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

Adilson Roberto Locali Pereira

Microencapsulação por *spray drying* do óleo essencial de pimenta rosa *(Schinus terebinthifolius* Raddi*):* emulsões de camada dupla estabilizadas com SPI/pectina vs. emulsões de camada única estabilizadas com SPI

São José do Rio Preto
2020

Adilson Roberto Locali Pereira

Microencapsulação por *spray drying* do óleo essencial de pimenta rosa *(Schinus terebinthifolius Raddi):* emulsões de camada dupla estabilizadas com SPI/pectina vs. emulsões de camada única estabilizadas com SPI

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", Câmpus de São José do Rio Preto.

Financiadora: CNPq e FAPESP (Processo nº 2016/22727-8)

Orientadora: Profª. Drª. Vânia Regina Nicoletti
Coorientadora: Profª. Drª. Marília Gonçalves Catellan

São José do Rio Preto
2020

P436m

Pereira, Adilson Roberto Locali

Microencapsulação por spray drying do óleo essencial de pimenta rosa (Schinus terebinthifolius Raddi): emulsões de camada dupla estabilizadas com SPI/pectina vs. emulsões de camada única estabilizadas com SPI / Adilson Roberto Locali Pereira. -- São José do Rio Preto, 2020

92 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 Catellan

1. Microencapsulação. 2. Secagem em spray. 3. Óleos essenciais. 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

Adilson Roberto Locali Pereira

Microencapsulação por *spray drying* do óleo essencial de pimenta rosa *(Schinus terebinthifolius Raddi):* emulsões de camada dupla estabilizadas com SPI/pectina vs. emulsões de camada única estabilizadas com SPI

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", Câmpus de São José do Rio Preto.

Financiadoras: CNPq e FAPESP (Processo nº 2016/22727-8)

Comissão Examinadora

Profª. Drª. Vânia Regina Nicoletti
Unesp/Ibilce – Câmpus de São José do Rio Preto
Orientadora

Profª. Drª. Samantha Cristina de Pinho
USP/FZEA – Câmpus Pirassununga

Prof. Dr. Roger Darros Barbosa
Unesp/Ibilce – Câmpus de São José do Rio Preto

São José do Rio Preto
28 de fevereiro de 2020

Aos meus pais, Adilson e Maria Rosa,
e meus irmãos Bruno e Anelize.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, a quem eu devo tudo o que já conquistei.

Aos meus irmãos, Bruno e Anelize, pelo apoio em todos os momentos.

A Profª Vânia, agradeço pela oportunidade, pelo conhecimento transmitido e por sempre incentivar a pesquisa.

Ao Prof. Roger e a Profª Samantha por aceitarem o convite de compor a banca de defesa.

Agradeço todos os professores do DETA/Unesp, que desde a minha graduação compartilham seus conhecimentos dentro ou fora das salas de aula.

À empresa LINAX pela extração e fornecimento do óleo essencial de pimenta rosa e pela parceria no projeto.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa de apoio financeiro para a realização do projeto de mestrado.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro oferecido pelo Processo nº 2016/22727-8.

À Michelle, pela ajuda nas análises de DSC e CG-FID.

À Profª Natália, pela análise de identificação de voláteis no CG-MS.

À Nathalie, pelo suporte nas análises de atividade antioxidante e antimicrobiana.

À Daniele pelo apoio nas análises de cromatografia.

À Profª Marília pela co-orientação.

Ao Laboratório de Caracterização Estrutural (LCE/DEMa/UFSCar) pela análise de microscopia eletrônica de varredura.

Ao Laboratório de Engenharia de Alimentos (LEA/EPUSP/USP) pela análise de densidade de partículas em picnômetro a gás.

Ao Laboratório de Engenharia de Processos (FEA/Unicamp) pela análise de distribuição de tamanho de partículas.

Aos colegas do Laboratório de Medidas Físicas por toda ajuda na realização de análises.

Aos amigos de pós-graduação, que ingressaram comigo em 2018, Marcio, Rodrigo, Kamilla, Carol e Bruna, obrigado por todos os momentos compartilhados.

“Conheces o nome que te deram,
não conheces o nome que tens”

José Saramago (Todos os Nomes)

RESUMO

A microencapsulação por *spray drying* de materiais hidrofóbicos, como o óleo essencial de pimenta rosa (*Schinus terebinthifolius* Raddi), baseia-se na estabilização eficiente da emulsão óleo em água a ser seca. Os complexos resultantes de interações eletrostáticas entre proteínas e polissacarídeos são capazes de fornecer maior atividade interfacial quando comparados às proteínas sozinhas. O principal objetivo deste trabalho foi examinar o papel da pectina nas propriedades físico-química de microcápsulas produzidas por *spray drying* estabilizadas por uma camada única de proteína ou por uma dupla camada de proteína/pectina. O óleo de pimenta rosa foi caracterizado em relação a sua composição de voláteis, índice de refração, densidade, viscosidade, tensão superficial e faixa de temperatura de evaporação. Foram avaliadas a atividade da água, higroscopicidade, isotermas de sorção, reconstituição, propriedades de fluxo, tamanho de partícula e propriedades morfológicas dos pós secos. A estabilidade durante o armazenamento foi avaliada, bem como sua atividade antioxidante. A atividade antimicrobiana das microcápsulas foi determinada *in vitro* e *in situ* usando leite integral e desnatado como sistemas modelo. A composição química do óleo essencial mostrou predominância de α-pineno, β-pineno, β-mirceno, δ-3-careno, D-limoneno e germacreno D. As partículas SPI/pectina melhor preservaram as proporções dos compostos voláteis presentes no óleo puro, enquanto partículas contendo apenas SPI apresentaram maior perda (cerca de 10%) de compostos voláteis após a produção. O índice de refração e a densidade do óleo de pimenta rosa foram 1,473 e 845,10 kg/m^3, respectivamente, apresentando resultados característicos de óleos com grande número de cadeias não saturadas. O óleo apresentou comportamento reológico típico de um fluido Newtoniano e sua temperatura de ebulição variou de 148,9 a 197,4 °C. Os pós produzidos a partir de emulsões de dupla camada apresentaram maior atividade de água e menor higroscopicidade (0,280, 8,5%) quando comparados aos pós de camada única (0,176, 9,3%). Ambos os pós apresentaram boa solubilidade em água (cerca de 70%) e boa dissolução em água e em óleo. A fluidez do pó foi afetada pela formulação, com pós de camada única apresentando maior coesão do que os de camada dupla. A adição de pectina permitiu uma distribuição mais homogênea dos tamanhos das partículas, impedindo a formação de partículas e aglomerados superdimensionados. A microscopia eletrônica de varredura mostrou partículas esféricas com ausência de poros, o que é desejável para maior preservação dos compostos voláteis. As isotermas de sorção dos pós foram classificadas como isotermas sigmóides do tipo II, com o modelo GAB apresentando bom ajuste aos dados experimentais. Ambas microcápsulas

permitiram uma liberação gradual de voláteis, bem como melhor preservação de suas propriedades antioxidantes durante o armazenamento em comparação ao óleo livre. No ensaio de atividade antimicrobiana *in vitro*, as partículas de SPI/pectina apresentaram maiores halos de inibição nos primeiros dias avaliados. Quando adicionadas ao leite, ambas as formulações reduziram o crescimento bacteriano em quantidades que variaram de 2 a 6 Log UFC/mL para as amostras avaliadas, enquanto o óleo puro apresentou um comportamento semelhante ao controle, sem nenhum tratamento. Foi observada redução mais rápida do crescimento microbiano no leite para partículas de SPI/pectina.

Palavras–chave: Óleo essencial de pimenta rosa. Isolado proteico de soja. Pectina de alta metoxilação. *Spray drying*. Microencapsulação. Interação proteína-polissacarídeo.

ABSTRACT

Microencapsulation by *spray drying* of hydrophobic materials, such as pink pepper essential oil (*Schinus terebinthifolius* Raddi), relies on the efficient stabilization of the oil-in-water emulsion to be dried. Association colloids resulting from electrostatic interactions between proteins and polysaccharides are able to provide higher interfacial activity compared to proteins alone. The main purpose of this study was to examine the role of pectin in the physical properties of emulsion and *spray drying* powders stabilized by protein single-layer or by double layer of protein/pectin. Pink pepper oil was characterized by volatile composition, refractive index, density, viscosity, surface tension and evapor/ation temperature range. Water activity, hygroscopicity, sorption isotherms, reconstitution, flow properties, particle size and morphological properties of the dry powders were evaluated. Storage stability was evaluated as well as antioxidant activity. The antimicrobial activity of microcapsules was determined *in vitro* and *in situ* using whole and skimmed milk as model systems. The chemical composition of the essential oil showed the predominance of α-pinene, β-pinene, β-mircene, δ-3-carene, D-limonene and Germacrene D. SPI/pectin particles better preserved the volatile proportions present in pure oil, whereas particles containing only SPI presented greater loss (about 10%) of volatile compounds after production. The refractive index and density of the pink pepper oil were 1.473 and 845.10 kg/m^3, respectively, presenting characteristic results of oils with a great number of unsaturated chains. The oil had typical rheological behavior of a Newtonian fluid and its boiling temperature ranged from 148.9 to 197.4 °C. Powders produced from double-layer emulsions presented higher water activity and lower hygroscopicity (0.280, 8.5%) compared to single-layer powders (0.176, 9.3%). Both powders presented good water solubility (about 70%) and good dissolution in water and in oil. Powder flowability was affected by formulation, with single-layer powders presenting greater cohesion than double-layer ones. Addition of pectin allowed a more homogeneous distribution of particle sizes, preventing formation of oversized particles and agglomerates. Scanning electron microscopy showed spherical particles with absence of pores, which is desirable for greater preservation of the volatile compounds. Sorption isotherms of the powders were classified as sigmoid isotherms type II, and the GAB model presented a good fit to experimental data. Both microcapsules allowed a more gradual release of volatiles, as well as a better preservation of their antioxidant properties during storage than the free oil. In the *in vitro* antimicrobial activity assay, the SPI/pectin particles presented larger inhibition halos in the first days of the evaluated period. When added to milk, both formulations reduced bacterial growth by 2 to 6 Log CFU/mL, while

pure oil showed similar behavior to the control, without any treatment. A faster reduction of microbial growth in milk was observed for SPI/pectin particles.

Keywords: Pink pepper essential oil. Soy protein isolate. High methoxylation pectin. Spray drying. Microencapsulation. Protein-polysaccharide interaction.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Pimenta rosa (*Schinus terebinthifolius* Raddi).....20
Figura 2 - Esquema de micropartículas com sistema reservatório (a) e matricial (b).....23
Figura 3 - Esquema de microcápsula de camada única (a) e de camada dupla (b).....27
Figura 4 - Picos de α-pineno (1), sabineno (2), β-pineno (3), β-mirceno (4), α-felandreno (5) δ-3-careno (6), p-cimeno (7), D-limoneno (8), δ-elemeno (9), cariofileno (10), germacreno D (11), α-muuroleno (12), δ-cadineno (13), Elemol (14) e Germacreno B (15) no cromatograma de óleo essencial de pimenta rosa (a); Termograma típico obtido em DSC da vaporização dos voláteis do óleo essencial (b).....48
Figura 5 - Distribuição do tamanho de partículas para as microcápsulas de SPMO e SMO.....57
Figura 6 - Micrografias MEV capturadas em FEI Magellan 400 L das microcápsulas de óleo essencial de pimenta rosa produzidas por *spray drying* de emulsões de camada única (a, c, e) e dupla camada (SPMO) (b, d, f).....59
Figura 7 - Micrografias MEV capturadas por Philips XL-30 FEG das microcápsulas de óleo essencial de pimenta rosa produzidas por *spray drying* de emulsões de camada única (SMO) (a, c) e dupla camada (SPMO) (b, d).....60
Figura 8 - Umidade de equilíbrio e aspecto físico das amostras de pó armazenadas em diferentes umidades relativas (25ºC).....62
Figura 9 - Isotermas de adsorção das microcápsulas de óleo de pimenta rosa a 25ºC ajustadas para o modelo de GAB.....63
Figura 10 - Liberação de α-pineno (a), β-pineno (b), β-mirceno (c), δ-3-careno (d), D-limoneno (e) e germacreno D (f) do óleo essencial de pimenta rosa puro (OEP) e do óleo extraído das microcapsulas de camada única (SMO) e de camada dupla (SPMO) durante 20 dias de armazenamento (25ºC / UR = 52.3%).....65
Figura 11 - Atividade antioxidante equivalente ao Trolox (μg Trolox / mg de amostra) do óleo essencial puro (PEO) e dos óleos extraídos de microcápsulas de camada única (SMO) e de camada dupla (SPMO) no tempo t = 0 e t = 20 de armazenamento (25ºC / UR: 52,3%).....68
Figura 12 - Crescimento de *S. aureus* ATCC 6538 em leite desnatado (a) ou integral (b) e de *L. monocytogenes* ATCC 15313 em leite desnatado (c) ou integral (d) a 37°C.....73
Figura 1A - Câmara de secagem com gotejamento da amostra.....91

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Monoterpenos e sesquiterpenos encontrados em óleos essenciais 22
Tabela 2 - Composição das emulsões de camada única de proteína (SMO) e de dupla camada de proteína/pectina (SPMO) 32
Tabela 3 - Composição dos voláteis e propriedades físico-quimicas do óleo essencial de pimenta rosa 45
Tabela 4 - Propriedades físico-quimicas das microcápsulas de óleo essencial de pimenta rosa sem pectina (SMO) e com pectina (SPMO) 51
Tabela 5 - Parâmetros do modelo de GAB ajustado para as amostras de microcápsulas 63
Tabela 6 - Atividade antimicrobiana de microcapsulas de óleo essencial de pimenta rosa de camada única (SMO) e de camada dupla (SPMO) em diferentes tempos de armazenamento....71
Tabela 1A - Umidade dos materiais de parede utilizados na produção das microcapsulas 90
Tabela 2A - Proporções dos materiais utilizados no preparo das emulsões testadas 91
Tabela 3A - Rendimento e umidade dos pós secos a 120, 140, 160 e 180ºC 92

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 15
2 OBJETIVOS 17
2.1 Objetivos específicos 17
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 18
3.1 Óleos essenciais 18
3.1.1 Óleo essencial de pimenta rosa (Schinus terebinthifolius Raddi) 19
3.1.1.1 Terpenos 21
3.2 Microencapsulação de óleos essenciais por spray drying 23
3.3 Interação entre proteínas e polissacarídeos 26
3.3.1 Isolado proteico de soja 27
3.3.2 Pectina de alta metoxilação 28
3.4 Atividade antimicrobiana de microcápsulas de óleo essencial 30
4 MATERIAIS E MÉTODOS 32
4.1 Materiais 32
4.2 Métodos 32
4.2.1 Produção das microcápsulas de óleo essencial de pimenta rosa 32
4.2.1.1 Preparo das emulsões de camada única e de camada dupla 32
4.2.1.2 Produção das microcápsulas por spray drying 33
4.2.2 Caracterização do óleo essencial de pimenta rosa 33
4.2.2.1 Compostos voláteis: análise CG-MS e CG-FID 33
4.2.2.2 Índice de refração 34
4.2.2.3 Densidade e tensão superficial 35
4.2.2.4 Viscosidade 35
4.2.2.5 Temperatura de vaporização 35
4.2.3 Caracterização das microcápsulas 35
4.2.3.1 Rendimento de secagem 35
4.2.3.2 Retenção de óleo 36
4.2.3.3 Umidade e atividade de água das microcápsulas 36

4.2.3.4 Higroscopicidade 36
4.2.3.5 Tempo de dissolução 36
4.2.3.6 Tempo de molhamento 37
4.2.3.7 Solubilidade 37
4.2.3.8 Ângulo de contato 37
4.2.3.9 Densidade aparente e densidade compactada 38
4.2.3.10 Densidade real e porosidade aparente 38
4.2.3.11 Fluidez e coesividade dos pós 38
4.2.3.12 Ângulo de repouso 39
4.2.3.13 Distribuição do tamanho de partícula 39
4.2.3.14 Morfologia de partículas 40
4.2.4 Estabilidade no armazenamento das microcápsulas 40
4.2.4.1 Isotermas de sorção de água 40
4.2.4.2 Liberação dos voláteis 41
4.2.4.3 Atividade antioxidante 41
4.2.5 Atividade antimicrobiana das microcápsulas 42
4.2.5.1 Atividade antimicrobiana in vitro 42
4.2.5.2 Efeito inibidor do crescimento bacteriano em leite 43
4.2.6 Análise Estatística 43
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO 44
5.1 Caracterização do óleo essencial de pimenta rosa 44
5.2 Propriedades físico-químicas das microcápsulas 50
5.2.1 Propriedades de vida de prateleira: umidade, atividade de água e higroscopicidade das microcápsulas. 52
5.2.2 Propriedades de reconstituição e fluxo dos pós 53
5.2.3 Distribuição do tamanho de partículas e propriedades morfológicas 57
5.3 Estabilidade no armazenamento das microcápsulas 61
5.3.1 Isotermas de sorção 61
5.3.2 Liberação dos voláteis 64
5.3.3 Atividade antioxidante 68

5.4 Atividade antimicrobiana das microcápsulas 70
5.4.1 Atividade antimicrobiana in vitro 70
5.4.2 Efeito inibidor do crescimento bacteriano em leite..... 72
6 CONCLUSÃO..... 75
7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS 76
REFERÊNCIAS..... 77
APÊNDICE A – TESTES PRELIMINARES 88

1 INTRODUÇÃO

Os óleos essenciais têm despertado interesse de indústrias e pesquisadores nos últimos anos por serem compostos naturais, extraídos de plantas aromáticas e possuírem uma complexa composição química que lhes confere atividade bioativa. O mercado de óleos essenciais tem se expandido de tal forma que se estima que sua procura apresente taxa de crescimento anual em torno de 8,6% no período compreendido entre os anos de 2019 e 2025 (GRANDVIEW-RESEARCH, 2019). O baixo rendimento de extração - de aproximadamente 1% dependendo da espécie - somado à pouca quantidade de plantas aromáticas existentes (cerca de 10% de todas as espécies de plantas no mundo) transforma os óleos essenciais em compostos de alto valor no mercado (SVOBODA; GREENAWAY, 2003).

