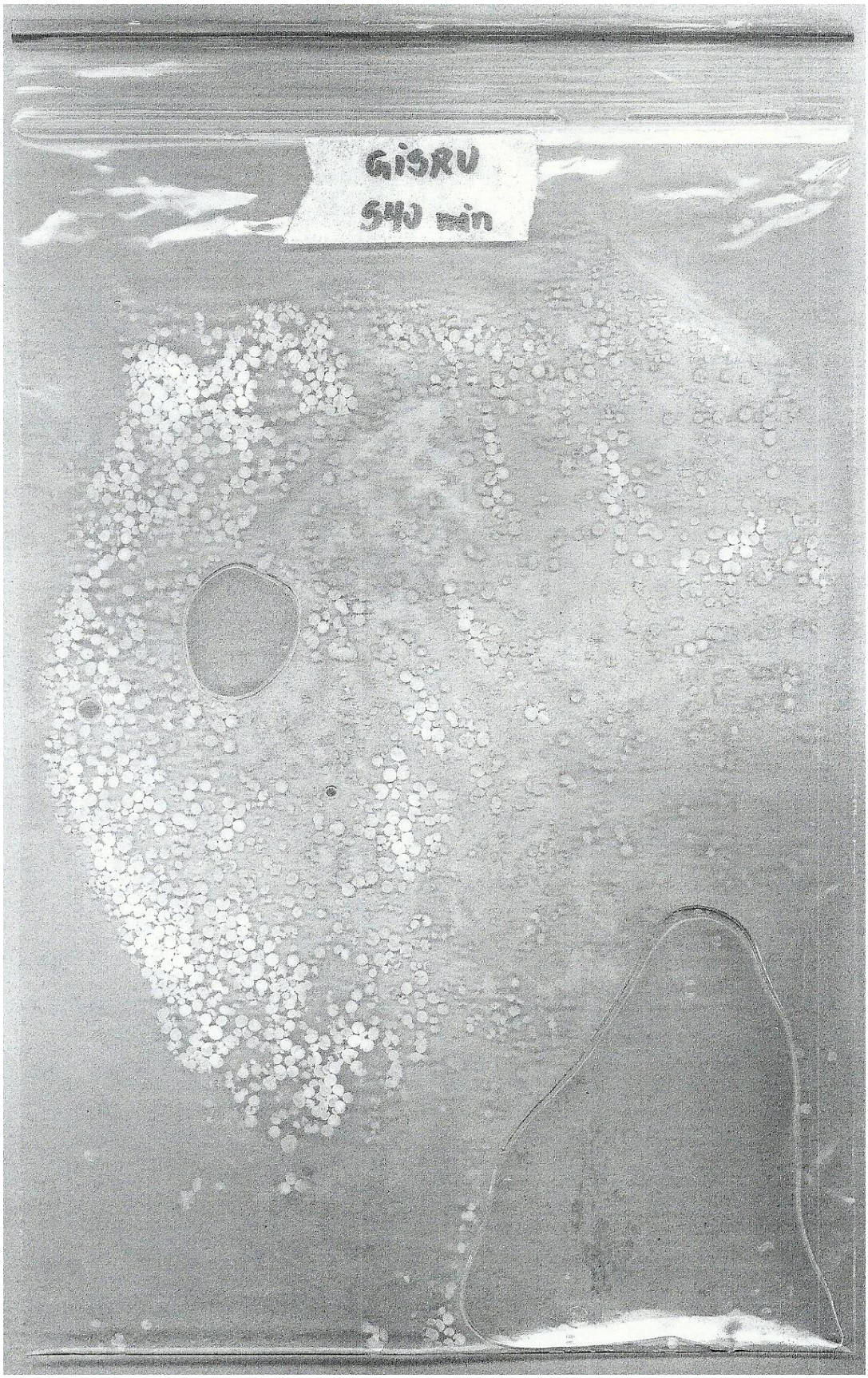


APÊNDICE B – Imagem digitalizada da amostra GISRU após 60 minutos em contato com meio líquido com condições análogas à solução de salmoura.

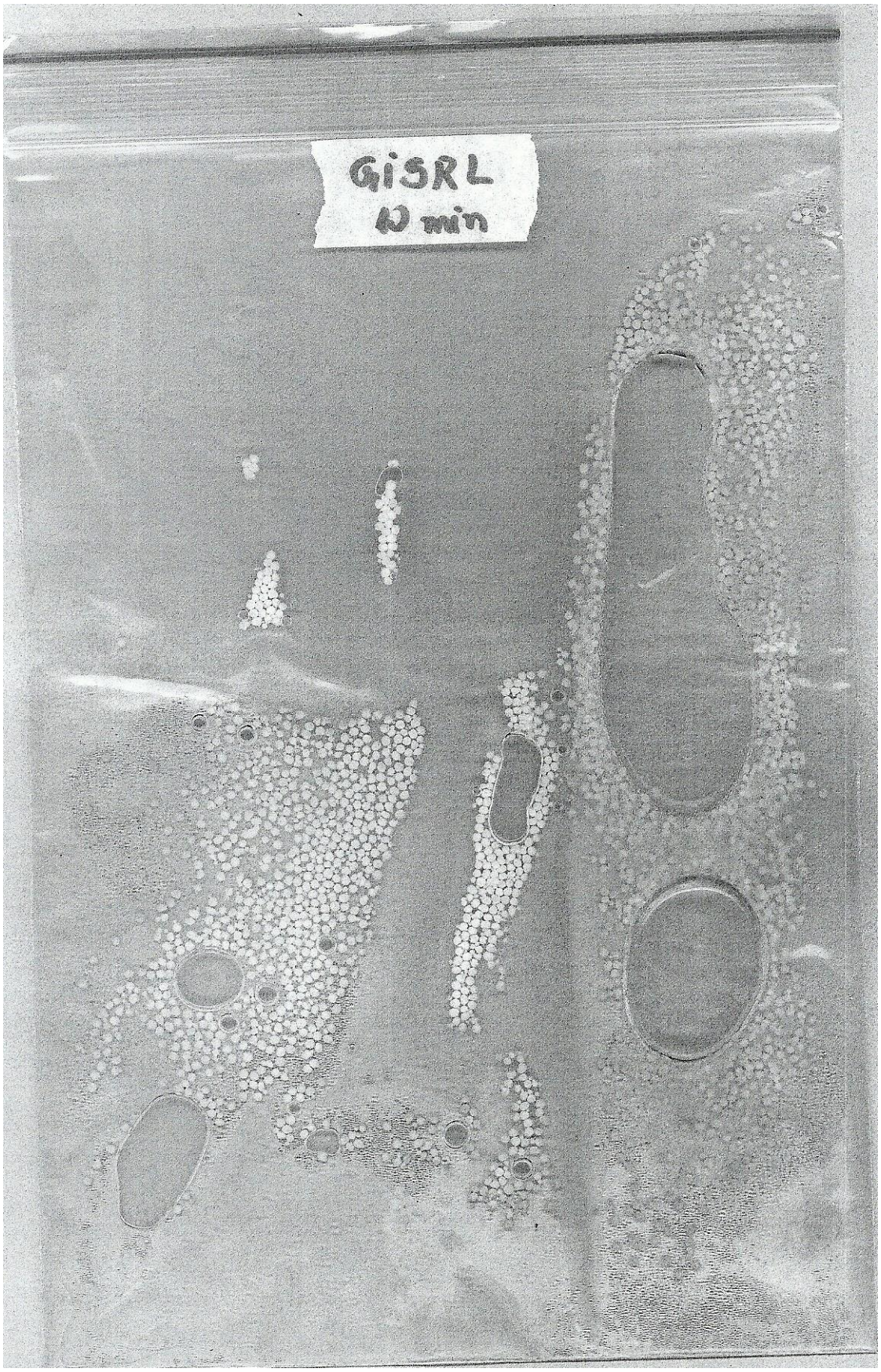
APÊNDICE C – Imagem digitalizada da amostra GISRU após 360 minutos em contato com meio líquido com condições análogas à solução de salmoura.