O óleo essencial de pimenta rosa é extraído dos frutos da aroeira vermelha (*Schinus terebinthifolius* Raddi), árvore nativa do Brasil e amplamente encontrada em outros países da América do Sul (LORENZI; MATOS, 2008). Esse óleo possui monoterpenos como o limoneno e o mirceno dentre os compostos químicos majoritários em sua composição (CAVALCANTI et al., 2015). Alguns trabalhos realizados demonstram que o óleo essencial de pimenta rosa apresentou resultados positivos na inibição de crescimento bacteriano e fúngico em alimentos, aumento da vida de prateleira e potencial para encapsulação (DANNENBERG et al., 2016; DANNENBERG et al., 2017; ANDRADE et al., 2017; ROMANI et al. 2018).

Tendo em vista que a aplicação de óleos essenciais em alimentos em sua forma livre é dificultada pela sua alta volatilidade e baixa solubilidade em água, assim como redução de suas propriedades antimicrobianas e antioxidantes devido a interações com outros componentes da matriz do alimento, estudos atestam que o uso da técnica de microencapsulação apresenta vantagens em proteger os agentes bioativos de fatores externos adversos e garantir maior estabilidade durante o armazenamento desses produtos (MARESCA et al., 2016; CASTRO-ROSAS et al., 2017).

A microencapsulação por *spray drying* destaca-se por ser uma técnica amplamente utilizada na produção de microcápsulas na indústria, apresentando baixo custo de processamento, simples operação e possibilidade de operação contínua (WU et al., 2014). A microencapsulação de materiais hidrofóbicos por esta técnica depende da estabilização eficiente da emulsão de óleo em água a ser seca, a partir da adição de surfactantes, como as proteínas e polissacarídeos.

As proteínas presentes no isolado proteico de soja (SPI), devido ao seu caráter parcialmente hidrofílico e parcialmente hidrofóbico, formam uma camada adsorvida na

interface óleo/água de uma emulsão, justificando a sua aplicação como emulsificante na indústria (SINGH; MOHAMED, 2007). Por outro lado, um polissacarídeo como a pectina de alta metoxilação possui uma estrutura de polieletrólito aniônico linear, o que lhe confere grande potencial como estabilizante em emulsões (ABERKANE; ROUDAUT; SAUREL, 2014). Abaixo do pH isoelétrico da proteína (em torno de 4,0), as proteínas e a pectina são atraídas devido a existência de cargas opostas, formando complexos (LAM et al., 2007). Os complexos resultantes de interações eletrostáticas entre proteínas e polissacarídeos apresentam maior atividade interfacial quando comparados às proteínas isoladamente e, quando aplicados na formação de emulsões a serem submetidas à secagem por *spray drying*, produzem microcápsulas de dupla camada, favorecendo a preservação do óleo encapsulado (SERFERT et al., 2013).

Freitas et al. (2017) avaliaram o uso do isolado proteico de soja e da pectina de alta metoxilação como materiais de parede em processos de microencapsulação. Os autores destacam que a interação formada pelo complexo proteína-polissacarídeo na etapa de emulsificação confere maior estabilidade às microcápsulas formadas, com potencial de aplicação na indústria de alimentos. Por outro lado, a secagem por *spray drying* das emulsões sem a adição de um carreador como a maltodextrina não se mostrou viável, de modo que as microcápsulas resultantes foram constituídas por uma combinação de três biopolímeros. A partir desses resultados, a questão que se coloca é qual o real papel da pectina na composição da microestrutura das cápsulas, isto é, se a interação eletrostática entre as proteínas e a pectina é significativa na proteção do material microencapsulado, ou se a adição da maltodextrina, um polissacarídeo neutro, seria suficiente para complementar a ação das proteínas da soja na matriz encapsulante.

Assim, a objetivo do presente trabalho foi analisar comparativamente as microcápsulas de óleo essencial de pimenta rosa produzidas a partir de emulsões de camada única, utilizando apenas SPI como estabilizante, e de emulsões estabilizadas por dupla camada, formadas a partir da interação eletrostática das proteínas da soja com pectina de alta metoxilação, ambas adicionadas de maltodextrina como adjuvante de secagem por *spray drying*.

2 OBJETIVOS

O objetivo geral deste projeto foi produzir microcápsulas de óleo essencial de pimenta-rosa estabilizadas por isolado proteico de soja (camada única) e por isolado proteico de soja e pectina de alta metoxilação (camada dupla), efetuar a secagem em *spray dryer* e caracterizar as microcápsulas produzidas, visando a possibilidade de aplicação em produtos alimentícios, além de investigar o papel desempenhado pela pectina e a sua interação com o isolado proteico de soja na formação das microcápsulas e na funcionalidade do óleo microencapsulado.

2.1 Objetivos específicos

- Caracterizar o óleo essencial de pimenta rosa;
- Produzir emulsões cineticamente estáveis de óleo essencial de pimenta-rosa com duas formulações distintas: estabilizadas apenas por SPI (camada única) e estabilizadas por SPI/pectina (camada dupla);
- Produzir microcápsulas de óleo essencial de pimenta-rosa por meio da secagem em *spray dryer* das duas emulsões avaliadas, com e sem pectina;
- Caracterizar as microcápsulas por meio de análises de suas propriedades de vida de prateleira, reconstituição dos pós, fluxo dos pós, tamanho de partículas e morfologia;
- Determinar a estabilidade ao armazenamento das microcápsulas com determinação das isotermas de sorção, liberação de voláteis e atividade antioxidante;
- Avaliação da atividade antimicrobiana das microcápsulas de óleo essencial de pimenta rosa *in vitro* e *in situ,* utilizando leite como alimento modelo.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Óleos essenciais

Extraídos de diferentes órgãos de plantas, tais como folhas, frutos, caules e raízes, os óleos essenciais são líquidos voláteis ricos em compostos aromáticos. Apenas 10% (cerca de 1,700 espécies) de todas as plantas existentes no mundo são classificadas como plantas aromáticas que sintetizam óleos essenciais como metabólitos secundários. Dentre essas espécies destacam-se o gengibre, a canela, o alecrim, o manjericão, dentre outros (EL ASHBAHANI et al., 2015).

Além da ação como agentes aromatizantes os óleos essenciais são compostos de atividade antimicrobiana, sendo empregados como conservantes naturais no controle de microrganismos patogênicos e deteriorantes (MARESCA et al., 2016; CALO et al., 2015). A forma como esses óleos atuam na inibição microbiana ainda é motivo de estudo em diversos ramos de pesquisa. Alguns dos mecanismos de ação desses compostos nas células microbianas envolvem redução do ATP e do pH intracelular, alterações na morfologia das células com danos nas membranas citoplasmáticas e lise celular (HYLDGAARD, MYRGIND, MEYER, 2012).

A bioatividade dos óleos essenciais se deve à sua complexa composição química, a qual pode chegar a uma mistura de mais de 200 compostos. Tal composição pode ser dividida em duas frações, sendo uma fração volátil e outra composta de resíduos não-voláteis. A fração volátil (90 – 95% do óleo total) contém monoterpenos, sesquiterpenos, álcoois, ésteres, hidrocarbonetos e seus derivados. A fração de resíduos não-voláteis (5 – 10%) é composta de ceras, esteróis, ácidos graxos, carotenoides e flavonoides (LUQUE DE CATRO et al., 1999).

A obtenção de óleos essenciais pode ser realizada através de diferentes métodos de extração. A hidrodestilação, uma das técnicas mais antigas a serem utilizadas para esta finalidade, consiste na separação dos compostos do óleo através do aquecimento de um recipiente contendo a parte da planta e água com subsequente evaporação e condensação dos compostos químicos do óleo. O sistema de extração possui um condensador e um decantador que coleta o condensado e separa o óleo essencial da água. Outras técnicas também utilizadas na extração desses óleos são: extração por prensagem à frio, extração por fluído supercrítico, extração assistida por ultrassom e extração assistida por micro-ondas. O baixo rendimento da extração, de aproximadamente 1% dependendo da espécie e da parte da planta, faz com que os óleos essenciais sejam substâncias de alto valor agregado (EL ASHBAHANI et al., 2015).

O segmento de aplicações em alimentos e bebidas mostra-se emergente no mercado de óleos essenciais, sendo sua principal fonte de receita em 2018. Estima-se que a procura por óleos essenciais se expanda nos próximos anos, com uma taxa de crescimento anual composta de 8,6% no período compreendido entre os anos de 2019 e 2025. Novas técnicas inovadoras de extração juntamente com a conscientização do consumidor final sobre os benefícios à saúde fornecidos pelos óleos essenciais impulsionaram seu crescimento no mercado de países emergentes como Índia, China, México e Brasil, onde o aumento das taxas de urbanização e industrialização influenciaram a maior demanda por novos aromas e sabores nas indústrias (GRANDVIEW-RESEARCH, 2019).

3.1.1 Óleo essencial de pimenta rosa (*Schinus terebinthifolius* Raddi)

A pimenta rosa *(Schinus terebinthifolius* Raddi) é o fruto da aroeira-vermelha, árvore de pequeno a médio porte que pode alcançar de sete a dez metros de altura. Os frutos da aroeira são globosos e agrupados em forma de cachos, sendo pequenos e de coloração avermelhada (Figura 1) (LORENZI; MATOS, 2008). O fruto maduro pode ser utilizado como condimento, apresentando sabor levemente picante e adocicado. Quando seco e moído, se assemelha à pimenta-do-reino (SIGRIST, 2014). De acordo com Lorenzi (2009) a *Schinus terebinthifolius* pertence à Família *Anacardiaceae*, sendo uma planta nativa do Brasil e que pode ser encontrada também em grande parte da América do Sule Central, além de alguns países da Europa. Tem grande resistência a variações climáticas, sendo utilizada em paisagismo urbano. Os frutos ainda possuem atividade antioxidante, anti-inflamatória, antibacteriana, antifúngica e inseticida (ABDOU; SALEH; KHALIL, 2015).

Os grãos de pimenta rosa são ricos em óleo essencial, apresentando considerável valor econômico (AFFONSO et al., 2012). Em sua composição química foi observada a predominância de monoterpenos, tais como o limoneno, mirceno, α-pineno e β-pineno e sesquiterpenos, como β-cubebeno, δ-cadineno, γ-cariofileno e copaeno (DANNENBERG et al., 2019; CAVALCANTI et al., 2015). Outros constituintes tais como resinas, flavonoides, alcaloides, esteroides, taninos, esteroidais e saponinas também podem ser encontrados no fruto (BENDAOUD et al., 2010; MARTINS et al., 2014).

Figura 1 - Pimenta rosa (*Schinus terebinthifolius* Raddi)

Fonte: AUTOR, 2020.

Estudos foram conduzidos na área médica (ABDOU; SALEH; KHALIL, 2015; SERENIKI et al., 2016), farmacológica (CAVALCANTI et al., 2015; COLE et al., 2014; NOCCHI et al., 2017), odontológica (PEREIRA et al., 2011), zootécnica (GOIS et al., 2017; CAIRO et al., 2018) e de alimentos (DANNENBERG et al., 2016; DANNENBERG et al., 2017; ROMANI et al., 2018; ANDRADE et al., 2017), investigando a bioatividade dos compostos presentes no óleo essencial extraído de frutos, folhas ou caules da *Schinus terebinthifolius* Raddi.

Dannenberg et al. (2016) encontraram resultados promissores na inibição do crescimento microbiano, com a aplicação de 2% do óleo de pimenta rosa resultando em menor aumento da carga microbiana em ensaio *in situ* realizado em queijo Minas previamente contaminado com *Listeria monocytogenes*. Em estudo conduzido por Romani et al. (2018), óleo essencial de pimenta rosa foi incorporado em *blends* de amido de arroz e proteína de peixe na preparação de filmes. Na aplicação dos filmes em maçãs frescas cortadas, os autores observaram inibição da enzima peroxidase, de modo que os filmes apresentaram potencial para uso em embalagens de alimentos e na inibição de escurecimento enzimático. Dannenberg et al. (2017) também testaram o uso do óleo essencial em embalagens para alimentos. A aplicação dos filmes ativos em queijos fatiados mostrou resultados satisfatórios na inibição de *Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes* para todas as concentrações testadas (2 a 6% de óleo essencial). Andrade et al. (2017) estudaram a extração do óleo essencial de pimenta rosa pela técnica de extração por fluido supercrítico com posterior encapsulação do óleo em ácido polilático. As microcápsulas apresentaram bons resultados de eficiência de encapsulação e tamanho de partículas, destacando a importância do estudo do óleo de pimenta rosa para produção e aplicação de novos produtos.

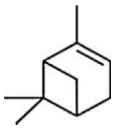
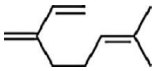
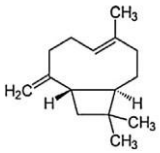
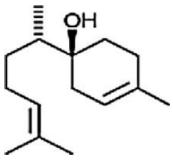
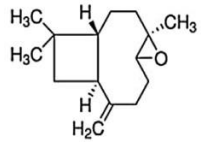
3.1.1.1 Terpenos

Os óleos essenciais são constituídos predominantemente por terpenos, substâncias sintetizadas no citoplasma das células de plantas, tendo em sua estrutura molecular várias unidades de isopreno (C_5H_8). Possuem duas frações principais: os monoterpenos ($C_{10}H_{16}$), que constituem cerca de 80% dos óleos essenciais, e os sesquiterpenos ($C_{15}H_{24}$) (Tabela 1). Alguns terpenos são reportados na literatura como substâncias de grande interesse no estudo contra o câncer, a malária e doenças cardíacas, além de suas atividades inseticidas e antimicrobianas. No entanto, estudos destacam que o uso de terpenos isolados não demonstrou atividade antimicrobiana em diversos ensaios *in vitro*, sendo a interação sinérgica entre vários desses compostos que possibilita uma inibição microbiana mais eficaz (HYLDGAARD, MYGIND, MEYER, 2012; EL ASHBAHANI et al., 2015). Tal combinação pode ser encontrada nos óleos essenciais.

Os monoterpenos são líquidos incolores de odores aromáticos característicos. Suas estruturas são altamente voláteis e lipofílicas (não polares). Derivados oxigenados (aldeídos, álcoois, cetonas e ácidos carboxílicos) podem surgir a partir das estruturas básicas dos monoterpenos. Esses derivados recebem o nome de terpenóides (CLARKE, 2008).

Um monoterpeno de grande interesse é o mirceno, sendo muitas vezes utilizado como ponto de partida de processos de síntese de aromas e sabores como os do mentol, linalool e geraniol na indústria. Este composto é um monoterpeno acíclico derivado de insaturações de 2,6-dimetiloctano, possuindo dois isômeros, o β-mirceno, amplamente encontrado em extratos de plantas, e o α-mirceno, que não ocorre naturalmente, mas pode ser facilmente sintetizado em laboratório. Seu odor é descrito na literatura como amadeirado e lembra o odor de algumas frutas como a uva e o pêssego. Embora ocorra naturalmente em diversas espécies de plantas, a extração do mirceno por esse meio ainda não é viável economicamente, de modo que sua obtenção pode ocorrer mais facilmente a partir da terebintina, nome dado ao líquido rico em compostos voláteis extraído por destilação de resinas de coníferas. Dentre os compostos majoritários da terebintina estão o α-pineno, β-pineno, 3-careno, e o limoneno. A obtenção de mirceno pode ocorrer por pirólise a partir do β-pineno, que é aquecido a altas temperaturas (450 ºC-600 ºC) e então arrefecido, resultando em mirceno (BEHR; JOHNEN, 2009).

Tabela 1 - Monoterpenos e sesquiterpenos encontrados em óleos essenciais.

Componente	Estrutura molecular	Fórmula química	Massa molar	Ponto de ebulição (ºC)
Monoterpeno				
D-Limoneno		$C_{10}H_{16}$	136,23	175,4
α-Pineno		$C_{10}H_{16}$	136,23	157,9
Mirceno		$C_{10}H_{16}$	136,23	167,0
Sesquiterpeno				
β-Cariofileno		$C_{15}H_{24}$	204,36	268,4
α-Bisabolol		$C_{15}H_{26}O$	222,37	153,0
Óxido de Cariofileno		$C_{15}H_{24}O$	220,35	279,7

Fonte: Adaptado de EL ASHBAHANI et al., 2015.

Os sesquiterpenos são constituídos por três unidades combinadas de isoprenos e são encontrados principalmente em plantas superiores, tendo como precursor o pirofosfato de farnesila e existindo em diferentes formas, linear, bicíclica e tricíclica. Os derivados oxigenados dos sesquiterpenos, que surgem a partir de reações de oxidação fotoquímica que ocorrem naturalmente nas plantas, são os responsáveis por uma série de atividades biológicas e terapêuticas das espécies vegetais em que são encontrados (BUCKINGHAM, 1996; MCCASKILL; CROTEAU, 1998).

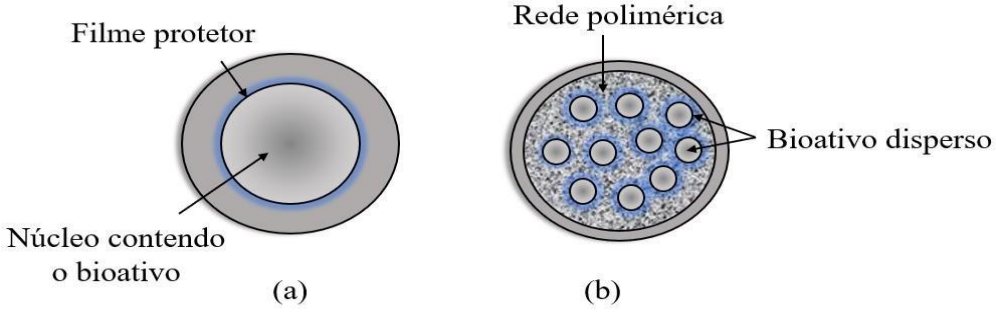
3.2 Microencapsulação de óleos essenciais por *spray drying*

A microencapsulação por *spray drying* de óleos essenciais tem se mostrado uma técnica promissora na preservação desses materiais, protegendo-os de agentes externos que podem acelerar a sua degradação, tais como altas temperaturas, luz ultravioleta e presença de oxigênio (DESAI; JIN, 2005; TIMILSENA et al., 2016).

Costa, Moggridge e Saraiva (2006) destacam que a proteção de compostos ativos como os óleos essenciais em veículos biomoleculares tem sido foco de diversas pesquisas nos últimos anos, sobretudo no que diz respeito à liberação controlada dos compostos microencapsulados ao longo de um período de tempo. A liberação do agente ativo microencapsulado requer uma desestruturação do material de parede que reveste a microcápsula. A taxa de liberação dependerá das interações existentes entre o núcleo e o material de parede, que pode ser formulado de acordo com o gatilho de liberação almejado. Quando se deseja utilizar o pH como gatilho de liberação, por exemplo, recomenda-se a utilização de coberturas cuja estrutura química possa ser planejada para se romper apenas em pH particular pré-estabelecido (LAKKIS, 2007).