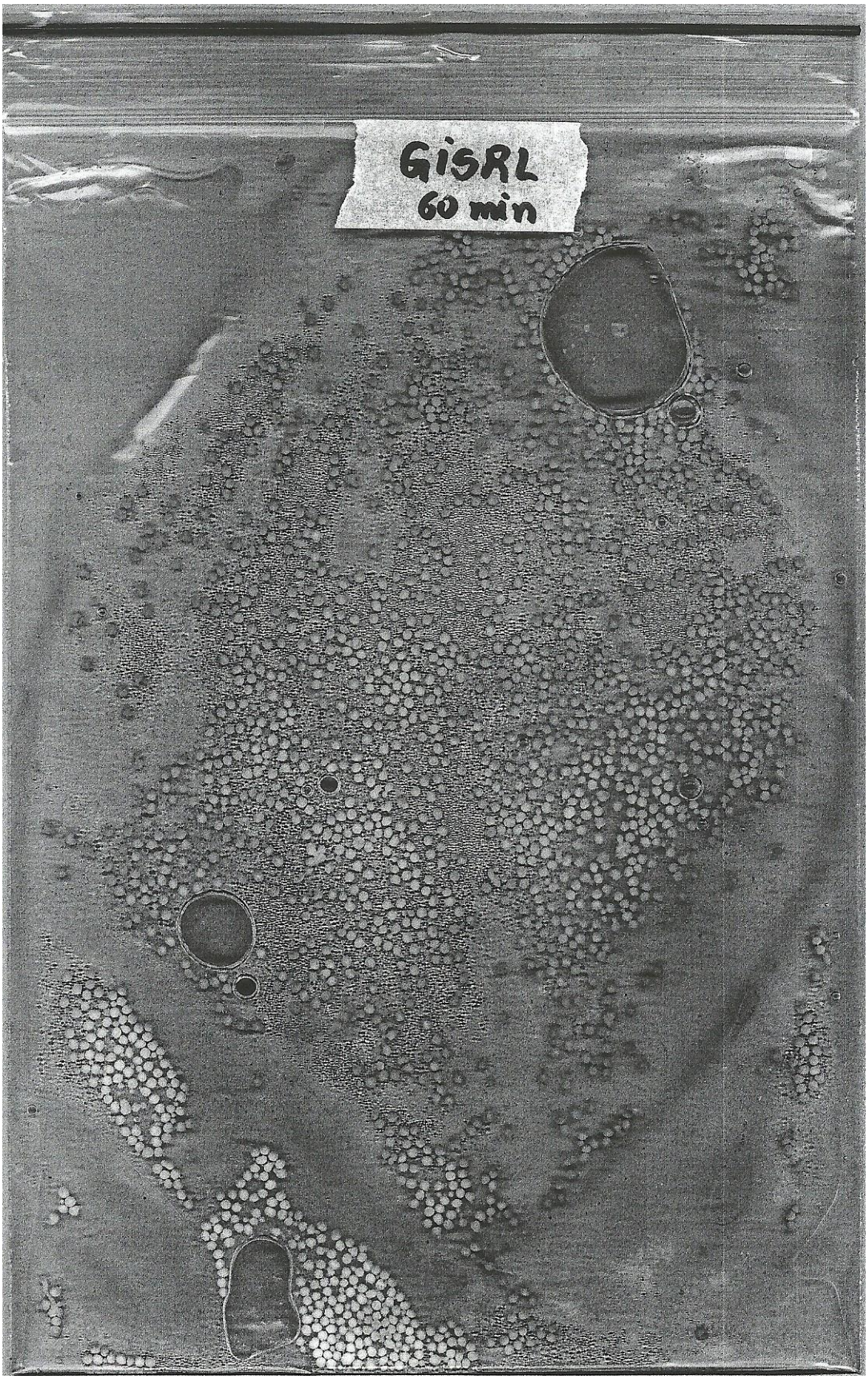
APÊNDICE D – Imagem digitalizada da amostra GISRU após 540 minutos em contato com meio líquido com condições análogas à solução de salmoura.



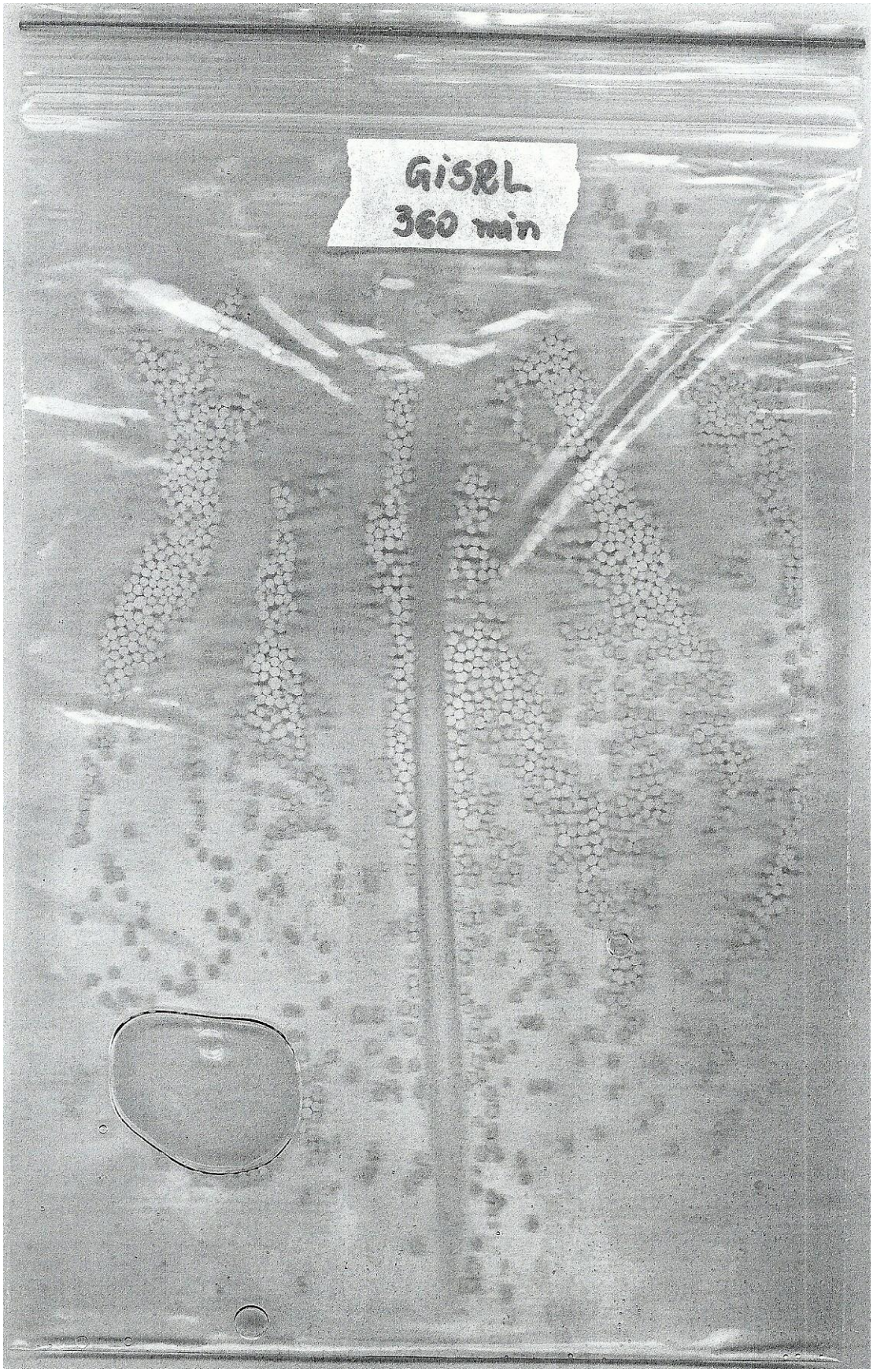
APÊNDICE E – Imagem digitalizada da amostra GISRL após 10 minutos em contato com meio líquido com condições análogas à solução de salmoura.



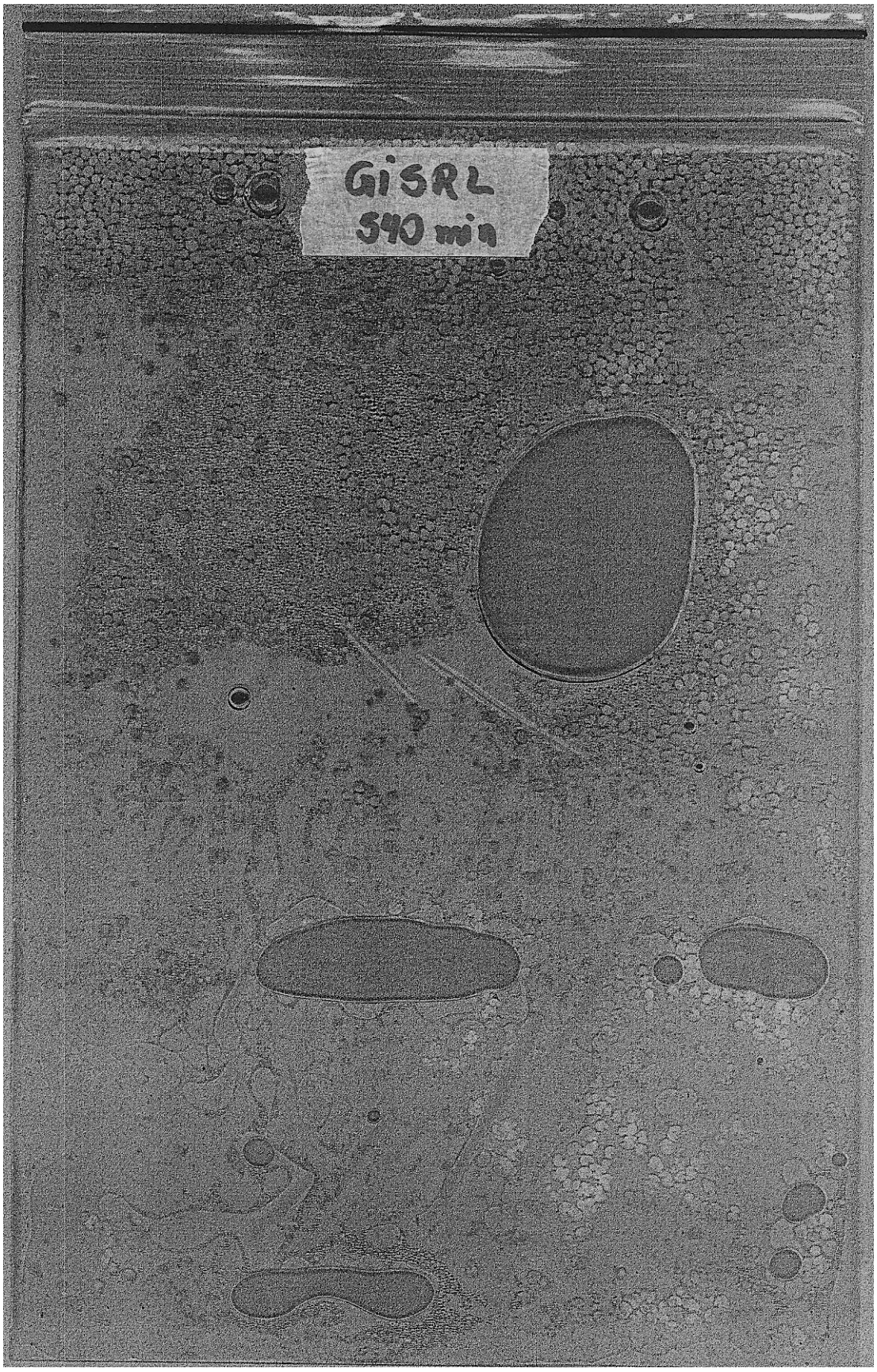
APÊNDICE F – Imagem digitalizada da amostra GISRL após 60 minutos em contato com meio líquido com condições análogas à solução de salmoura.