As micropartículas produzidas podem ser classificadas conforme o arranjo de suas estruturas, sendo: sistema reservatório, aquele em que o material encapsulado está localizado no centro da partícula, muitas vezes como uma única gota revestida por um filme protetor; e sistema matricial, onde o material encapsulado se encontra disperso em pequenas gotículas pela matriz da cápsula, podendo conter parte do material na superfície das partículas. O primeiro sistema compreende as microcápsulas propriamente ditas e ao segundo sistema dá-se o nome de microesferas (Figura 2). O termo encapsulação, no entanto, tem sido empregado para os dois casos, microcápsulas e microesferas (AZEREDO, 2005).

Figura 2 - Esquema de micropartículas com sistema reservatório (a) e matricial (b).



Fonte: AUTOR, 2020.

A preparação de microcápsulas pode ser dividida em três diferentes tipos de processos (SUAVE et al., 2009; COMUNIAN; FAVARO-TRINDADE, 2016):

- químicos, como os métodos de inclusão molecular e polimerização interfacial (1-500 µm);
- físico-químicos, como a coacervação complexa e evaporação de solvente (20-1000 µm);
- físicos, tais como a secagem por atomização (*spray drying*), nebulização em corrente de ar frio (*spray-chilling*), co-cristalização e liofilização (*freeze-drying*) (5-500 µm).

A microencapsulação de óleos essenciais por *spray drying* é foco de diversas indústrias que produzem aromas, por transformar o óleo essencial - um composto pouco solúvel em água - em um produto em pó com maior solubilidade e possibilitar mais alternativas de aplicação em alimentos. Em trabalhos realizados nos últimos anos, diversos óleos essenciais como o de alecrim, orégano, gengibre e cravo foram microencapsulados utilizando esta técnica (BOTREL et al., 2012; FERNANDES et al., 2013; FERNANDES et al., 2014; FERNANDES et al., 2016; TEODORO et al., 2018).

De acordo com Barbosa et al. (2005) a estabilidade das emulsões contendo os óleos essenciais ou aromas a serem encapsulados por *spray drying* é um dos principais fatores a serem considerados na microencapsulação destes compostos, com emulsões mais estáveis apresentando maior eficiência de encapsulação e menor quantidade de óleo não-encapsulado.

A secagem por *spray drying* destaca-se como um método amplamente utilizado na produção de microcápsulas por possuir baixo custo de processamento (quando comparado com técnicas como a liofilização), simples operação, possibilitar a operação contínua e dispor de diversos equipamentos no mercado (CHANG; VARANKOVICH; NICKERSON, 2016; WU et al., 2014). No entanto, algumas desvantagens têm sido relatadas com o uso desta técnica, como instabilidade na força para pulverizar o líquido em gotas, o que resulta na formação de aglomerados que diminui a estabilidade dos produtos secos (VEIGA et al., 2019).

O processo compreende na atomização da solução em pequenas gotículas a serem submetidas a uma etapa de secagem utilizando ar aquecido e subsequente coleta das partículas sólidas (BECK-BROICHSITTER et al., 2011). Segundo Dziezak (1988) o processo de microencapsulação por secagem em *spray dryer* envolve três etapas básicas, sendo elas a preparação da emulsão a ser processada, a homogeneização da emulsão e a atomização.

A microencapsulação de compostos hidrofóbicos deve ser precedida por uma etapa de emulsificação, que consiste na dispersão dos compostos lipídicos bioativos em uma fase contínua de base aquosa, podendo contar com a adição de partículas sólidas para aumentar a

estabilidade do sistema formado pela emulsão (KACI et al., 2017). Hidrocolóides e proteínas são os principais aditivos utilizados na estabilização de emulsões O/W (DICKINSON, 2009).

Quanto menor o tamanho das gotas em uma emulsão, melhor será a sua estabilidade. A sonicação apresenta-se como uma técnica eficaz na redução do tamanho das gotas de uma emulsão ao mesmo tempo em que preserva a interação entre os biopolímeros. Nesse contexto, a aplicação de ultrassom de alta potência em emulsões, com o objetivo de alterar suas propriedades, como a viscosidade, a habilidade de gelificação dos biopolímeros e o aumento da estabilidade tem sido investigada (ALBANO, NICOLETTI, 2018).

O material de parede escolhido para a microencapsulação deve atender às propriedades físico-químicas desejadas para o produto final e possuir boa eficiência em processos de secagem por *spray dryer*, uma vez que desempenha papel fundamental na eficiência de encapsulamento e na estabilidade das micropartículas obtidas (BAKRY et al, 2015). Goma arábica, inulina, amido modificado, proteína do soro do leite e maltodextrina são os materiais de parede mais utilizados nos trabalhos que envolvem a microencapsulação de óleos essenciais por *spray drying* (VEGAS et al., 2019). As maltodextrinas são carboidratos de baixo custo, baixa viscosidade e altamente solúveis em água, características que possibilitam a sua aplicação na encapsulação de compostos promovendo boa estabilidade oxidativa (POURASHOURI et al., 2014). No entanto, a maioria dos carboidratos são adicionados em processos de microencapsulação combinados com proteínas ou gomas, uma vez que sozinhos não apresentam propriedades interfaciais suficientes para garantir uma elevada eficiência no processo (GHARSALLAOUI et al., 2007).

3.3 Interação entre proteínas e polissacarídeos

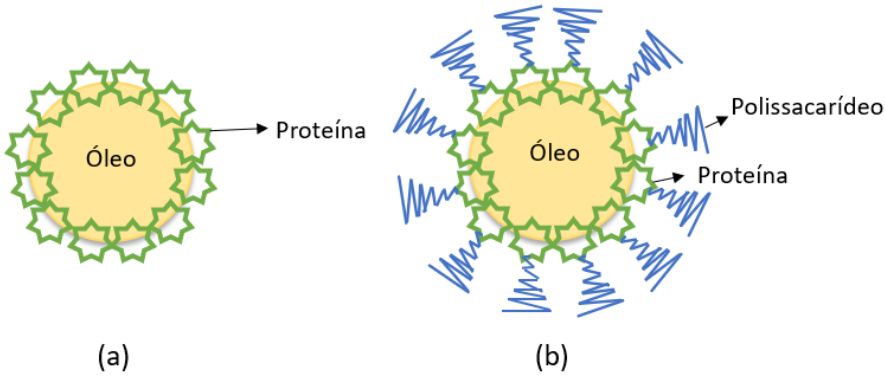
As emulsões são sistemas termodinamicamente instáveis pela ação de diversos mecanismos físico-químicos que afetam a mobilidade e agregação de suas gotas, como sedimentação, floculação, coalescência e cremeação, o que com o passar do tempo resulta em um produto com duas fases líquidas separadas. Para aumentar a estabilidade de emulsões a indústria de alimentos faz uso de processos de homogeneização, para reduzir o tamanho das gotas, e aplicação de aditivos químicos que atuam como emulsificantes na mistura. Esses emulsificantes podem ser classificados em duas categorias: surfactantes de baixo peso molecular (geralmente pouco utilizados em alimentos por serem prejudiciais para a saúde em maiores quantidades) e emulsificantes macromoleculares (como proteínas do leite e do ovo, amplamente utilizadas em alimentos) (DICKINSON, 1992).

A interação entre proteínas e polissacarídeos na formação de complexos poliméricos tem sido foco de diversos estudos na área de alimentos, sobretudo na aplicação dessas misturas em dispersões, emulsões e géis. Os complexos de proteína e polissacarídeo podem desempenhar papéis importantes, causando alterações estruturais e reológicas, que afetam diretamente a viscosidade e textura desses produtos (ALBANO et al., 2019).

Diversos métodos podem ser empregados na produção de emulsões estáveis a partir da interação entre proteínas e polissacarídeos, promovendo-se a complexação dos biopolímeros através da adição de um polissacarídeo aniônico com uma proteína com pH ajustado abaixo de seu ponto isoelétrico, onde apresentará carga positiva. A proteção das gotas de óleo em uma emulsão pode ocorrer das seguintes maneiras: através da coacervação complexa dos polímeros, pela formação de complexos solúveis, pela camada de proteína (monocamada) ou pela camada de proteína com a adição de outra camada de polissacarídeo (dupla camada) (Figura 3) (ALBANO et al., 2019).

As emulsões de monocamada (ou camada única) são mais propensas a instabilidade física durante armazenamento, aquecimentos ou processos que envolvem secagem. Dessa forma, as emulsões de dupla camada se destacam por promoverem maior estabilidade a essas suspensões, a partir da interação eletrostática entre os biopolímeros. Em sua produção, primeiramente é utilizado um emulsificante iônico que se adsorve à interface O/W durante a etapa de homogeneização e, posteriormente, um biopolímero de carga oposta é disperso no sistema para promover a formação de uma segunda camada sobre as gotículas de óleo (FIORAMONTI et al., 2019).

Figura 3 - Esquema de microcápsula de camada única (a) e de camada dupla (b).



Fonte: AUTOR, 2020.

Além de melhor estabilidade promovida por estas emulsões, outras vantagens podem ser destacadas, como a proteção adicional da segunda camada contra agregação de gotas e oxidação lipídica, além de uma liberação mais controlada de compostos bioativos do que a promovida pelas emulsões de monocamada (VELÉZ-ERAZO et al., 2018).

Diversas proteínas e polissacarídeos têm sido utilizados na estabilização de emulsões de dupla camada, como o concentrado proteico do soro de leite, isolado proteico de soja, alginato de sódio e pectinas de baixo e alto teor de metoxilação, resultando em emulsões estáveis e com propriedades adequadas para o processamento de alimentos na indústria (ALBANO et al., 2019).

3.3.1 Isolado proteico de soja

O isolado proteico de soja é obtido de grãos de soja submetidos à remoção de componentes não proteicos, através de etapas de limpeza, descascamento e remoção de gorduras. Cerca de 90% de proteínas são encontradas no isolado proteico de soja (SINGH et al., 2008).

No processo de obtenção do isolado proteico de soja, os polissacarídeos insolúveis e proteínas residuais são previamente separados e removidos através de uma extração aquosa onde o pH varia de 7,0 a 10,0. Posteriormente, o extrato obtido é acidificado até atingir o seu ponto isoelétrico (pH 4,5), onde há menor solubilidade e interação com a água, ocorrendo assim a agregação e precipitação de suas proteínas, que serão conduzidas subsequentemente às etapas de separação, lavagem, neutralização e desidratação (DAMODARAN; PARAF, 1997).

Com relação a sedimentação, as proteínas de soja podem ser classificadas como 2S, 7S, 11S e 15S, onde S é a unidade Svedberg (BROOKS; MORR; 1985). As frações majoritárias na proteína, β-conglicinina (7S) e glicinina (11S), podem apresentar a capacidade de formar uma camada adsorvida na interface óleo/água de uma emulsão, sendo aplicada como emulsificante (SINGH; MOHAMED, 2007).

O isolado proteico de soja pode ser uma alternativa às proteínas do soro do leite, apresentando alta solubilidade em meio alcalino (pH > 7) e sendo uma matéria-prima barata e de fonte renovável. Seu uso vai desde a aplicação em produtos cárneos, laticínios e fórmulas infantis até o uso como material de parede em processos de microencapsulação, onde já se mostrou ser um material promissor para aumentar a eficiência do processo de encapsulação (ALBANO et al., 2019; MOSER et al., 2017).

3.3.2 Pectina de alta metoxilação

Os polissacarídeos pécticos são amplamente utilizados no setor industrial na produção de alimentos e bebidas. Além de promover aumento de viscosidade, auxiliam na melhoria da textura de produtos, controle da sinérese e contribuem na estabilização proteica (VORAGEN et al., 2009). A pectina é um polissacarídeo aniônico extraído principalmente de tecidos de vegetais, como a maçã e frutos cítricos e, dependendo de sua origem, seus grupos hidroxilas podem ser acetilados nas posições dois e três de sua cadeia, afetando a sua habilidade de formar géis (LAM et al., 2007).

O processo de geleificação é favorecido quando as pectinas se encontram em um meio ácido, com presença de açúcares e aquecimento a altas temperaturas. O grau de geleificação aumenta conforme aumenta o grau de metoxilação das cadeias do polissacarídeo, sendo que as pectinas de baixo teor de metoxilação não necessitam de baixo pH ou da presença de açúcares para formar géis estáveis, uma vez que em pectinas desse tipo a gelificação é induzida pela presença e interação de íons Ca^{2+} com seus grupos carboxilas (KUHN et al., 2012). As pectinas podem ser classificadas pelo seu grau de esterificação, sendo classificadas como de baixa metoxilação quando menos de 50% dos grupos carboxilas se encontram esterificados e em pectina de alta metoxilação quando 50% ou mais dos grupos carboxilas se encontram esterificados (VORAGEN et al., 1995; LAM et al., 2007).

Em estudo sobre as interações da pectina com o isolado proteico de soja, Lam et al. (2007) encontraram uma maior estabilidade da pectina de alta metoxilação em soluções ácidas

de isolado proteico, em relação à pectina de baixa metoxilação. Freitas et al. (2017) observaram interações atrativas entre a pectina de alta metoxilação e o isolado proteico de soja em pH inferior ao ponto isoelétrico (em torno de 4,0), resultando na formação de complexos que apresentaram potencial para aplicação em encapsulação, sobretudo em formulações com maior teor proteico.

3.4 Atividade antimicrobiana de microcápsulas de óleo essencial

A existência de consumidores cada vez mais exigentes com o tipo de alimento que consomem tem demandado uma série de estudos sobre a aplicação de compostos naturais na conservação de alimentos, em detrimento dos conservante sintéticos. Os conservantes sintéticos podem causar reações alérgicas em indivíduos sensíveis, além de apresentarem potencial para formação de subprodutos tóxicos que podem ser cancerígenos, como por exemplo, a formação de nitrosaminas a partir de nitritos. Nesse sentido, os óleos essenciais têm apresentado potencial de aplicação como agentes antimicrobianos e antioxidantes devido a existência de compostos fenólicos como os fenóis simples, taninos, quinonas, flavonas, terpenos, dentre outros (CASTRO-ROSAS et al., 2017; CALO et al., 2015).

A aplicação dos óleos essenciais em matrizes alimentícias como conservantes, no entanto, pode resultar em diminuição de seu potencial antimicrobiano com o passar do tempo, devido a interação desses compostos com as proteínas, gorduras, açúcares e sais presentes no alimento, reduzindo a disponibilidade desses óleos como agentes antimicrobianos. Dessa forma, têm sido investigados sistemas de liberação que reduzam essas interações e maximize o potencial de inibição desses materiais (CASTRO-ROSAS et al., 2017).

A microencapsulação tem sido uma técnica utilizada para a preservação desses compostos bioativos contra fatores externos que favorecem a sua degradação, garantindo a estabilidade e a liberação controlada de bioativos em alimentos (MARESCA et al., 2016). Castro-Rosas et al. (2017) destacam que além de preservar os agentes bioativos, a microencapsulação garante maior estabilidade desses componentes durante o armazenamento, sendo mais eficiente do que a adição direta desses compostos livres, além de possibilitar uma liberação mais gradativa dos agentes de interesse.

A escolha dos biopolímeros que formam a microcápsula e a maneira que o agente bioativo encontra-se distribuído no interior da partícula (mononucleado, multinucleado) afeta diretamente a sua liberação no meio em que se encontra. Quando uma rápida liberação é desejável para uma microcápsula, ela pode ocorrer por meios de solubilização, desintegração da parede ou difusão através da parede da cápsula (CALO et al., 2015; MARESCA et al., 2016).

Teodoro et al. (2014) produziram microcápsulas de óleo essencial de alecrim por *spray drying* e avaliaram sua atividade antimicrobiana quando aplicada em massa fresca, observando que além das microcápsulas preservarem os compostos antimicrobianos do óleo livre ainda possibilitaram uma extensão da atividade inibitória contra *Penicillium sp*. e *Aspergillus sp*.

Xiao et al. (2011) encapsularam nisina e timol em *spray drying* utilizando proteína de milho como material de parede. Em meio de crescimento a pH 6 e 30 °C, as microcápsulas apresentaram efeitos antimicrobianos e de inibição de crescimento contra *Listeria monocitogenes*. Em leite desnatado a 25 °C, os autores também observaram atividade antimicrobiana, com as microcápsulas inibindo o crescimento de *L. monocitogenes.*

O principal foco de bioconservantes em alimentos é a prevenção de doenças transmitidas por alimentos. De acordo com o Ministério da Saúde, entre o ano 2000 até outubro de 2015 houveram 10.666 surtos notificados no país de doenças transmitidas por alimentos, com 209.204 hospitalizações, 2.107.229 pessoas expostas e 155 óbitos. Destes casos, 14,4% foram causados *por Salmonella sp*, 7,7% por *S. aureus* e 6,5% por *E. coli*; no entanto, em 58,5% dos surtos, não houve identificação do agente etiológico causador das doenças (BRASIL, 2019).

Microrganismos como a *Listeria monocytogenes* são capazes de aderir em superfícies de contato com alimentos, como aço inoxidável e poliestireno, podendo persistir em instalações de processamento de alimentos durante meses ou anos como biofilmes. Quando protegido em biofilmes, podem tolerar altas concentrações de muitos agentes, como desinfetantes, sanitizantes e antimicrobianos, o que pode resultar na contaminação de alimentos (VALIMAA et al., 2015).

As formas como os agentes de fonte naturais, como os óleos essenciais, atuam sobre microrganismos patógenos e deteriorantes ainda é pouco esclarecida na literatura, mas alguns estudos realizados apontam que a ação desses compostos nas células microbianas envolve alterações no pH intracelular e na morfologia das células, com danos nas membranas citoplasmáticas e redução de ATP (HYLDGAARD, MYRGIND, MEYER, 2012).

Tem sido observado que se faz necessário uma maior concentração de óleo essencial para se obter os resultados de inibição desejados em matrizes alimentícias, quando comparados a ensaios realizados *in vitro*, onde uma menor concentração utilizada já apresenta resultados de inibição satisfatórios. Uma maior concentração de óleo essencial em alimentos, no entanto, pode afetar suas propriedades sensoriais, diminuindo a aceitação dos consumidores. Dessa forma, o estudo das técnicas de adição de óleos essenciais em alimentos com o objetivo de inibir o crescimento microbiano sem prejudicar suas propriedades sensoriais é desafiador. Uma alternativa para o uso em menores concentrações desses agentes naturais em alimentos é o seu uso combinado com outras técnicas de preservação já utilizadas pela indústria de alimentos, como os tratamentos de esterilização (CASTRO-ROSAS et al., 2017).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Materiais

Óleo essencial extraído de frutos maduros de pimenta rosa fornecido pela empresa LINAX - Óleos Essenciais e Destiladores (Votuporanga, SP, Brasil). Isolado proteico de soja (SPI) (Ingredientes de Tovani Benzaquen, São Paulo, SP, Brasil), pectina de alta metoxilação (HMP) (CP Kelco, São Paulo, SP, Brasil) e maltodextrina DE 10 (Get do Brasil, São João da Boa Vista, SP, Brasil) foram usados como materiais de parede.

4.2 Métodos

4.2.1 Produção das microcápsulas de óleo essencial de pimenta rosa

4.2.1.1 Preparo das emulsões de camada única e de camada dupla

Foram preparadas duas formulações de emulsão do tipo óleo em água (O/W), sendo uma com isolado proteico de soja (SPI) e a outra com o isolado proteico de soja adicionado da pectina de alta metoxilação (Tabela 2). O isolado proteico de soja e a pectina de alta metoxilação foram previamente dissolvidos em água destilada e solução tampão (pH 3,5), respectivamente. As soluções foram agitadas durante 3 horas até completa dissolução. A solução de proteína teve seu pH ajustado para 11 durante a agitação, para aumentar sua solubilidade. Após a agitação as soluções foram mantidas em repouso *overnight*. Ao fim do repouso, o pH final das soluções de SPI e pectina foi ajustado para 3,5, pH abaixo do ponto isoelétrico do SPI.

Tabela 2 - Composição das emulsões de camada única de proteína (SMO) e de dupla camada de proteína/pectina (SPMO).

Componente	**Proporção em g / 100 g de emulsão**	
	SMO	**SPMO**
Óleo essencial de pimenta rosa	10	10
Isolado proteico de soja	0,9	0,9
Pectina de alta metoxilação	0	0,5
Maltodextrina DE 10	35	34,5
Água	54,1	54,1

Para a preparação das emulsões, dispersou-se óleo de pimenta rosa na solução de SPI utilizando o agitador Ultra Turrax® (T-25, IKA, Alemanha) a 18,000 rpm durante 4 minutos. Em seguida, a solução de pectina (Formulação 2) foi adicionada a 18,000 rpm durante 4 minutos e finalmente a maltodextrina foi previamente dispersa em água a 18.000 rpm durante 10 minutos para obter uma emulsão primária. Para produzir a emulsão final, utilizou-se o ultrassom Sonic Ruptor 4000 (Omni International, USA) com sonicação das amostras (240 W, 20 kHz) por 3 minutos, a fim de se reduzir o tamanho das gotas da emulsão. A sonda de ultrassom foi posicionada cerca de 1 cm abaixo da superfície da emulsão. O béquer contendo a emulsão foi imerso em um banho de gelo para impedir o aquecimento e a volatilização dos compostos do óleo durante as etapas de emulsificação.

4.2.1.2 Produção das microcápsulas por *spray drying*

As microcápsulas de óleo essencial de pimenta rosa foram produzidas através da secagem das duas emulsões (SMO e SPMO) em *spray dryer*. As microcápsulas foram produzidas em *spray dryer* (B-290, Buchi, Suíça), equipado com bico atomizador de fluido duplo (0,7 mm de diâmetro). As condições operacionais para o *spray dryer* foram determinadas com base em testes preliminares (APÊNDICE A) e fixadas em: temperatura de entrada do ar de secagem de 140 °C, taxa de alimentação da emulsão de 2 mL/min, vazão de ar de atomização de 819 L/h e taxa de sucção do ar de secagem de 35 m^3/ h. A temperatura de saída da câmara de secagem foi monitorada e ficou em torno de 98 ºC. Após o término da secagem, as microcápsulas foram coletadas e armazenadas em frascos mantidos em dessecador, a temperatura ambiente.

4.2.2 Caracterização do óleo essencial de pimenta rosa

4.2.2.1 Compostos voláteis: análise CG-MS e CG-FID

A identificação dos compostos voláteis do óleo essencial de pimenta rosa foi realizada por cromatografia gasosa acoplada a um espectrofotômetro de massas (GC-MS QP2010 SE, Shimadzu, Japão). Uma coluna capilar de sílica fundida (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm) foi usada com hélio como gás de arraste a uma taxa de fluxo constante de 1 mL/min. As condições cromatográficas utilizadas foram: temperatura do injetor e detector a 240 °C; programação da coluna começando em 50 °C por 3 min, subindo para 60 °C a 3 °C/min, depois subindo para 75

°C a 1 °C/min e finalmente subindo para 220 °C a 3 °C/min, sendo mantida nessa temperatura por 3 min (tempo total da corrida: 76 min). As condições do espectrômetro de massas foram: temperatura da interface 240 °C; fonte de ionização para impacto de elétrons a 70 eV e 230 °C; e extensão de massa entre 35 e 350 m/z.

A quantificação dos compostos foi realizada pela determinação da área dos picos obtidos pela injeção das amostras em um cromatógrafo a gás equipado com um detector de ionização de chama (GC-FID) (CG-2014, Shimzadu, Japão), utilizando uma coluna capilar de sílica (30 mx 0,25 mm x 0,25 µm) e nitrogênio como gás de arraste (vazão de 1 mL/min.). Os mesmos parâmetros cromatográficos descritos para GC-MS foram utilizados no GC-FID. O volume da amostra injetada foi de 1 µL e o modo de injeção foi *split* (1:50). Óleo essencial de pimenta rosa puro (OEP) e o óleo extraído das duas formulações de microcápsulas (SMO e SPMO) foram injetados nos equipamentos, a fim de avaliar também a retenção de voláteis nas microcápsulas após o processo de microencapsulação por *spray drying*. A extração do óleo das microcápsulas foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Jafari et al. (2007), por hidrodestilação em aparato Clevenger.

A Área do Pico (%) relativa a cada composto foi determinada pela normalização das áreas cromatográficas dos picos (Equação 1), onde A_c é a área relativa ao composto, A_T é a área total dos picos e $V_{óleo}$ é o volume de óleo extraído de microcápsulas usado como fator de correção.

$$\text{Área do pico (\%)} = \left(\frac{A_c}{A_T}\right) V_{óleo} 100 \qquad (1)$$

A identificação do pico foi realizada por comparação do índice de retenção linear usando o NIST Chemistry WebBook e as bibliotecas do espectrofotômetro de massas (NIST MS Search versão 2.0 e banco de dados Wiley). Uma solução de alcanos (C_7-C_{30}) (Sigma-Aldrich®), diluída em hexano (1:2), também foi injetada no GC-FID nas mesmas condições descritas anteriormente para o cálculo do índice de retenção.

4.2.2.2 Índice de refração

O índice de refração do óleo essencial de pimenta rosa foi determinado seguindo a metodologia da Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists (AOAC, 1990). Foi utilizado refratômetro de Abbe e as medidas foram realizadas em triplicata a 25 ºC.

4.2.2.3 Densidade e tensão superficial

A densidade do óleo foi determinada em triplicata, utilizando-se tensiômetro (Biolin Scientific, Attension Sigma 700/701), à temperatura ambiente. Foram utilizados probes de densidade e de placa de Wilhelmy.

4.2.2.4 Viscosidade

Um reômetro, modelo AR-G2 (TA Instruments, New Castle, EUA), foi usado para executar fluxos de estado estacionário com geometria de cilindros concêntricos (gap = 5290 μm). A taxa de cisalhamento variou de 0,01 s^{-1} a 20 s^{-1}, e a tensão de cisalhamento média foi obtida por meio do sistema de aquisição de dados. Os reogramas resultantes foram ajustados para o modelo de Newton para obtenção da viscosidade.

4.2.2.5 Temperatura de vaporização

A temperatura de vaporização do óleo essencial foi determinada utilizando-se equipamento de calorimetria exploratória diferencial DSC 8000 (Pyris Series, Perkin Elmer) com aquecimento de 50 a 200 ºC a uma taxa de 10 ºC/min. Aproximadamente 10 μL de amostra foram adicionados em recipientes de alumínio selados hermeticamente. O equipamento foi previamente calibrado com uma amostra de índio (massa = 5,08 mg) e um recipiente de alumínio vazio foi utilizado como referência. A faixa de temperatura de vaporização foi determinada usando o Software de Gerenciamento de Instrumentos Pyris (Pyris Series, Perkin Elmer).

4.2.3 Caracterização das microcápsulas

4.2.3.1 Rendimento de secagem

O rendimento de secagem foi determinado em triplicata pela razão entre a massa de pó obtida na saída do secador e o teor de sólidos da emulsão utilizada na alimentação do secador.

4.2.3.2 Retenção de óleo

A retenção de óleo nas microcápsulas foi determinada por hidrodestilação utilizando-se o aparato Clevenger (JAFARI et al., 2007), conforme descrito anteriormente. O volume de óleo extraído após a destilação foi convertido em massa usando a densidade do óleo (0,845 ± 0,010 g / mL, a 25 °C). A retenção de óleo foi determinada pela Equação 2, na qual o teor teórico de óleo foi tomado como a massa de óleo esperada nas partículas, com base na formulação de emulsão (Tabela 2) em base seca.

$$Retenção\ de\ óleo\ (\%) = \frac{[conteúdo\ de\ óleo\ extraído]}{[conteúdo\ teórico\ de\ óleo]}\ 100 \qquad (2)$$

4.2.3.3 Umidade e atividade de água das microcápsulas

A umidade dos pós foi determinada pelo método gravimétrico (AOAC, 1990). Pesaram-se cerca de 1,5 gramas de cada amostra em triplicata e realizou-se a secagem a 70 °C em estufa à vácuo durante 48 horas. A umidade (%) foi calculada pela perda de peso das amostras. A atividade da água foi determinada por um higrômetro elétrico (modelo Aw Sprint, marca NOVASINA, Axair Ltd., Suíça). As medidas foram realizadas a 25ºC.

4.2.3.4 Higroscopicidade

A higroscopicidade dos pós foi determinada de acordo com a metodologia proposta por Cai e Corke (2000). Amostras dos pós (aproximadamente 1 grama) foram armazenadas em dessecador contendo solução saturada de NaCl (75,3% de umidade relativa) a 25 °C. As amostras foram armazenadas por uma semana e o valor de higroscopicidade foi determinado pela relação da massa de água absorvida pela massa de pó seco.

4.2.3.5 Tempo de dissolução

Para o ensaio de tempo de dissolução dos pós, 1 grama da amostra de pó foi dispersa em 50 mL de água destilada ou em 50 mL de óleo de soja a 25 °C sob agitação em agitador magnético a 892 rpm usando uma barra magnética de 2 mm x 7 mm. O tempo até a homogeneização total foi registrado (EL-TINAY; ISMAIL, 1985).

4.2.3.6 Tempo de molhamento

O tempo de molhamento foi determinado dispersando-se 1 grama das amostras de pó em 400 mL de água destilada a 25 °C sem agitação. O tempo necessário para a submersão de todas as partículas foi registrado (HLA; HOGEKAMP, 1999). Os resultados foram expressos como média de três repetições.

4.2.3.7 Solubilidade

A solubilidade dos pós foi determinada seguindo a metodologia descrita por Cano-Chauca et al. (2005), com adaptações de Fernandes et al. (2014). Primeiramente, 1 grama de pó foi disperso em 25 mL de água destilada sob agitação por 5 minutos. A solução foi centrifugada a 3000 x g por 10 minutos. Uma alíquota de 20 mL do sobrenadante foi colocada sobre uma placa de petri previamente tarada e levada para secagem em estufa a 105ºC por 5 horas. A solubilidade (%) foi calculada por diferença de peso.

4.2.3.8 Ângulo de contato

A determinação do ângulo de contato das amostras de pó foi realizada em tensiômetro (Biolin Scientific, Attension Sigma 700/701) utilizando o método de ascensão capilar de Washburn, onde a ascensão do líquido através do leito de pó dentro do capilar é descrita pela Equação 3 (LAZGHAB et al., 2005)

$$\frac{\mathrm{m}^2}{\mathrm{t}} = \mathrm{C}\rho^2\gamma(\eta^{-1})\cos\Theta \qquad (3)$$

onde m é a massa de líquido, t é o tempo, C é a constante de capilaridade, ρ é a densidade do líquido, γ é a tensão superficial do líquido, η é a viscosidade do líquido e Θ é o ângulo de contato entre o líquido e o material poroso. Os valores utilizados de densidade, viscosidade e tensão superficial dos líquidos foram fornecidos pela biblioteca de dados do *software* OneAttension. A constante C foi determinada conduzindo-se ensaio com hexano a 25ºC. O valor C foi obtido pela inclinação da reta de m^2 por t. O valor obtido para C foi utilizado nos ensaios para determinação do ângulo de contato das amostras de pó em água deionizada a 25ºC. O experimento foi conduzido em triplicata.

4.2.3.9 Densidade aparente e densidade compactada

Para determinar a densidade aparente dos pós, aproximadamente 2 gramas das amostras foram adicionadas a um cilindro graduado de 10 mL e suavemente acomodadas. A densidade aparente foi calculada pela razão entre a massa de pó e o volume ocupado no cilindro. Para densidade compactada, cerca de 5 gramas dos pós foram adicionados em cilindros de vidro graduados de 25 mL. As amostras foram compactadas manualmente, levantando e soltando o cilindro verticalmente sobre uma superfície plana até que não houvesse alterações no nível ocupado pelo pó. A densidade compactada foi determinada pela razão entre a massa da amostra compactada pelo volume ocupado pelo pó no cilindro.

4.2.3.10 Densidade real e porosidade aparente

A densidade real das partículas foi determinada em temperatura ambiente em triplicata, utilizando-se um picnômetro a gás (Micromeritics AccuPyc II 1340 Pycnometer, Norcross, EUA) a 25ºC. A porosidade aparente dos pós foi determinada a partir da equação 4 (KROKIDA; MAROULIS, 1997):

$$\varepsilon = \left(1 - \frac{\rho_{\text{compactada}}}{\rho_{\text{real}}}\right) 100 \quad (4)$$

4.2.3.11 Fluidez e coesividade dos pós

A partir dos valores de densidade aparente e densidade compactada, calculou-se a capacidade de fluidez e a coesividade das amostras de pó através do Índice de Carr (IC) e do Índice de Hausner (IH), respectivamente, de acordo com as equações 5 e 6.

$$IC = \frac{(\rho_{\text{compactada}} - \rho_{\text{aparente}})}{\rho_{\text{compactada}}} 100 \quad (5)$$

$$IH = \frac{\rho_{\text{compactada}}}{\rho_{\text{aparente}}} \quad (6)$$

4.2.3.12 Ângulo de repouso

Para determinação do ângulo de repouso, 5 gramas dos pós foram pesados e adicionados a um funil, obstruindo o canal de saída. O funil foi posicionado a 10 cm de uma superfície plana e o teste foi iniciado liberando a saída do funil para que o pó fluísse livremente sobre a superfície plana, formando um cone. Medidas foram tomadas da altura (h) e do raio (r) do cone de pó formado na superfície plana. O ângulo de repouso (Ɵ) foi determinado a partir da Equação 7.

$$tan\,\Theta = \frac{h}{r} \tag{7}$$

4.2.3.13 Distribuição do tamanho de partícula

A distribuição do tamanho de partícula foi medida usando o sistema de difração de laser (Mastersizer 2000, Malvern Instruments, UK). As amostras foram colocadas na unidade de dispersão Scirocco usando ar comprimido como meio de dispersão (índice de refração do ar = 1,00; pressão do ar = 2bar). O diâmetro Sauter ou diâmetro médio (D [3,2]) e a dispersão dos dados da curva de distribuição (Span) foram calculados em triplicata de acordo com as Equações 8 e 9, respectivamente.

$$D[3,2] = \frac{\Sigma\, n_i\, d_i^{\,3}}{\Sigma\, n_i\, d_i^{\,2}} \tag{8}$$

$$\text{Span} = \frac{D_{90} - D_{10}}{D_{50}} \tag{9}$$

onde n é o número de partículas, d é o diâmetro das partículas e D_{10}, D_{50} e D_{90} são, respectivamente, diâmetros a 10%, 50% e 90% do volume acumulado (JAFARI; HE; BHANDARI, 2007). A área superficial (m^2/kg) foi calculada pelo equipamento.

4.2.3.14 Morfologia de partículas

A morfologia das microcápsulas foi analisada usando microscópio eletrônico de varredura (MEV) (FEI Magellan 400 L e Philips XL-30 FEG) com magnitude de 500x, 5.000x e 10.000x. Pequenas amostras de pós foram fixadas em fita adesiva dupla face sobre os *stubs* de MEV e revestidas com ouro sob vácuo.

4.2.4 Estabilidade no armazenamento das microcápsulas

4.2.4.1 Isotermas de sorção de água

Amostras de microcápsulas de óleo essencial de pimenta rosa (0,5 gramas) foram condicionadas em pequenos potes contendo soluções salinas saturadas. Foram utilizados sete sais (LiCl, $MgCl_2$, K_2CO_3, $Mg(NO_3)_2$, NaCl, $(NH_4)SO_4$, $BaCl_2$), com a faixa de atividade de água (A_w) variando de 0,11 a 0,90. Os recipientes com as amostras foram armazenados em câmaras com temperatura controlada do tipo BOD (MA415, Marconi, Piracicaba, Brasil) a 25 ºC. As amostras de pó foram previamente pesadas e suas umidades iniciais determinadas por secagem a 70 ºC em estufa a vácuo (Marconi modelo MA 030). O ganho de água das amostras foi determinado ao longo das semanas através de pesagem regular até peso constante. Através da diferença da umidade inicial foi determinada a umidade de equilíbrio (X_{eq}) das microcápsulas de óleo essencial de pimenta rosa. O experimento foi conduzido em triplicata para cada tratamento.

As médias das umidades de equilíbrio para cada tratamento foram plotadas considerando as sete atividades de água utilizadas. O modelo de GAB foi ajustado para os dados (Equação 10)

$$X_{eq} = \frac{X_m C k A_w}{(1 - kA_w)(1 + (C - 1)kA_w)} \quad (10)$$

onde X_m, C e k são constantes dos modelos matemáticos.

A acurácia do ajuste para o modelo foi avaliada com base no coeficiente de determinação R^2 e na raiz quadrada do erro-médio (RQEM).