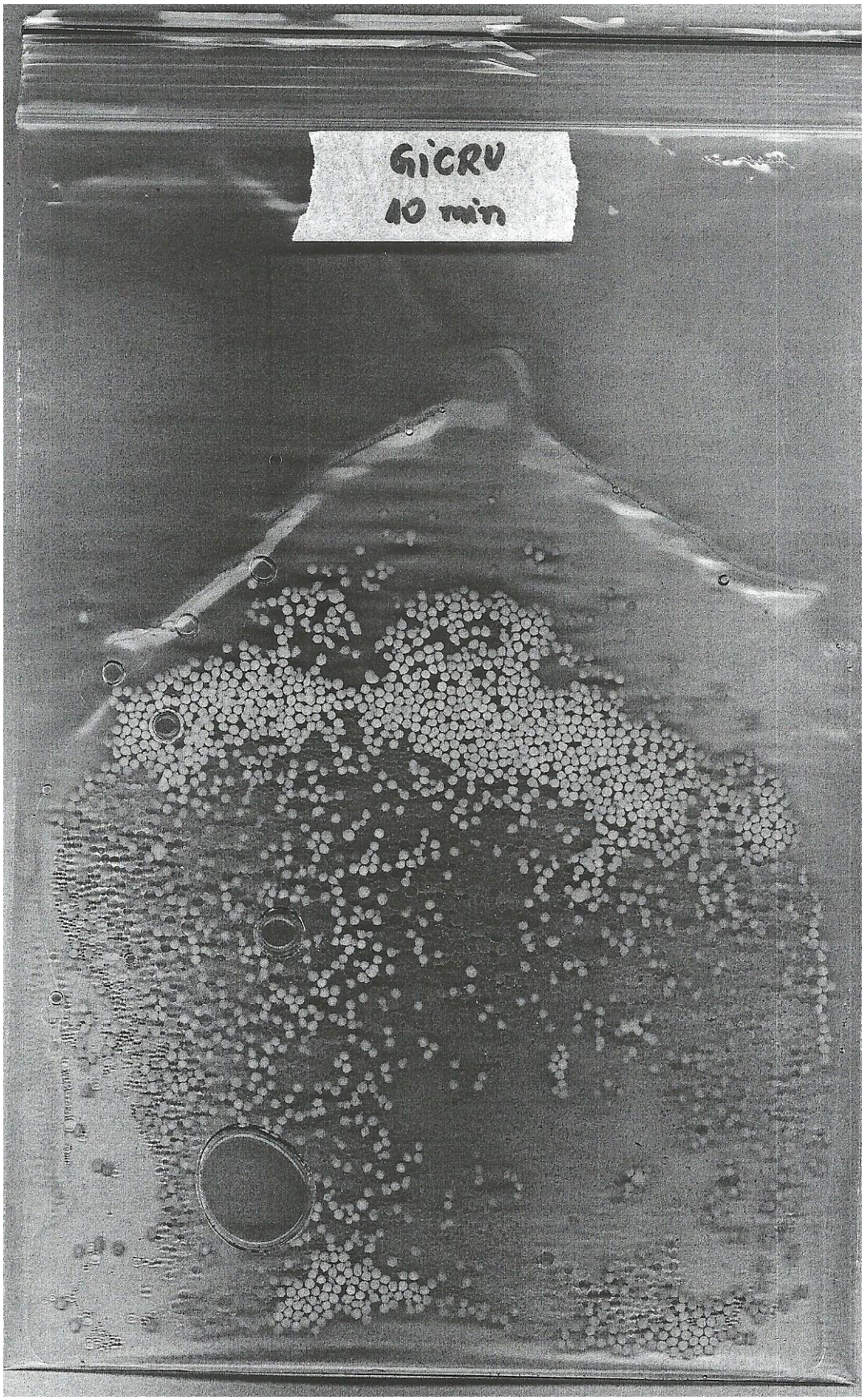
APÊNDICE G – Imagem digitalizada da amostra GISRL após 360 minutos em contato com meio líquido com condições análogas à solução de salmoura.



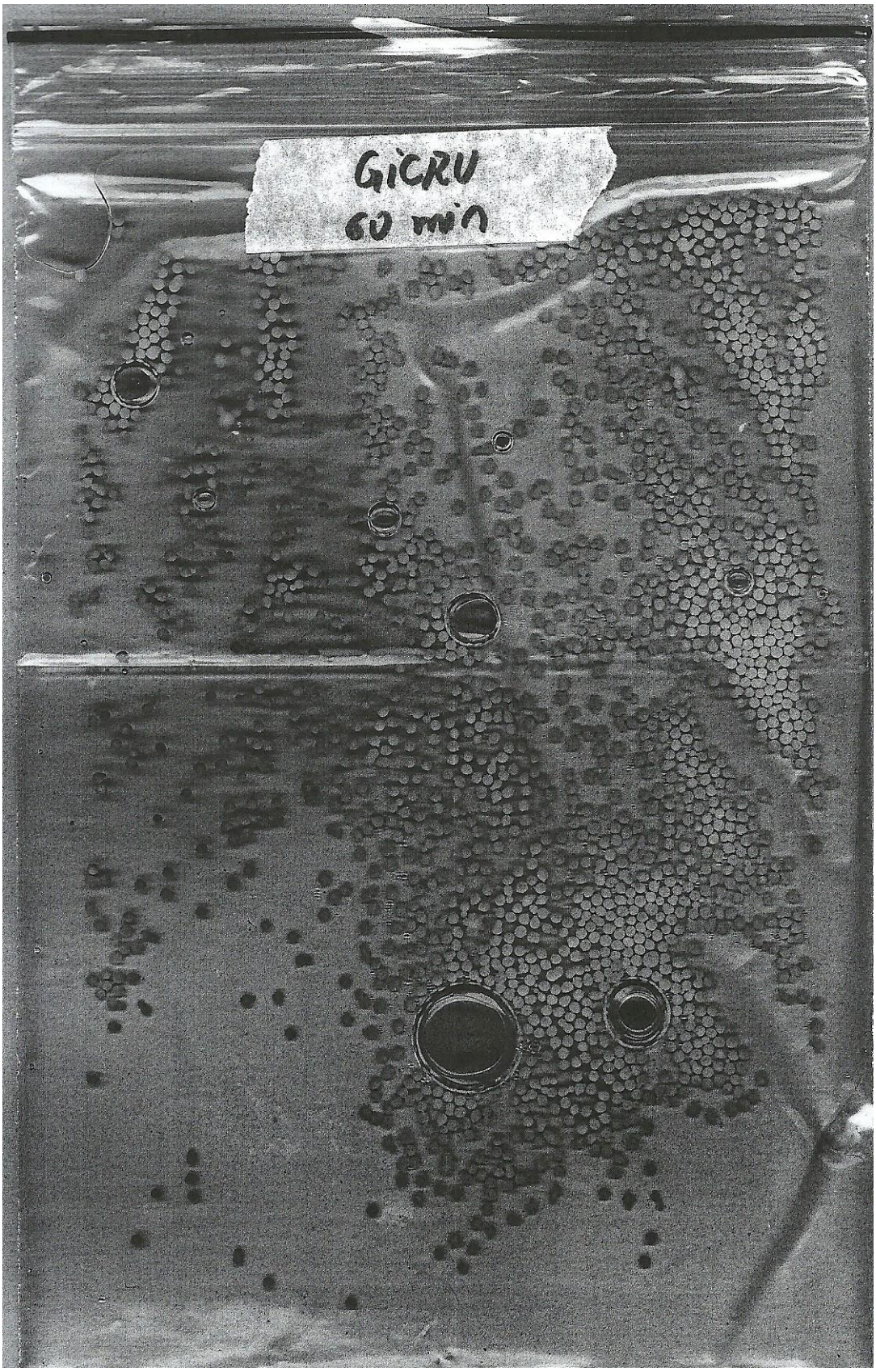
APÊNDICE H – Imagem digitalizada da amostra GISRL após 540 minutos em contato com meio líquido com condições análogas à solução de salmoura.



APÊNDICE I – Imagem digitalizada da amostra GICRU após 10 minutos em contato com meio líquido com condições análogas à solução de salmoura.