4.2.4.2 Liberação dos voláteis

Amostras de 10 gramas de microcápsulas foram armazenadas em frascos abertos colocados no interior de dessecador contendo solução saturada de $Mg(NO_3)_2$ (UR = 52,8%). Um frasco aberto contendo óleo essencial puro (OEP) também foi armazenado como controle. O sistema de armazenamento foi mantido em câmara BOD (411D, New Ethics, EtickTechnology, Vargem Grande Paulista, SP, Brasil) a 25 ºC por 20 dias. Os frascos foram removidos da BOD nos tempos: 0, 2, 4, 6, 10 e 20 dias de armazenamento. O óleo foi extraído das microcápsulas e, em seguida, foram realizadas análises por GC-MS e CG-FID de acordo com os procedimentos descritos no item 4.2.2.1. O volume de óleo extraído das cápsulas foi retirado do braço do aparato Clevenger e pesado.

A estabilidade de seis terpenos foi monitorada nos cromatogramas: α-pineno, β-pineno, β-mirceno, δ-3-careno, D-limoneno e germacreno D. Esses compostos foram escolhidos para análise de liberação devido aos seus picos mais altos e por estarem associados com as propriedades antimicrobianas e antioxidantes atribuídas a esse óleo (DANNENBERG et al., 2019; CAVALCANTI et al., 2015).

A liberação (%) de cada composto durante o período de armazenamento foi determinada pela Equação 11, através da redução na área do pico (%) (determinada de acordo com a Equação 1) observada no dia de armazenamento em questão (t) em relação à área do pico no início do armazenamento (t = 0).

$$Liberação\ (\%) = \left(1 - \frac{Área\ do\ pico\ (\%)_{\ t}}{Área\ do\ pico\ (\%)_{\ t\,=\,0}}\right) 100 \qquad (11)$$

Para esta análise, as extrações de óleo das microcápsulas foram realizadas em duplicata. O óleo obtido de cada extração foi injetado duas vezes na análise em CG, resultando em n = 4.

4.2.4.3 Atividade antioxidante

Os óleos extraídos das duas formulações de microcápsulas e o óleo puro armazenado como controle (utilizados na análise de liberação dos voláteis) foram avaliados quanto a sua atividade antioxidante, nos tempos t = 0 dias e t = 20 dias, utilizando-se a técnica ABTS.

Inicialmente, uma solução estoque de ABTS (7 mM) foi misturada com 2,45 mM de um solução de persulfato de potássio e mantida em repouso por 16 horas em ambiente escuro a 25 ºC. Após o tempo de repouso, 1 mL da solução preparada foi diluído em álcool etílico até que a leitura de sua absorbância em espectofotômetro a 734 nm fosse de 0,7 ± 0,1. Em seguida, 3 mL da solução diluída foi homogeneizado com 10 μL de óleo. Após 6 min de repouso em ambiente escuro, foi feita a leitura da absorbância da amostra. A concentração de amostra com a mesma percentagem de inibição da absorbância do Trolox a 1 mM foi calculado em termos de capacidade antioxidante equivalente ao Trolox (TEAC). A curva de Trolox foi construída utilizando-se cinco diluições do reagente em álcool etílico (100, 500, 1000, 1500, 2000 μM de concentração final de Trolox) e a atividade antioxidante das amostras foi expressa em μg de Trolox/mg de amostra.

4.2.5 Atividade antimicrobiana das microcápsulas

4.2.5.1 Atividade antimicrobiana *in vitro*

A avaliação *in vitro* dos efeitos inibidores das microcápsulas de óleo essencial de pimenta rosa nas bactérias testadas foi realizada usando o método de difusão em ágar – técnica do poço, de acordo com o CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute/Anvisa), com algumas adaptações.

Seis bactérias foram avaliadas, sendo quatro gram-positivas (*Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Listeria monocytogenes* ATCC 15313 e *Listeria innocua*) ATCC 33090 e duas gram-negativas (*Escherichia coli* ATCC 8739 e *Salmonella typhimurium* ATCC 14028). Foram realizadas suspensões de bactérias na concentração de aproximadamente 10^6 UFC/mL de cada microrganismo. O meio de cultura base estéril utilizado nas placas de petri para as cepas microbianas foi caldo cérebro coração (BHI) em ágar-ágar, e as culturas em suspensão foram cultivadas a 37°C em caldo BHI. As suspensões de cultura foram ajustadas para aproximadamente 10^8 UFC/mL em solução salina a 0,85% com leitura em espectrofotômetro a 600 nm. As amostras das duas formulações de microcápsulas, SMO e SPMO, foram testadas na dosagem de 50 mg por poço da placa e em diferentes tempos de armazenamento. Cavidades de 7 mm de diâmetros foram realizadas nas placas inoculadas e o seu conteúdo foi preenchido com as amostras de microcápsulas. As placas foram incubadas a 37 °C por 24 h. Após a incubação, os diâmetros das zonas de inibição foram medidos em

milímetros. Os ensaios foram realizados em triplicata, sendo os resultados expressos em média padrão de três medidas obtidas para cada halo de inibição.

4.2.5.2 Efeito inibidor do crescimento bacteriano em leite

O efeito inibitório das microcápsulas de óleo essencial no leite foi avaliado de acordo com metodologia descrita por Lopes et al. (2019), com modificações. Primeiramente, as culturas foram diluídas em solução salina (8,5 g/L NaCl) para aproximadamente 6 log UFC/mL. Em seguida, 100 μL de cada suspensão bacteriana foi adicionado a 10 mL de leite UHT integral ou desnatado como alimento modelo. Uma alíquota de 1 grama de microcápsulas (SMO ou SPMO) e 0,1 mL de óleo essencial puro (volume equivalente a quantidade de óleo contida nas microcápsulas) foram adicionados a diferentes tubos. O volume foi ajustado para 1,0 mL com tampão fosfato. O controle foi inoculado apenas com cepas bacterianas. Tubos contendo *L. monocytogenes* ou *Staphylococcus aureus* foram incubados por 0, 3, 5, 10, 25 e 30 horas a 37 °C. As placas de ágar BHI foram incubadas a 37 °C e as colônias foram enumeradas após 24 h.

4.2.6 Análise Estatística

O teste *t* para diferença entre duas médias, considerando amostras independentes, foi realizado para comparar a formulação de microcápsulas SMO e SPMO em um nível de significância de 5%. Nas análises comparando o óleo essencial puro com os óleos extraídos das duas formulações de cápsulas, o teste de Tukey foi conduzido a um nível de significância de 5% por análise de variância (ANOVA). Utilizou-se o *software* OriginPro 8.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização do óleo essencial de pimenta rosa

A Tabela 3 apresenta a caracterização do óleo essencial de pimenta rosa. Foram realizadas análises de identificação dos compostos voláteis presentes no óleo essencial puro (OEP) e dos óleos extraídos das duas formulações de microcápsulas: camada única (SMO) e camada dupla (SPMO). Também foram avaliadas propriedades físico-químicas como índice de refração, densidade, viscosidade, tensão superficial e temperatura de vaporização dos voláteis do óleo.

Quinze compostos majoritários foram identificados no óleo essencial. A fração de monoterpenos foi de 80,9% para o óleo puro, enquanto os sesquiterpenos identificados corresponderam a 13,9%. Essas porcentagens estão próximas dos valores apresentados na literatura para frações de mono e sesquiterpenos em óleos essenciais (EL ASBAHANI et al., 2015). Em relação aos óleos extraídos das microcápsulas, nota-se que o óleo das partículas de dupla camada preservou melhor as proporções dos compostos presentes no óleo puro (94,3%), enquanto o óleo extraído das partículas de camada única apresentou uma redução na proporção dos compostos identificados (85,8%), principalmente na fração de monoterpenos. Como os monoterpenos têm menor peso molecular e pontos de ebulição mais baixos, é razoável supor que eles sejam os primeiros compostos a evaporar na presença de altas temperaturas. Este resultado mostra maior proteção dos compostos de óleo essencial pela dupla camada de SPI/ pectina. Em um estudo desenvolvido por Gharsallaoui et al. (2012), avaliaram-se as interações entre pectina e isolado proteico de ervilha na estabilização de microcápsulas de dupla camada de compostos voláteis odoríferos. Foi observado pelos autores que a pectina foi capaz de inibir a perda estrutural da folha-β da proteína durante o aquecimento, apresentando um efeito protetor que, combinado com o aumento da viscosidade da emulsão e consequente formação de uma camada semipermeável nas gotas durante a atomização, pode explicar a maior retenção de compostos voláteis na matriz encapsulante formada pela combinação desses biopolímeros.

Entre os compostos químicos identificados, cinco monoterpenos - α-pineno (35,9%), β-pineno (8,5%), β-mirceno (15,6%), δ-3-careno (13,1%), D-limoneno (4,4 %) - e um sesquiterpeno, germacreno D (11,4%), correspondem às maiores proporções no óleo essencial (Figura 4a). Esses terpenos também foram identificados por Dannenberg et al. (2019) para o óleo essencial de pimenta rosa, onde o β-mirceno e o D-limoneno representaram 41% e 9% do óleo essencial. Os autores destacaram a importância desses terpenos na ação bioativa deste óleo,

Tabela 3 - Composição dos voláteis e propriedades físico-químicas do óleo essencial de pimenta rosa.

Pico	Composto	Rt (min)	RI	RI NIST	Área do pico (%)		
					OEP	SMO	SPMO
Monoterpenos							
1	α-pineno	12,31	932	932	35,9 ± 0,2^{a}	32,8 ± 0,7^{b}	37,4 ± 1,0^{a}
2	sabineno	15,03	970	971	1,2 ± 0,1^{a}	0,8 ± 0,0^{b}	0,8 ± 0,1^{b}
3	β-pineno	15,29	974	979	8,5 ± 0,1^{ab}	8,3 ± 0,1^{b}	8,8 ± 0,1^{a}
4	β-mirceno	16,64	993	993	15,6 ± 0,3^{a}	14,0 ± 0,1^{b}	15,5 ± 0,3^{a}
5	α-felandreno	17,56	1004	1005	1,9 ± 0,0^{a}	1,5 ± 0,1^{b}	1,7 ± 0,1^{ab}
6	δ-3-careno	18,17	1011	1011	13,1 ± 0,2^{b}	12,9 ± 0,1^{b}	14,2 ± 0,1^{a}
7	p-cimeno	19,38	1023	1024	0,4 ± 0,0^{a}	0,5 ± 0,2^{a}	0,5 ± 0,0^{a}
8	D-limoneno	19,80	1027	1029	4,4 ± 0,3^{a}	4,3 ± 0,0^{a}	4,6 ± 0,0^{a}
Sesquiterpenos							
9	δ-elemeno	42,16	1340	1338	0,3 ± 0,0^{a}	0,3 ± 0,0^{a}	0,3 ± 0,0^{a}
10	Cariofileno	46,14	1424	1418	0,8 ± 0,1^{a}	0,7 ± 0,0^{a}	0,7 ± 0,0^{a}
11	Germacreno D	49,00	1487	1484	11,4 ± 0,1^{a}	7,7 ± 0,1^{b}	8,1 ± 0,7^{b}
12	α-muuroleno	49,60	1503	1500	0,4 ± 0,0^{a}	0,3 ± 0,0^{a}	0,3 ± 0,1^{a}
13	δ-cadineno	50,70	1530	1524	0,4 ± 0,0^{a}	0,4 ± 0,0^{a}	0,4 ± 0,0^{a}
14	Elemol	51,77	1554	1548	0,5 ± 0,0^{a}	0,5 ± 0,1^{a}	0,4 ± 0,2^{a}
15	Germacreno B	52,15	1566	1568	1,0 ± 0,2^{a}	0,8 ± 0,1^{a}	0,6 ± 0,1^{a}
Total monoterpenos					**80,9 ± 1,0^{a}**	**75,1 ± 0,8^{b}**	**83,5 ± 1,8^{a}**
Total sesquiterpenos					**13,9 ± 0,3^{a}**	**10,7 ± 0,1^{a}**	**10,8 ± 1,5^{a}**
Total identificado					**94,8 ± 1,3^{a}**	**85,8 ± 0,7^{b}**	**94,3 ± 0,2^{a}**
Propriedades físico-químicas							
Índice de refração a 25ºC					1,47 ± 0,00		
Densidade (25ºC) (kg/m^3)					845,10 ± 0,01		
Viscosidade (mPa.s)					1,46 ± 0,07		
Tensão superficial (mN/m)					25,7 ± 0,01		
Faixa de temperatura de vaporização (ºC)					148,9 ± 3,0 – 197,4 ± 0,4		

OEP: óleo essencial puro; SMO: óleo extraído das microcápsulas de camada única; SPMO: óleo extraído das microcápsulas de camada dupla; Rt: tempo de retenção; RI: índice de retenção calculado; RI NIST: índice de retenção teórico

uma vez que possuem atividade antimicrobiana eficaz. Cavalcanti et al. (2015) encontraram valores de 44,9%, 15,1% e 17,6% para α-pineno, β-pineno e germacreno D, respectivamente, valores próximos aos determinados neste trabalho.

Uma vez que nenhuma formação de novo composto foi identificada no óleo extraído das microcápsulas, pode-se supor que as mudanças nas proporções de alguns compostos se devem a perdas de evaporação durante o processo de microencapsulação por *spray drying*. No entanto, poucas perdas significativas foram observadas nos valores, que apresentaram pouca variação, principalmente nos compostos presentes em maiores quantidades, exceto o germacreno D, que apresentou uma redução de 11,4% (OEP) para 7,7% (SMO) e 8,1% . (SPMO), o que sugere que esse composto é mais vulnerável a perdas por evaporação. Em geral, pode-se assumir que o processo de microencapsulação foi eficaz, pois manteve as proporções dos compostos originais do óleo essencial puro.

Os valores encontrados para o índice de refração e densidade do óleo essencial de pimenta rosa foram de 1,473 e 845,10 Kg/m^3, respectivamente. O Índice de Refração é a razão entre a velocidade da luz no ar e em uma substância. Em substâncias oleosas, esse valor é influenciado pelos componentes, de modo que quanto maiores as cadeias e números de insaturações, maior a densidade dos óleos e, consequentemente, maior a dificuldade de a luz refratar no meio. Resultados semelhantes ao deste trabalho foram encontrados por outros autores, salientando essa relação entre a densidade do óleo e o índice de refração. Ballesteros et al. (2019) encontraram valores de índice de refração de 1,49 e densidade de 928 Kg/m^3 para o óleo essencial extraído de folhas de *Piper carpunya*. Al-Zoreky e Al-Taher (2019) reportaram valores de 1,59 e 987 Kg/m^3 para óleo essencial extraído da espata de tamareiras.

Em relação à reologia, o óleo essencial de pimenta rosa apresentou comportamento newtoniano ($R^2 > 0,999$), conforme elucidado na literatura para óleos vegetais (STEFFE, 1996). A baixa viscosidade encontrada (1,46 mPa.s) pode ser atribuída à alta fração volátil desse óleo, pois quanto maior a fração volátil de um óleo, menor sua viscosidade. Um aumento na viscosidade dos óleos essenciais ocorre quando há um aumento em sua fração de resíduos (SILVA et al., 2017; AMARAL et al., 2005). Para este óleo, a fração de resíduos é baixa, como evidenciado pela alta fração volátil identificada pela análise em CG (94,8%). Do ponto de vista tecnológico, na produção de emulsões que serão bombeadas para serem secas em *spray dryer*, é desejável um óleo com baixa viscosidade (próxima à viscosidade da água, fase contínua), pois não alterará a viscosidade da emulsão significativamente, de modo a comprometer o bombeamento no *spray dryer*.

A tensão superficial é caracterizada como o trabalho necessário para aumentar a área superficial em uma unidade. Assim, a resistência de um material ao aumento da área superficial é denominada tensão superficial, e o conhecimento desse parâmetro é importante em processos que envolvem atomização, pois quanto maior a tensão superficial, mais difícil será a desintegração do líquido em gotículas (LAVERNIA, WU, 1996). Segundo Walstra (2003), a tensão superficial em compostos orgânicos é mais fraca porque a energia atrativa dessas moléculas é predominantemente composta por forças de Van der Waals, enquanto a tensão superficial da água (aproximadamente 72 mN/m) é alta devido à existência de extensas pontes de hidrogênio entre suas moléculas. O autor ressalta que as misturas de triacilglicerol apresentam tensão superficial em torno de 40 mN/m. Em um estudo realizado com vários óleos vegetais, Melo-Espinhosa et al. (2014) encontraram tensões superficiais variando de 31 a 39 mN/m. Para os óleos essenciais, no entanto, a tensão superficial encontrada é ligeiramente inferior aos valores descritos por esses autores. Neste trabalho, o óleo essencial de pimenta rosa apresentou tensão superficial igual a 25,7 mN/m, valor próximo ao determinado por Tak e Isman (2015) para o óleo essencial de alecrim (29,8 mN/m). Isso pode ser explicado pelo maior número de moléculas voláteis nesses óleos, resultando em menor força intermolecular.

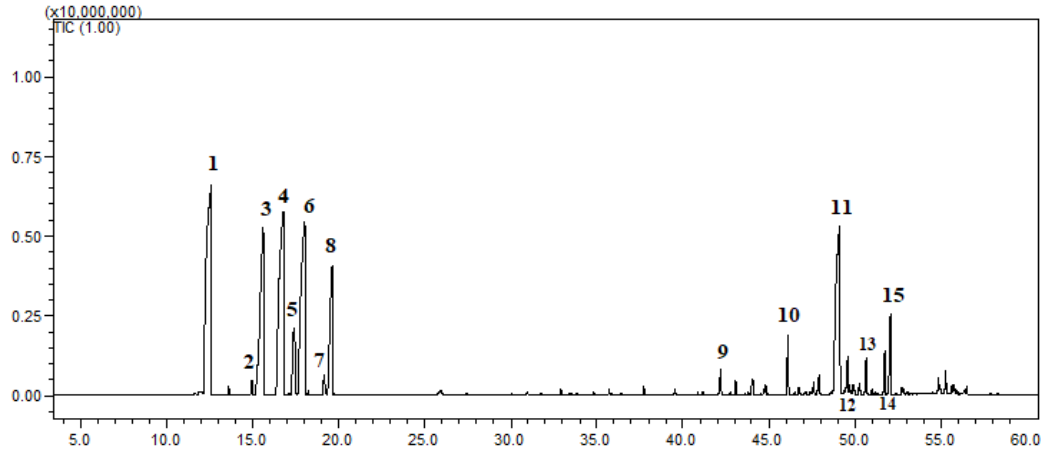
A vaporização do óleo essencial de pimenta rosa foi observada na faixa entre 148,9 ± 3,0 ºC e 197,4 ± 0,4 ºC. Como os óleos essenciais são formados por uma mistura de compostos químicos, a vaporização não é representada por um ponto específico, mas sim por uma faixa de temperatura. Dado que os processos térmicos são recorrentes na indústria de alimentos, o conhecimento da faixa de temperatura de vaporização dos óleos essenciais é importante para prever o comportamento de seus compostos voláteis quando adicionados a produtos que sofrem aquecimento. Um termograma típico do comportamento apresentado pelo óleo essencial de pimenta rosa é mostrado na Figura 4b.