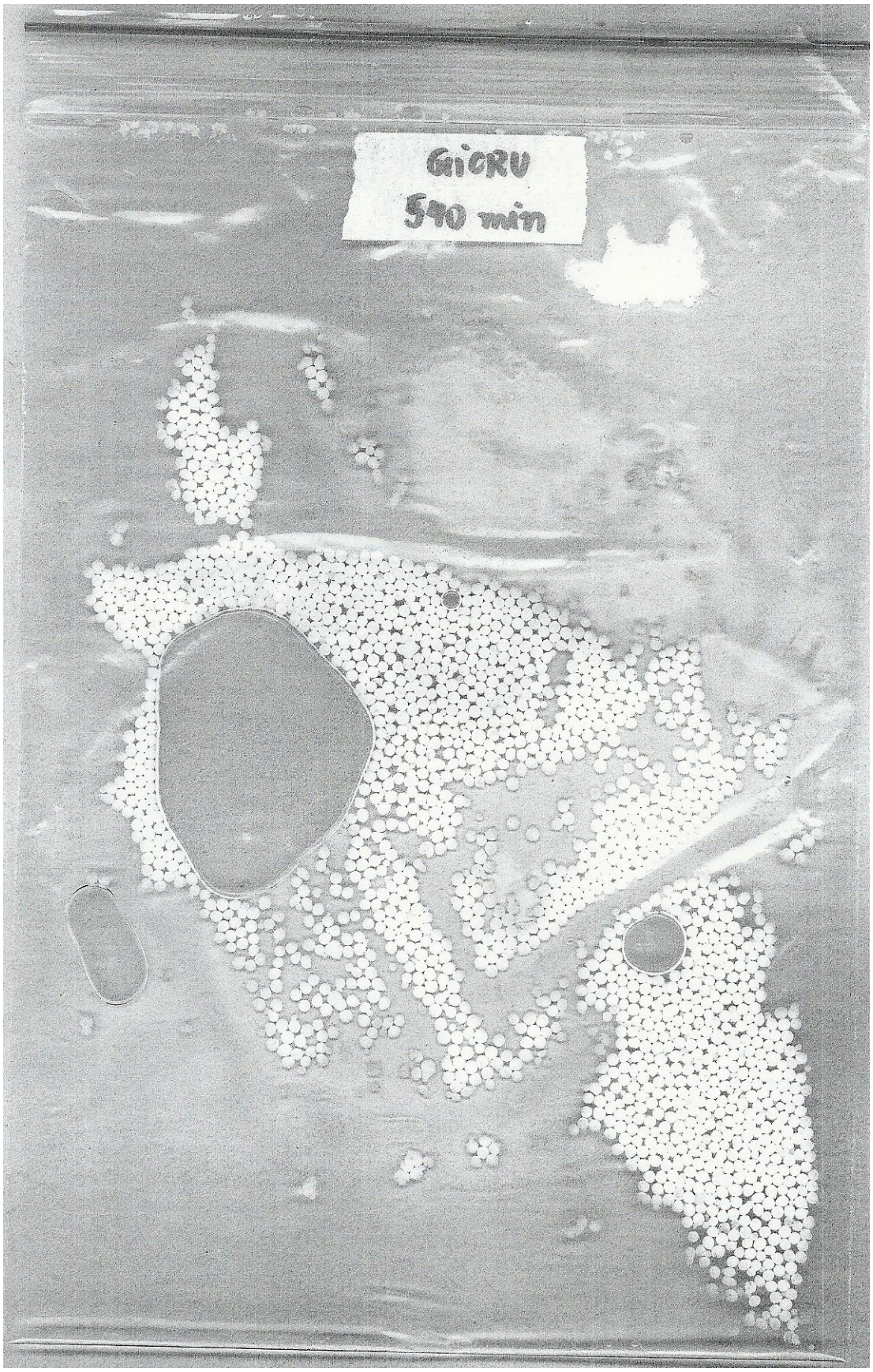


APÊNDICE J – Imagem digitalizada da amostra GICRU após 60 minutos em contato com meio líquido com condições análogas à solução de salmoura.

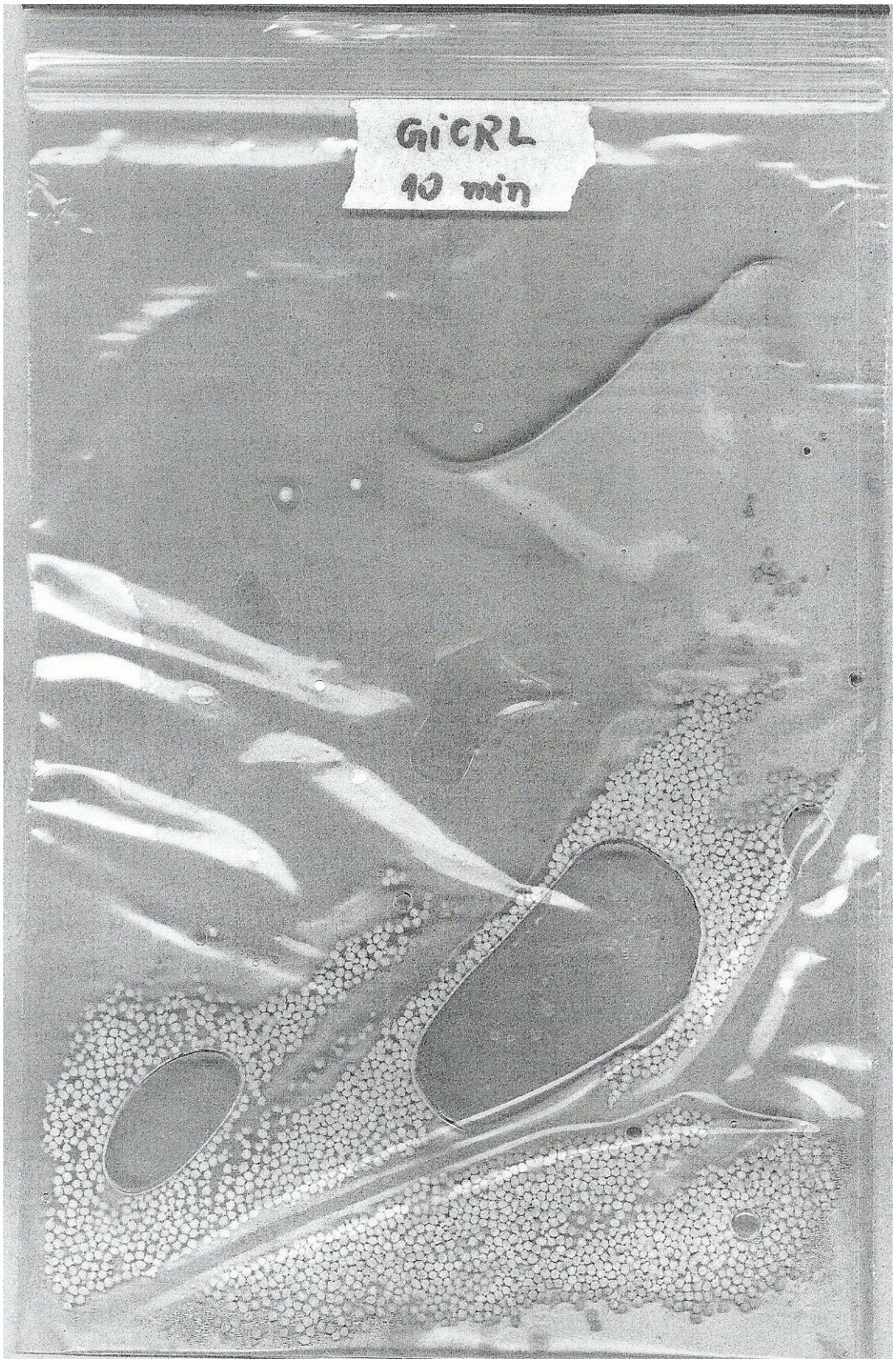


APÊNDICE K – Imagem digitalizada da amostra GICRU após 360 minutos em contato com meio líquido com condições análogas à solução de salmoura.

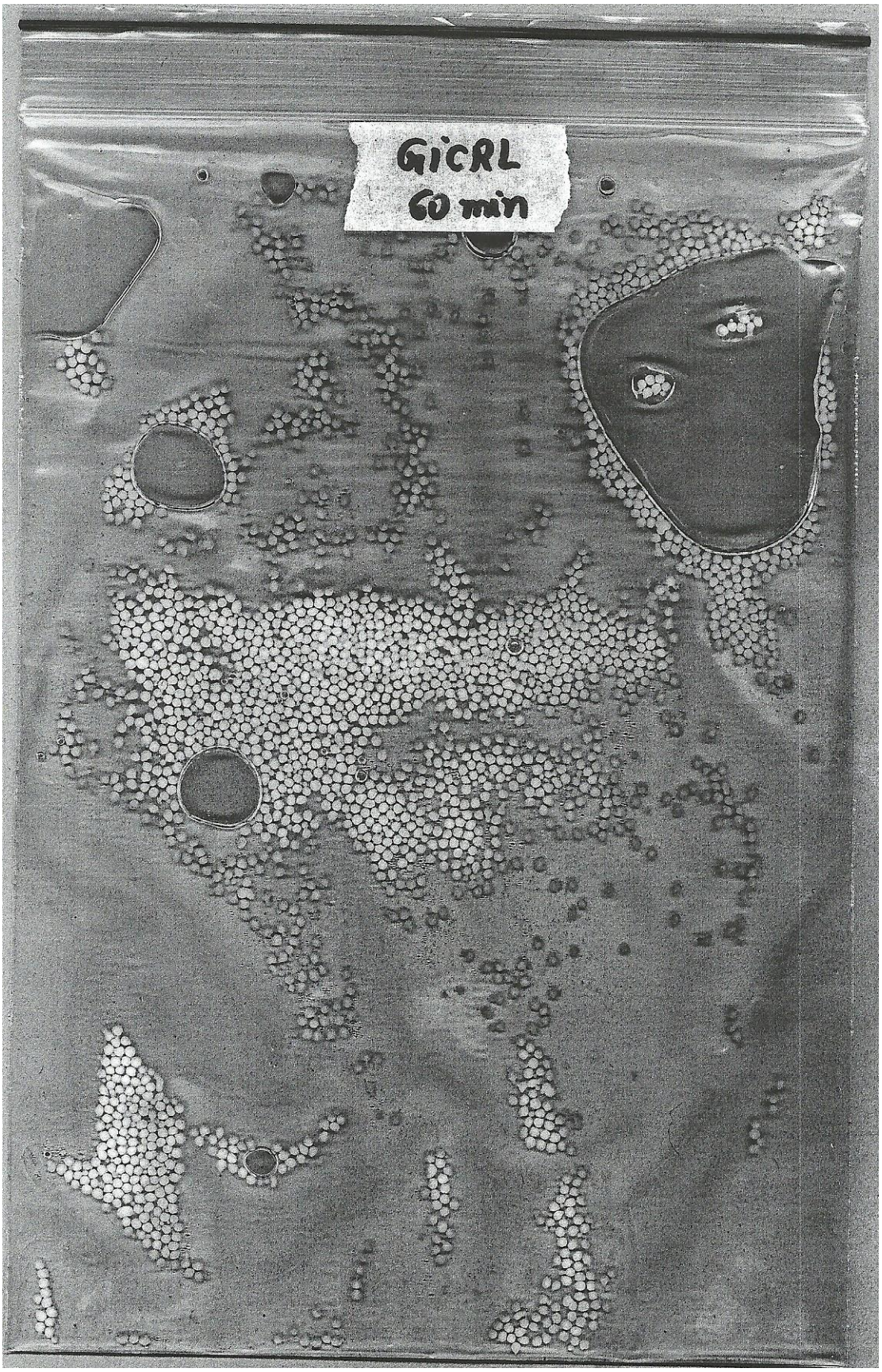
APÊNDICE L – Imagem digitalizada da amostra GICRU após 540 minutos em contato com meio líquido com condições análogas à solução de salmoura.