No termograma apresentado, a faixa de temperatura de vaporização obtida é de 152,4 ºC a 197,5 ºC. Observa-se ainda a existência de duas regiões bem distintas dentro dessa faixa de temperatura. A primeira região indo de 152,4ºC a 169,4ºC e a segunda região de 195,7ºC a 197,8°C. Dois picos podem ser observados na primeira região, um maior a 153,7ºC e outro a 154,8ºC. A segunda região apresentou um pico menor quando comparado com os demais, a 196,5ºC.

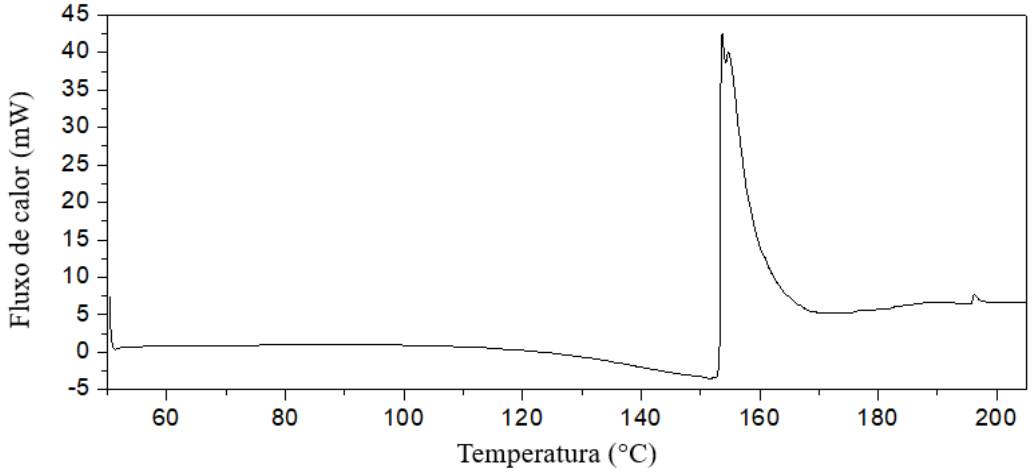
Os óleos essenciais têm cerca de 80% de monoterpenos em sua composição, sendo o restante dos compostos os sesquiterpenos, que variam de 15% a 20% da composição desses óleos. Tendo em vista que os monoterpenos apresentam pontos de ebulição menores (de 136,23 a 170,25 ºC) quando comparados com os sesquiterpenos (valores próximos a 200ºC) (EL

ASBAHANI et al., 2015), é possível que os dois primeiros picos identificados no termograma representem a vaporização dos monoterpenos, enquanto que o pico menor seja referente a fração de sesquiterpenos presentes no óleo essencial de pimenta rosa.

Figura 4 - Picos de α-pineno (1), sabineno (2), β-pineno (3), β-mirceno (4), α-felandreno (5) δ-3-careno (6), p-cimeno (7), D-limoneno (8), δ-elemeno (9), cariofileno (10), germacreno D (11), α-muuroleno (12), δ-cadineno (13), elemol (14) e germacreno B (15) no cromatograma de óleo essencial de pimenta rosa (a); Termograma típico obtido em DSC da vaporização dos voláteis do óleo essencial (b).



(a)



(b)

Fonte: AUTOR, 2020

A evaporação de terpenos também foi investigada por outros pesquisadores para os óleos essenciais de laranja, capim-limão, manjericão e alecrim (MARTINS et al., 2011; GARCIA-SOLETO et al., 2019) com resultados semelhantes aos encontrados neste trabalho. O uso de uma temperatura do ar de secagem abaixo da região de volatilização (140 ºC) determinada na análise em DSC pode ter contribuído para uma melhor preservação da proporção dos componentes do óleo essencial após a microencapsulação por processo *spray drying*, como mostra a Tabela 3.

5.2 Propriedades físico-químicas das microcápsulas

Várias propriedades físico-químicas – que são relevantes para prever vida de prateleira, requisitos de embalagens e funcionalidade das microcápsulas de óleo essencial de pimenta rosa – foram afetadas pela formulação das emulsões utilizadas no *spray dryer* (Tabela 4).

O rendimento de secagem foi semelhante, situando-se em torno de 45% para ambas formulações, isto é, as emulsões de camada única (SMO) e de dupla camada (SPMO). Apesar deste valor ser pequeno, é consistente com rendimentos em torno de 50% normalmente observados para *spray dryer* de pequena escala, principalmente para a secagem de emulsões O/W. Isso ocorre devido o pequeno diâmetro da câmara de secagem que leva a maiores perdas de material aderido à parede. Rendimentos de secagem da mesma magnitude (de 38,7% a 50,4%) foram obtidos para secagem de emulsões de óleo de chia utilizando isolado de proteína de soja e maltodextrina (GONZÁLEZ et al., 2016) e para secagem de emulsões de óleo essencial de alecrim com maltodextrina e amido modificado (39,5%) (TEODORO et al., 2014). A temperatura de secagem relativamente baixa adotada no presente trabalho (140 ºC) também pode ter contribuído para menores rendimentos de secagem (TONON et al., 2008), embora a utilização de uma menor temperatura de secagem seja justificada para impedir maior perda de compostos voláteis e melhor preservar as propriedades bioativas do óleo essencial. É importante ressaltar que, apesar da pectina ser um polissacarídeo que aumenta a viscosidade da emulsão, e que a alimentação de materiais altamente viscosos tende a diminuir o rendimento da secagem por aspersão (RAMAKRISHNAN et al., 2018) não houve diferença significativa entre os rendimentos de secagem da emulsão de camada unica e da emulsão de camada dupla ($p < 0,05$). Este fato indica que a baixa concentração de pectina usada não afetou o rendimento do processo.

A retenção de óleo de pimenta rosa nas microcápsulas SMO e SPMO foi superior a 40% (Tabela 4), aproximando-se dos valores encontrados por outros pesquisadores na microencapsulação de óleos essenciais por secagem em *spray dryer* (FERNANDES et al., 2014; TEODORO et al., 2014). Os complexos coloidais formados entre as proteínas de soja e a pectina na emulsão de camada dupla mostrou capacidade de melhorar a microencapsulação do óleo quando comparada à emulsão de camada única, uma vez que a retenção de óleo na formulação SPMO foi maior do que nas microcápsulas SMO ($p < 0,05$). Este resultado mostra que a presença de pectina é importante para auxiliar as proteínas na emulsificação e estabilização do óleo durante a secagem por *spray drying*, evitando perdas de óleo durante a microencapsulação. Resultados semelhantes foram observados por Moser et al. (2018) estudando a encapsulação de

carotenóides usando complexos proteína de grão-de-bico/pectina, e por Serfert et al. (2013), utilizando misturas de β-lactoglobulina/pectina na secagem por *spray drying* de óleo de peixe.

Tabela 4 - Propriedades físico-químicas das microcápsulas de óleo essencial de pimenta rosa sem pectina (SMO) e com pectina (SPMO)

Propriedades físico-químicas	**SMO**	**SPMO**
Rendimento de secagem (%)	45,81 ± 2,49[a]	45,75 ± 2,11[a]
Retenção de óleo (%)	42,1 ± 0,2[b]	49,4 ± 0,1[a]
Umidade (%)	3,16 ± 0,12[a]	3,41 ± 0,07[a]
Atividade de Água	0,176 ± 0,012[a]	0,280 ± 0,006[b]
Higroscopicidade (%)	9,3 ± 0,4[b]	8,5 ± 0,3[a]
Tempo de Molhamento (s)	342 ± 16[a]	460 ± 9[b]
Tempo de dissolução em água (s)	329 ± 27[a]	351 ± 12[a]
Tempo de dissolução em óleo de soja (s)	240 ± 9[b]	219 ± 6[a]
Solubilidade (%)	70,60 ± 0,12[b]	68,03 ± 0,19[a]
Ângulo de contato (°)	84,4 ± 0,3[a]	89,3 ± 0,4[b]
Densidade aparente ($g.mL^{-1}$)	0,303 ± 0.015[a]	0,283 ± 0,008[a]
Densidade compactada ($g.mL^{-1}$)	0,445 ± 0,013[b]	0,375 ± 0,011[a]
Densidade real ($g.mL^{-1}$)	1,009 ± 0,006[b]	0,951 ± 0,002[a]
Porosidade aparente (%)	55,9 ± 1,3[a]	60,6 ± 1,1[b]
Hausner ratio	1,47 ± 0,07[b]	1,33 ± 0,03[a]
Carr Index (%)	31,9 ± 3,3[b]	24,5 ± 1,5[a]
Ângulo de repouso (º)	37,4 ± 1,3[b]	22,6 ± 0,3[a]
D[3,2] (µm)	4,19 ± 0,30[a]	5,92 ± 0,21[b]
Área superficial específica (m^2/kg)	1,44 ± 0,10[b]	1,01 ± 0,04[a]
D_{10} (µm)	2,14	3,86
D_{50} (µm)	10,09	14,85
D_{90} (µm)	153,64	45,38
Span	2,418 – 43,202	2,323 – 4,127

Dados expressos em Média ± Desvio Padrão. Letras diferentes na mesma linha têm diferença significativa ($p < 0.05$).

5.2.1 Propriedades de vida de prateleira: umidade, atividade de água e higroscopicidade das microcápsulas.

O processo de secagem em *spray dryer* foi efetivo para a produção de pós de óleo essencial de pimenta rosa de baixa umidade, pois, como mostra a Tabela 4, as micropartículas de SMO e SPMO apresentaram umidades pouco superiores a 3%. Isto está abaixo do valor recomendado de menos de 5%, adequado para garantir uma boa estabilidade físico-química do produto (RAMAKRISHNAN et al., 2018). Além do teor de umidade, a atividade de água é outro parâmetro importante no armazenamento de pós, assim como a higroscopicidade, que indica o grau de adsorção de água pelo material quando exposto a um ambiente de umidade relativa determinada. Adsorção de água por alimentos em pó pode promover reações de degradação e afetar suas propriedades de fluxo (KOÇ; DIRIM, 2018). De acordo com a Tabela 4, os pós de SPMO e SMO apresentaram A_w abaixo de 0,6, que é considerado o limite superior da atividade de água para garantir a estabilidade microbiológica (ROCHA et al., 2019). No entanto, observou-se que, no mesmo teor de água, as microcápsulas de SPMO apresentaram significativamente ($p < 0,05$) maior A_w e menor higroscopicidade (0,280; 8,5%) em relação às microcápsulas de SMO (0,176; 9,3%). Souza et al. (2017) observaram resultados semelhantes: microcápsulas de extrato de bagaço de jabuticaba formuladas com SPI, pectina e maltodextrina como materiais de parede apresentaram aumento de A_w e discreta redução da higroscopicidade em relação às microcápsulas produzidas sem adição de pectina.

As moléculas de pectina possuem grupos carboxila que podem sofrer metoxilação, serem neutralizados por cátions ou permanecer em sua forma livre. O grau de metoxilação da molécula de pectina influencia a maneira pela qual as cadeias moleculares ligam a água. Os grupos carboxila têm uma elevada afinidade pela água, enquanto os grupos metoxílicos são hidrofóbicos. No entanto, a afinidade desses grupos pela água não é o único fator importante para a compreensão do mecanismo que envolve a sorção de água por essas moléculas. A disponibilidade de grupos polares na molécula do polissacarídeo, a distribuição e disposição destes grupos, o grau de cristalinidade e a presença de estruturas secundárias (ligações inter-cadeias) são fatores adicionais que influenciam a ligação da água pelo biopolímero (CHEN et al., 1984). Em $A_w < 0,8$, a pectina de alta metoxilação tende a absorver mais água do que as pectinas de menor grau de metoxilação, pois para um maior grau de metoxilação o número de ligações inter-cadeias torna-se menor e os grupos carboxílicos restantes permanecem disponíveis para sorção de água. Além disso, a presença de grupos metoxílicos aumenta a

distância intermolecular e leva a uma maior perda do *empacotamento* dos biopolímeros, o que permite a penetração de moléculas de água (TSAMI; VAGENAS, 1992).

As proteínas possuem vários grupos que podem se ligar a moléculas de água, como os grupos peptídicos da cadeia principal, grupos carregados (interações íon-dipolo), grupos hidroxila dos resíduos serina, treonina e tirosina (interações dipolo-dipolo), dentre outros. Por outro lado, as proteínas de soja contêm muitos resíduos de aminoácidos hidrofóbicos que em meios aquosos têm seus grupos não-polares expostos, tendendo a se ligar a moléculas vizinhas (FENNEMA; PARKIN, 2007). Assim, a interação promovida entre o isolado proteico de soja e a pectina em emulsões de dupla camada pode explicar os resultados obtidos neste trabalho, uma vez que as interações eletrostáticas entre estas moléculas podem deixar menos locais disponíveis para ligação de água, aumentando a A_w e reduzindo a capacidade de retenção de água dos pós de SPMO. No caso dos pós de SMO, na ausência de pectina, os sítios de proteína permanecem disponíveis para se ligarem à água, levando a uma A_w mais baixa e uma higroscopicidade mais elevada.

A adição de pectina causou uma redução na absorção de água pelos pós SPMO (menores valores de higroscopicidade), o que pode ajudar a manter sua qualidade durante o armazenamento. Outra variável que influencia a adsorção de água pelos pós é o tamanho da partícula, com partículas maiores apresentando menor área superficial exposta e, portanto, apresentando menores taxas de adsorção de água (KUCK; NORENÃ, 2016). No presente trabalho, maior tamanho de partícula e menor área superficial específica (Tabela 4) foram observados para os pós de SPMO, o que pode ter influenciado também a menor taxa de adsorção de água observada para esta formulação.

5.2.2 Propriedades de reconstituição e fluxo dos pós

A reconstituição de pós é considerada uma operação unitária que envolve dispersão, umedecimento, imersão e dissolução de partículas, etapas que podem ocorrer simultaneamente e afetar umas as outras. É desejável pós com boa dispersão e propriedades de dissolução para assegurar uma reconstituição que forneça as mesmas características químicas, sensoriais e nutricionais do produto original. Uma dissolução pobre pode resultar na formação de *grumos*, influenciando diretamente a aceitação do consumidor (BÖRJESSON et al., 2013).

O tempo de molhamento refere-se ao tempo necessário para as partículas submergirem, ultrapassando a tensão interfacial entre a superfície da partícula e o meio líquido. O tempo de dissolução do pó é definido pelo tempo necessário para o pó se dissolver

homogeneamente no solvente sob agitação, enquanto a solubilidade refere-se à quantidade de material efetivamente dissolvido no meio, sendo de suma importância para a qualidade final do produto reconstituído (JAYASUNDERA et al., 2011).

Com exceção do tempo de dissolução em água, as propriedades de reconstituição avaliadas apresentaram diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as microcápsulas de camada unica e dupla (Tabela 4). Os pós de SPMO apresentaram maior tempo de molhamento, menor solubilidade em água e menor tempo de dissolução em óleo de soja do que os pós de SMO, o que pode ser uma indicação de que a microestrutura de dupla camada confere menor caráter hidrofílico às microcápsulas de SPMO. Os valores encontrados para os ângulos de contato das duas formulações corroboram com essa diferença de caráter hidrofílico observada para as amostras, uma vez que o ângulo encontrado para os pós de SPMO foi de 89,3º e para os pós de SMO foi 84,4º ($p < 0.05$). Um ângulo de contato menor do que 90º é característico de um comportamento hidrofílico das partículas, sendo o líquido capaz de molhar a superfície do sólido (LAZGHAB et al., 2005). Porém, como o valor do ângulo de contato dos pós de óleo de pimenta rosa foi próximo de 90º, pode-se assumir um fraco comportamento hidrofílico dessas partículas. Resultado similar foi observado por Galet et al. (2004), que obteve ângulo de contato de 89º para cacau em pó, utilizando o método de Washburn. Estes resultados estão de acordo com os resultados de higroscopicidade e A_w discutidos anteriormente. Além da composição do material de parede, as diferenças observadas nos tempos de molhamento e dissolução dos dois pós podem ser parcialmente explicadas por diferenças no tamanho de partícula e área de superfície, uma vez que a área de superfície maior favorece a dissolução (KUCK; NORENÃ, 2016).

Em geral, devido à natureza lipofílica do núcleo da microcápsula, ambas as formulações em pó não mostraram dissolução instantânea nem na água nem no óleo de soja, embora ambas as amostras apresentam tempos de dissolução mais baixos no óleo de soja. Favaro-Trindade et al. (2010) também encontraram menores tempos de dissolução em óleo do que em água, variando de 158 s a 177 s para microcápsulas de hidrolisado de caseína produzidas com gelatina e SPI como materiais de parede. Segundo esses autores, o resultado reflete a exposição de grupos hidrofóbicos, capazes de promover interações proteína-óleo, o que facilita a dissolução nesse meio.

A solubilidade em água das microcápsulas de óleo essencial de pimenta rosa foi de cerca de 70% (Tabela 4). Em trabalhos anteriores sobre microencapsulação de óleos essenciais, foi determinada uma solubilidade de 84,6% para microcápsulas de óleo essencial de gengibre produzidas com goma arábica e maltodextrina, enquanto microcápsulas de óleo essencial de

alecrim produzidas com maltodextrina e amido modificado apresentaram solubilidade variando de 43,6% a 48,9% (SOUZA et al., 2016; FERNANDES et al., 2014). A solubilidade relativamente alta das microcápsulas de SMO e SPMO é importante porque amplia as possibilidades de aplicação de óleo essencial de pimenta rosa em produtos alimentícios, uma vez que em sua forma pura o óleo não é solúvel em água.

As propriedades de fluxo dos pós são extremamente importantes na eficácia dos processos industriais, como armazenamento, compactação e transporte de produtos em pó (MASSARO SOUSA et al., 2019), e podem ser descritas pela densidade do pó (*aparente*, *compactada* e real), porosidade aparente, ângulo de repouso e indicadores como Carr Index (CI) e razão de Hausner (RH). O Índice de Carr classifica a fluidez do pó como 'muito boa' (IC < 15%), 'boa' (15 < IC < 20%), 'regular' (20 < IC < 35%), 'ruim' (35 < IC < 45%) e 'muito ruim' (IC > 45%). A coesão pode ser classificada de acordo com o Índice de Hausner em 'baixa' (IH < 1,2), 'intermediária' (1,2 < IH < 1,4) e 'alta' (IH > 1,4) (JINAPONG et al., 2008). O ângulo de repouso (Θ) indica 'excelente fluxo' (Θ < 30 °), 'bom' (31 < Θ < 35 °), 'razoável' (36 < Θ < 40 °), 'aceitável' (41 < Θ < 45 °), 'ruim' (46 < Θ < 55º) e ‘péssimo’ (Θ > 56º) (SHAH; KHAN, 2008).