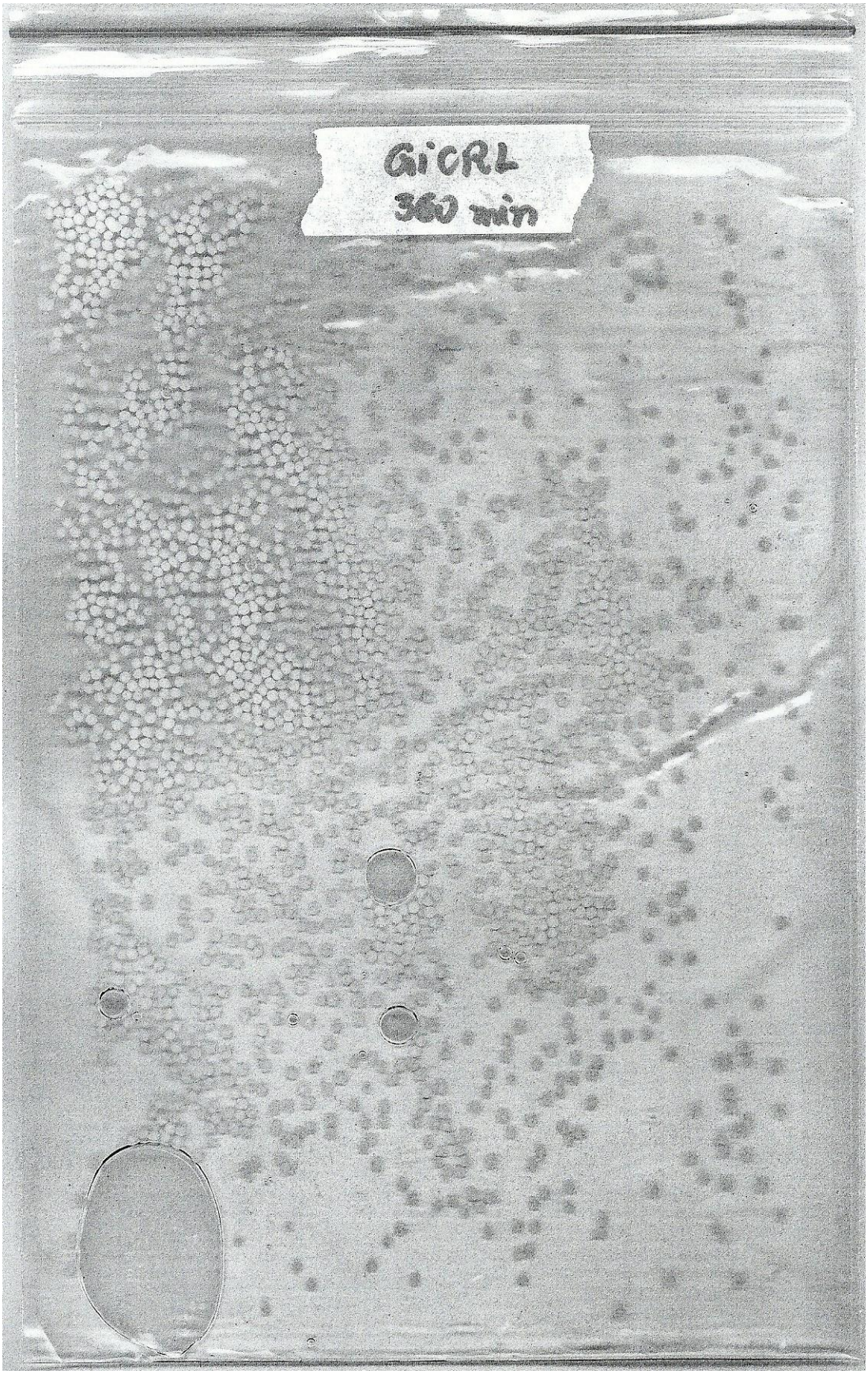
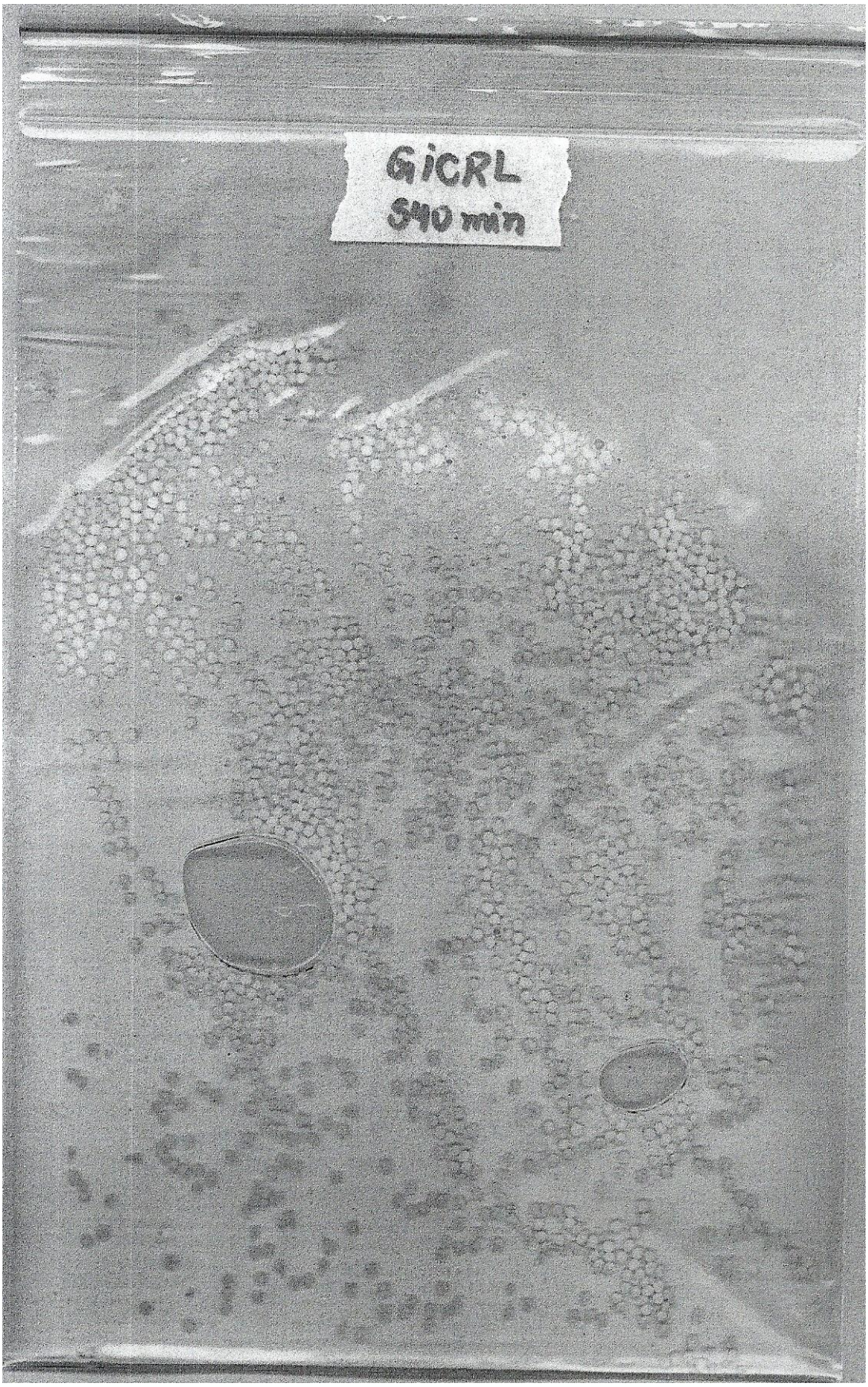
APÊNDICE M – Imagem digitalizada da amostra GICRL após 10 minutos em contato com meio líquido com condições análogas à solução de salmoura.



APÊNDICE N – Imagem digitalizada da amostra GICRL após 60 minutos em contato com meio líquido com condições análogas à solução de salmoura.



APÊNDICE O – Imagem digitalizada da amostra GICRL após 360 minutos em contato com meio líquido com condições análogas à solução de salmoura.



APÊNDICE P – Imagem digitalizada da amostra GICRL após 540 minutos em contato com meio líquido com condições análogas à solução de salmoura.