As microcápsulas de SMO e SPMO apresentaram densidade aparente em torno de 0,3 $g.mL^{-1}$, sendo semelhante aos valores observados para microcápsulas de outros óleos essenciais produzidos por *spray drying* (FERNANDES et al., 2014; FERNANDES et al., 2013). Uma alta densidade aparente é desejável no transporte e armazenamento de pós porque quanto maior a densidade aparente, menor o volume necessário para armazenamento. Além disso, haverá menos espaços vazios entre as partículas para passagem de ar que possa levar à degradação oxidativa. As densidades compactada e real das partículas de microcápsulas de óleo essencial apresentaram diferenças significativas ($p < 0,05$) para as microcápsulas de camada unica e dupla. A densidade de partículas depende de vários fatores, desde o processamento e manuseio de pós até sua composição química e tamanho de partícula. Valores de densidade de partículas entre 0,742 e 0,917 $g.mL^{-1}$ foram encontrados para microcápsulas de óleo essencial de orégano com maltodextrina, goma arábica e amido modificado (BOTREL et al., 2012), e estas foram inferiores às observadas no presente trabalho.

A porosidade aparente das microcápsulas de óleo essencial de pimenta rosa, calculada a partir dos valores de densidade compactada e real (Equação 4) foi menor para SMO (55,9%) do que para os pós de SPMO (60,6%), o que pode ser atribuído em parte ao maior tamanho de partícula, mas também à menor densidade de partículas de microcápsulas de dupla camada, indicando que a presença de pectina afetou a microestrutura das partículas. Valores similares

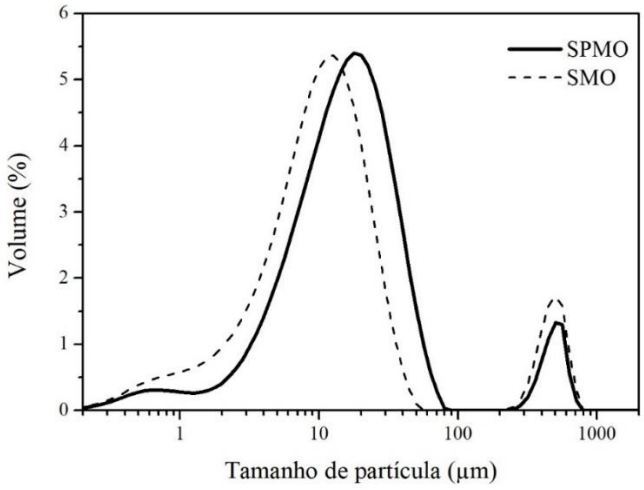
para porosidade foram encontrados na literatura para outros pós alimentícios (SZULC; LENART, 2016). A porosidade desempenha um papel importante na reidratação de pós secos (FERNANDES et al., 2013) e também na sua estabilidade durante o armazenamento, afetando reações oxidativas causadas pela presença de ar entre seus poros (SANTANA et al., 2013). Assim, porcentagens menores de porosidade são desejáveis para boa qualidade de pós alimentícios.

Os pós de SPMO e SMO também apresentaram diferenças significativas ($p < 0,05$) para o ângulo de repouso, fluidez e coesividade. Os pós SPMO apresentaram coesividade intermediária (1,33), fluidez regular (24,5%) e ângulo de repouso de excelente vazão (22,6º), enquanto os pós de SMO apresentaram alta coesividade (1,47) e razoável fluidez (31,9%) e ângulo de repouso (37,4°). A composição das partículas desempenha um papel importante na capacidade de fluidez dos pós, que envolve a superação da atração superficial entre as partículas. Se a massa da partícula é muito pequena em relação às forças de atração inter-partículas, uma maior coesão é esperada. Essa coesão entre as partículas pode ocorrer em pós finos e secos devido à ação das forças de Van der Waals. Forças de ligação tornam-se importantes quando há aumento de umidade nos pós. A diminuição da fluidez dos pós geralmente está associada ao aumento do teor de umidade, o que aumenta a espessura da camada líquida adsorvida e a resistência das pontes líquidas que se formam entre as partículas (MASSARO SOUSA et al., 2019). Para os pós de óleo essencial de pimenta rosa, no entanto, não houve diferença na umidade. Assim, a diferença encontrada nas propriedades de fluxo pode ser explicada pela diferença em suas atividades de água. Juarez-Enriquez et al. (2019) observaram que a A_w apresentou uma correlação mais forte com as propriedades de fluidez dos pós que o conteúdo de umidade. Esses autores encontraram valores de A_w diferentes para um conteúdo similar de umidade de pós de pectina e observaram que a fluidez diminuiu conforme o aumento de A_w, o que está de acordo com os resultados do presente trabalho. Segundo Fitzpatrick et al. (2004), pequenas mudanças nas condições de armazenamento e propriedades das partículas podem ser suficientes para afetar significativamente a fluidez dos pós. Eles afirmaram que o tamanho de partícula é um dos fatores mais influentes na fluidez dos pós, e partículas muito pequenas (menos de 200 μm) têm reduzida fluidez devido ao aumento da área de superfície por unidade de massa de pó. Isso se deve à ação de forças coesivas que exercem maior atrito e, consequentemente, maior resistência ao fluxo de partículas

5.2.3 Distribuição do tamanho de partículas e propriedades morfológicas

A distribuição do tamanho de partículas das microcápsulas secas em *spray dryer* de óleo de pimenta rosa foi bimodal (Figura 5), com um grande pico abaixo de 100 μm e um pico menor variando entre 200 μm e 800 μm. O diâmetro Sauter (D [3,2]) foi maior para o pó de SPMO (5,92 μm) do que para o pó de SMO (4,19 μm). Outra medida importante na análise do tamanho de partículas é a moda, ou seja, o tamanho de partícula de maior frequência na distribuição - referente ao pico mais alto do gráfico - que foi 20,00 μm e 12,62 μm, respectivamente, para os pós de SPMO e SMO. Foi relatado que maior eficiência de encapsulação é observada para partículas com maior diâmetro (JAFARI et al., 2008). O maior diâmetro significativo para partículas com adição de pectina ($p < 0,05$) corrobora com os resultados observados quanto às propriedades de fluxo desses pós, como discutido em tópico anterior deste trabalho.

Figura 5 - Distribuição do tamanho de partículas para as microcápsulas de SPMO e SMO.



Fonte: AUTOR, 2020.

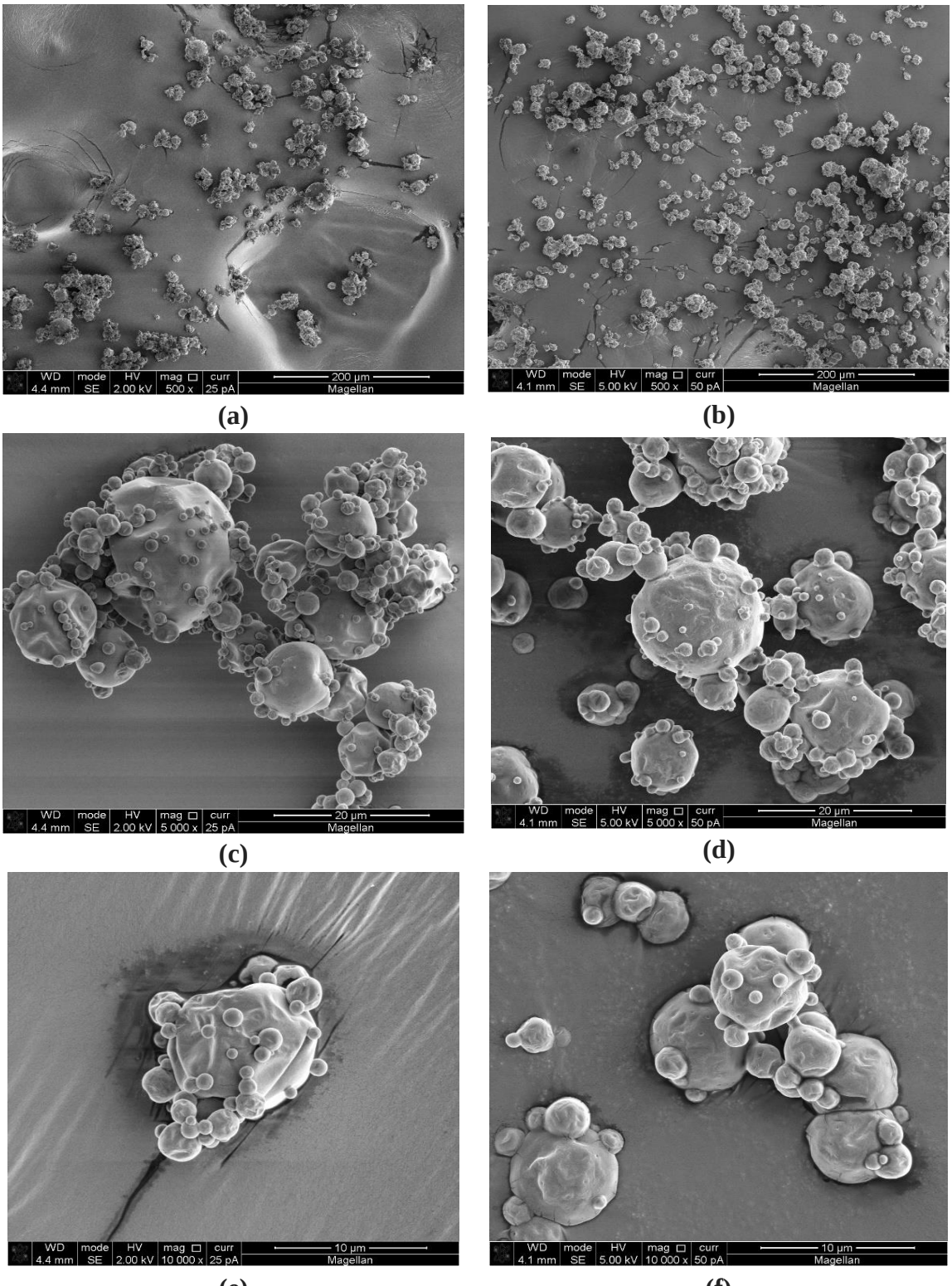
Durante a análise, observou-se maior aglomeração do pó de SMO. Este comportamento é evidenciado pelos valores Span e D_{10}, D_{50} e D_{90} (Tabela 4). A faixa de Span inferior para partículas de SPMO indicou uma polidispersividade menor quando comparada ao pó de SMO. Uma diferença expressiva foi observada no valor de D_{90}, para o qual a amostra de SMO teve um valor superior ao triplo de SPMO, que sugere a presença de partículas superdimensionadas e aglomerados.

O uso de proteínas na estabilização de emulsões trás vantagens em relação à prevenção de coalescência e agregação entre gotículas. No entanto, no pI destas proteínas, onde

as suas cargas líquidas são zero, a agregação entre gotículas pode ocorrer se a espessura da camada adsorvida for pequena (ALBANO et al., 2019). Estudos com complexos formados pela interação proteína/pectina concluiram que a adição de pectina em emulsões com pH próximo ao pI melhora a estabilidade e evita a agregação entre gotículas devido à maior espessura da camada de biopolímero adsorvido (EVANS et al., 2013; JARAMILLO et al., 2011). Considerando os resultados obtidos no presente trabalho, é possível supor que a adição de pectina, formando emulsões de dupla camada, permitiu uma menor agregação entre as partículas mesmo após a secagem por *spray dryer*, como indicado pela menor distribuição de tamanho de partícula apresentada pelo pó de SPMO. Além disso, a maior higroscopicidade dos pós de SMO pode promover maior adesão e facilitar a agregação de partículas durante o armazenamento.

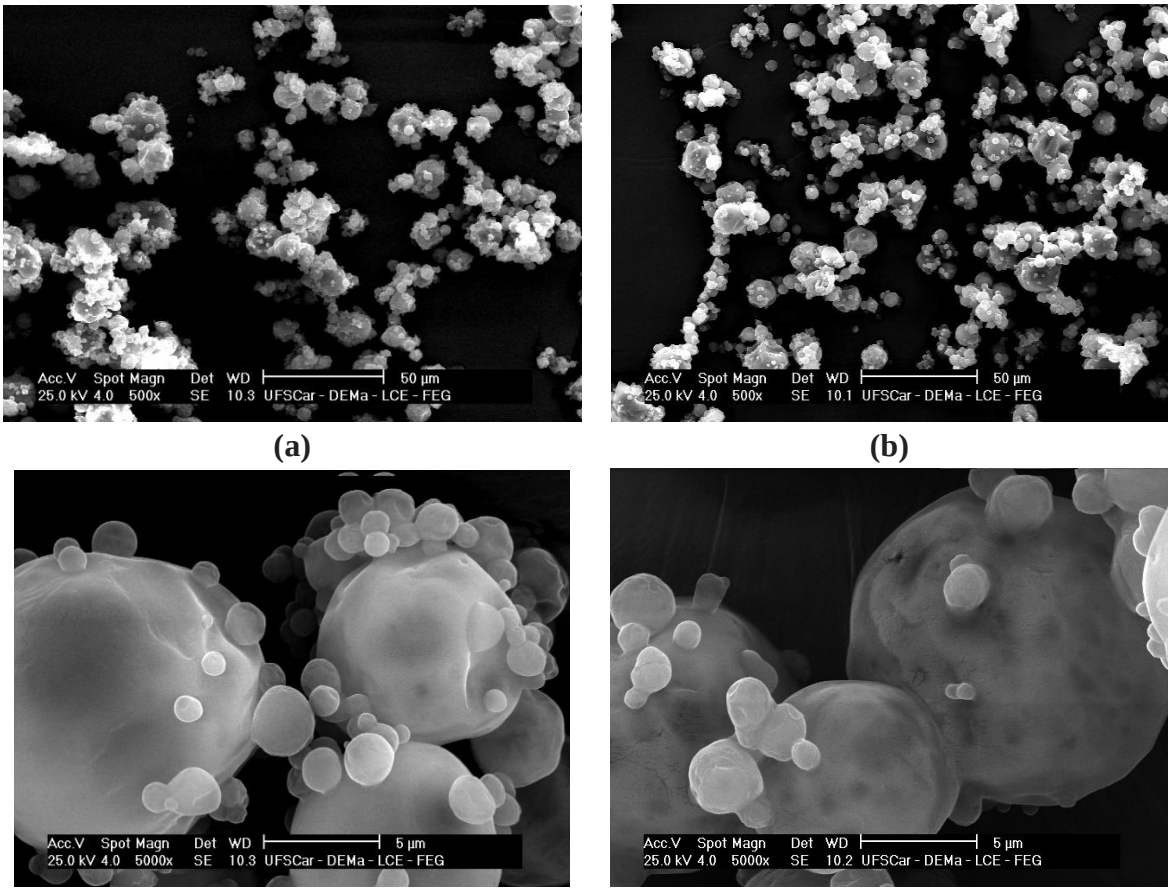
As microscopias eletrônicas de varredura (MEV) dos pós de óleo essencial de pimenta rosa foram adquiridas em dois equipamentos diferentes - Magellan e FEG (Figuras 6 e 7), mostrando diferentes aspectos da microestrutura do pó. Em geral, é possível observar que as partículas apresentaram uma forma esférica, com ligeiras depressões, típicas de materiais secos por pulverização, em que ocorre encolhimento do material devido à rápida perda de água durante os estágios iniciais de secagem (RÉ, 1998). Não foram observados rachaduras e poros aparentes na superfície das partículas, o que é uma característica positiva para melhor preservação de compostos voláteis no óleo essencial, uma vez que há menor permeabilidade a gases que podem causar oxidação, além de garantir maior eficiência de encapsulação. As partículas de SPMO apresentaram maior esfericidade quando comparadas às partículas de SMO (Fig. 6c e 7d). A partir das imagens 6a e 7a é possível observar uma maior aglomeração de partículas sem a adição de pectina, em contraste com as imagens 6b e 7b, que tiveram adição de pectina e apresentaram partículas menos aglomeradas. A alta aglomeração de pós contendo combinações de maltodextrina e SPI também foi relatada na literatura (MOSER et al., 2017). É também possível observar nas Figuras 6f e 7d que as partículas de SPMO parecem ter uma parede mais espessa e uma aparência mais lisa do que as partículas de SMO, que podem estar associadas à camada de revestimento da pectina.

Figura 6 - Micrografias MEV capturadas em FEI Magellan 400 L das microcápsulas de óleo essencial de pimenta rosa produzidas por spray drying de emulsões de camada única (a, c, e) e dupla camada (SPMO) (b, d, f)



Fonte: AUTOR, 2020.

Figura 7 - Micrografias MEV capturadas por Philips XL-30 FEG das microcápsulas de óleo essencial de pimenta rosa produzidas por spray drying de emulsões de camada única (SMO) (a, c) e dupla camada (SPMO) (b, d)



(a) **(b)**

(c) **(d)**

Fonte: AUTOR, 2020.

5.3 Estabilidade no armazenamento das microcápsulas

5.3.1 Isotermas de sorção

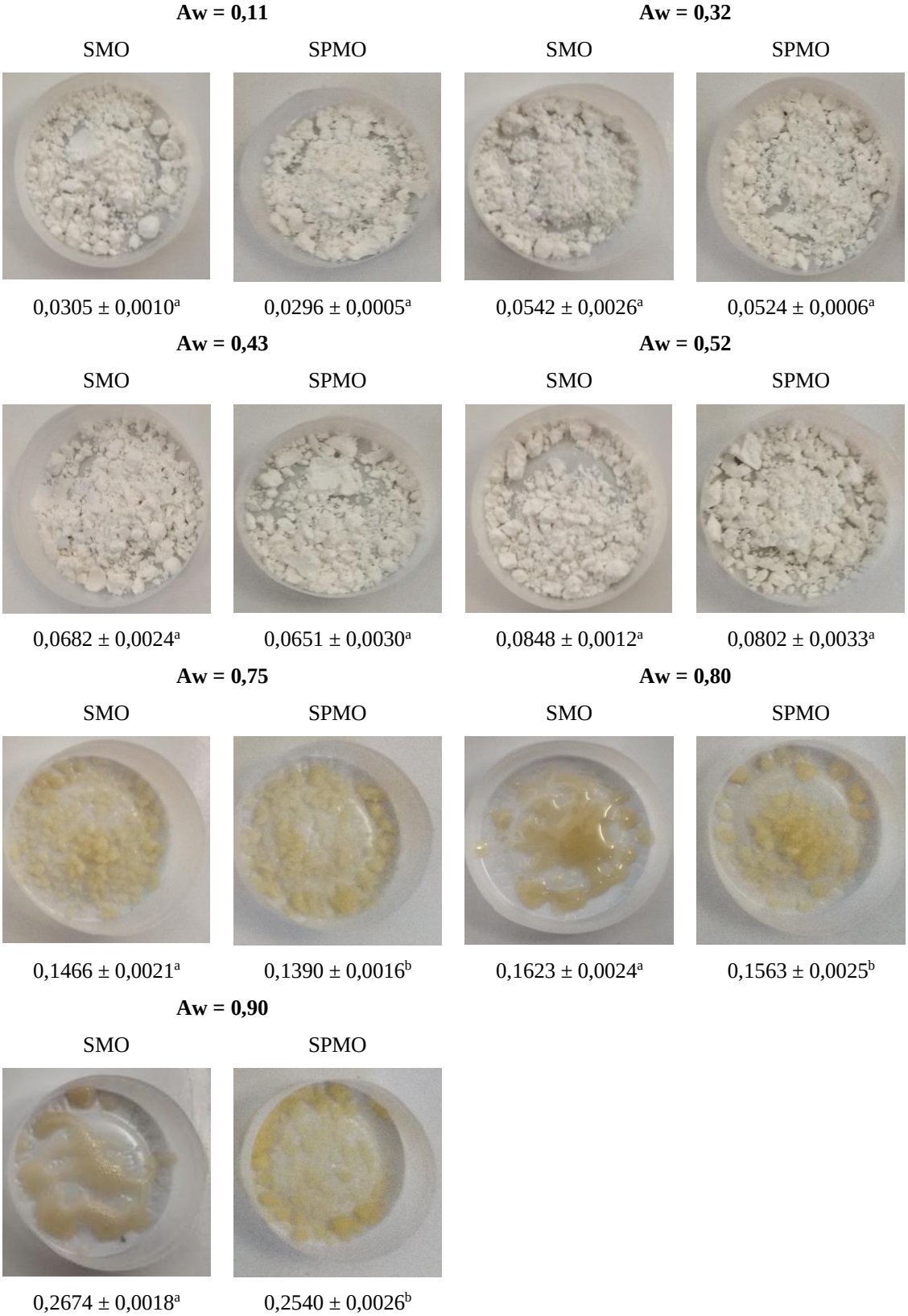
A Figura 8 apresenta o aspecto físico dos pós após o período de armazenamento e os valores das umidades de equilíbrio das amostras de microcápsulas de SMO e SPMO nas diferentes umidades relativas avaliadas.

As amostras de pós armazenadas em umidades relativas mais elevadas ($A_w \geq 0,75$) apresentaram diferenças significativas ($p < 0,05$), com as amostras de SMO absorvendo mais água que as amostras de SPMO. O modelo de GAB apresentou ajuste satisfatório para as isotermas de sorção dos pós, com elevado valor de R^2 e um menor erro RQEM (Figura 9 e Tabela 5). As isotermas de sorção das microcápsulas podem ser classificadas como isotermas sigmoides tipo II. Essa classificação está de acordo com outros trabalhos que determinaram isotermas de sorção de microcápsulas produzidas por *spray drying* de diferentes óleos essenciais (FERNANDES et al., 2017; CAMPELO et al., 2017; HIJO et al., 2015) e é relatada na literatura como comum para alimentos porosos (BRUNAUER et al., 1940; ASCHERI; CARVALHO, 2006).

Uma isoterma pode ser dividida em três zonas (I, II e III), que dependem diretamente do estado em que a água adsorvida se encontra na matriz (FENNEMA; PARKIN, 2007). Nas isotermas das microcápsulas de óleo de pimenta rosa, é possível observar que na faixa que compreende a zona I ($A_w < 0,3$) os pós analisados permanecem no estado vítreo, preservando suas características originais. Na zona II ($0,3 < A_w < 0,8$), já é possível observar um pouco melhor o ganho de água dos pós, que a partir da amostra de $A_w = 0,75$ começou a apresentar-se no estado gomoso, causado pelo amolecimento da matriz sólida. Na zona III ($A_w > 0,8$) é possível observar ganho mais expressivo de água pelas amostras, com presença de água com maior mobilidade e menos ligada. A amostra sem adição de pectina apresentou maior perda de sua estrutura sólida para as umidades relativas mais elevadas, como pode ser observado pela Figura 8.

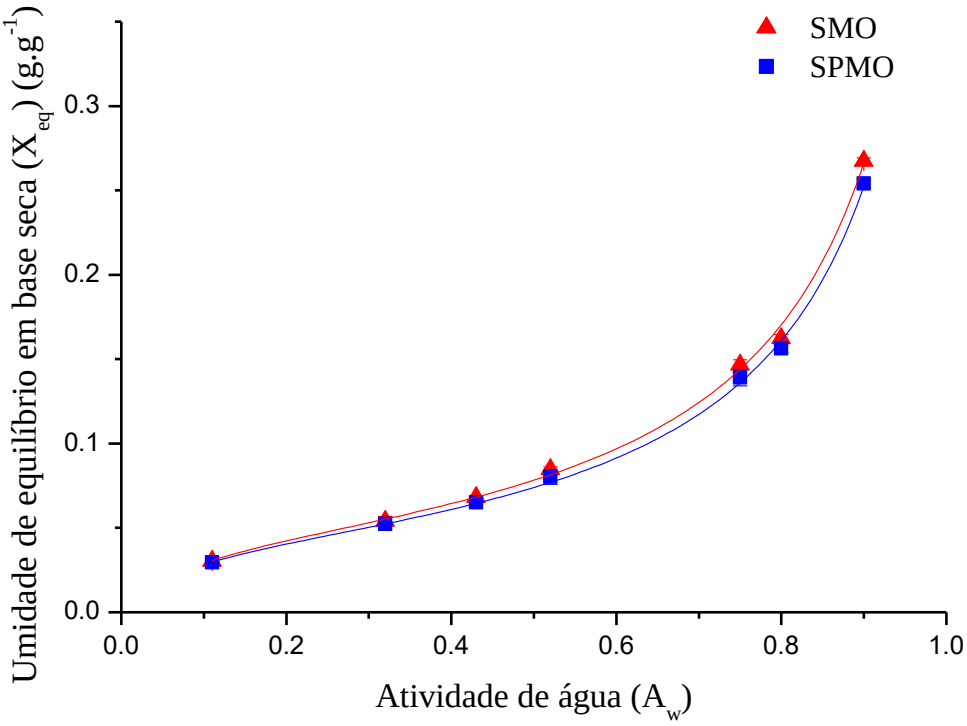
O parâmetro X_m do modelo de GAB representa a umidade da monocamada correspondente a estabilidade físico-química da matriz dos sólidos, enquanto o parâmetro C é uma constante relacionada ao calor de sorção da camada monomolecular e o parâmetro k é uma medida das interações entre as moléculas em multicamadas com o adsorvente. Foi observada diferença significativa entre todos os parâmetros determinados para as duas amostras de pós ($p < 0,05$).

Figura 8 - Umidade de equilíbrio e aspecto físico das amostras de pó armazenadas em diferentes umidades relativas (25 ºC).



Dados expressos em Média ± Desvio Padrão. Letras diferentes na mesma linha têm diferença significativa ($p < 0,05$).
Fonte: AUTOR, 2020.

Figura 9 - Isotermas de adsorção das microcápsulas de óleo de pimenta rosa a 25 ºC e curvas indicando o ajuste do modelo de GAB.



Fonte: AUTOR, 2020.

Tabela 5 - Parâmetros do modelo de GAB ajustado para as amostras de microcápsulas

	GAB				
	X_m	C	k	R^2	RQEM
SMO	0,045 ± 0,000[a]	14,583 ± 0,030[a]	0,928 ± 0,000[a]	0,99691	0,00345
SPMO	0,043 ± 0,001[b]	15,975 ± 0,187[b]	0,924 ± 0,002[b]	0,99819	0,00251

Dados expressos em Média ± Desvio Padrão. Letras diferentes na mesma coluna têm diferença significativa ($p < 0,05$).

A amostra com adição de pectina apresentou valores de X_m e k ligeiramente menores e um valor de C maior do que os valores encontrados para a amostra sem pectina. Fernandes et al. (2017) encontraram valores de 0,024, 0,961 e 146,26 para X_m, k e C, respectivamente para microcápsulas de óleo essencial de gengibre, usando isolado proteico do soro de leite e a inulina como materiais de parede. Hijo et al. (2015) encontraram valores de 0,049, 0,904 e 128,97 para X_m, k e C, respectivamente para microcápsulas de óleo essencial de orégano com amido

modificado e goma arábica. Ambos os autores encontraram valores de C superiores aos encontrados neste estudo.

O valor mais elevado de C indica que uma maior quantidade de calor está envolvida na adsorção de água dos pós com adição de pectina. Um valor alto de k (maior que 0,9), como observado para as duas amostras, indica que as moléculas da monocamada e das multicamadas não apresentam grandes diferenças e que as moléculas das multicamadas têm comportamento de moléculas em estado líquido (QUIRIJINS et al, 2005).

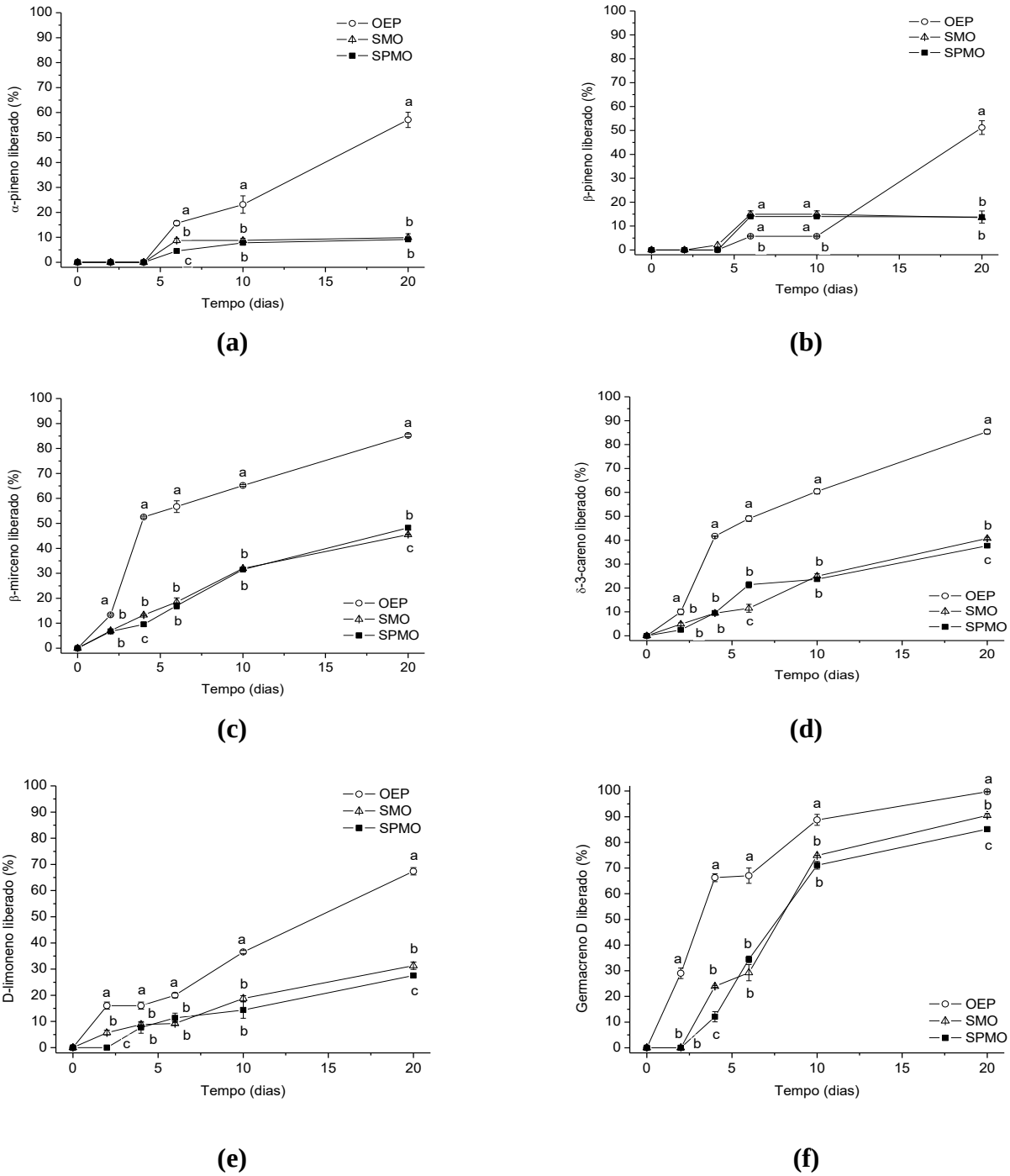
5.3.2 Liberação dos voláteis

A perda de compostos voláteis durante o armazenamento da microcápsula pode estar relacionada a diferentes aspectos, como difusão do material encapsulado por porosidade nas cápsulas, heterogeneidade da matriz encapsulante e envelhecimento vítreo dos materiais de parede (CAMPELO et al., 2018). Dada a mistura complexa que caracteriza a composição química dos óleos essenciais e que cada combinação de biopolímeros promove uma estrutura protetora diferente de compostos, o conhecimento dos mecanismos de liberação desses agentes bioativos é de extrema importância.

A Figura 10 apresenta os resultados da liberação de compostos voláteis das microcápsulas de óleo essencial de pimenta rosa durante 20 dias de armazenamento a 25 ºC e uma umidade relativa de 52,3%, mostrando o impacto desses parâmetros na liberação dos voláteis das microcápsulas produzidas. Um controle contendo óleo essencial puro (OEP) também foi armazenado para verificar a influência dos materiais da parede utilizados na preservação dos compostos.

Em geral, o perfil de liberação de formulações de microcápsula de camada única e dupla foi semelhante para as condições analisadas. Esse resultado está de acordo com o observado por Gharsallaoui et al. (2012) em um estudo que avaliou a estabilidade de compostos voláteis odoríferos microencapsulados por *spray dryer* usando isolado de proteína de ervilha, pectina e maltodextrina. Os autores avaliaram a estabilidade de armazenamento de microcápsulas de camada única (somente estabilizada por proteínas) e de camada dupla (estabilizada por proteína/pectina) a 20 °C e a várias umidades relativas (UR: 0 - 94%), observando que para umidades relativas de 33 e 52% os perfis de liberação foram muito semelhantes para ambas as formulações.

Figura 10 - Liberação de α-pineno (a), β-pineno (b), β-mirceno (c), δ-3-careno (d), D-limoneno (e) e germacreno D (f) do óleo essencial de pimenta rosa puro (OEP) e do óleo extraído das microcapsulas de camada única (SMO) e de camada dupla (SPMO) durante 20 dias de armazenamento (25ºC / UR = 52.3%).



OEP: óleo essencial puro; SMO: óleo extraído das microcapsulas de camada única; SPMO: óleo extraído das microcápsulas de camada dupla. Diferentes letras em um mesmo ponto significam amostras diferentes ($p < 0,05$). Fonte: AUTOR, 2020.

Durante o armazenamento, a massa de óleo extraído diminuiu em 13% para SPMO e 17% para SMO, enquanto que a massa de óleo essencial puro (OEP) armazenada reduziu seu volume em 41,4% (desvio padrão entre 0,5 a 1,4%). Já a liberação dos compostos voláteis variou de 50 a 100% para os seis compostos avaliados no óleo essencial puro, sendo o germacreno D o composto com maior taxa de liberação, seguido de β-mirceno, δ-3-careno, D-limoneno, α-pineno, p-pineno. As microcápsulas de camada única e dupla seguiram essa ordem de liberação dos compostos, mas foram eficientes em possibilitar uma liberação de voláteis mais gradativa, reduzindo as taxas de liberação para menos da metade dos valores apresentados pelo óleo puro, dependendo do composto.

A liberação de α-pineno e β-pineno mostrou comportamento semelhante ao longo do período avaliado. Diferentemente dos outros compostos avaliados, nenhuma liberação desses dois compostos foi observada nos primeiros dias de armazenamento, com valores significativos aparecendo apenas a partir do sexto dia (Figs. 10a e 10b). A partir do 10º dia, no entanto, o óleo puro teve uma taxa de liberação mais alta, atingindo 57% e 51% de liberação de α-pineno e β-pineno ao final de 20 dias de armazenamento. As microcápsulas mostraram uma proteção eficiente desses compostos, com aproximadamente 9% de liberação de α-pineno e 13% de liberação de β-pineno para as formulações SMO e SPMO, respectivamente.

Os compostos β-mirceno e δ-3-careno apresentaram altas taxas de liberação de óleo essencial puro, atingindo 85%, aproximadamente o dobro das taxas de liberação de microcápsulas (Fig. 10c e 10d). As microcápsulas SMO apresentaram retenção ligeiramente maior de β-mirceno (45,5%) quando comparadas às microcápsulas SPMO (48,2%). O resultado oposto foi observado em relação ao δ-3-careno, onde a formulação de dupla camada apresentou menor taxa de liberação (37,7%) em relação às microcápsulas de camada única (40,8%) ($p < 0,05$). Este resultado pode ser explicado pela afinidade de cada composto com a matriz encapsulante e, consequentemente, pela facilidade ou não de difusão através dela. Aspectos como absorção de água, comprimento das cadeias poliméricas e ponto de plastificação dos materiais da parede influenciam diretamente a liberação de compostos voláteis, bem como o tamanho e a morfologia das cápsulas (CAMPELO-FELIX et al., 2016).

A liberação de D-limoneno foi de 67,4%, 31,3% e 27,6% para o óleo puro e para as microcápsulas SMO e SPMO, respectivamente (Fig. 10e) ($p < 0,05$). Marquez-Gómez et al. (2017) avaliaram a estabilidade de armazenamento do composto D-limoneno presente em um padrão de óleo essencial de laranja encapsulado por *spray drying* usando combinações de diferentes materiais. Uma formulação de microcápsula contendo amido de arroz modificado e maltodextrina (1:1) como materiais de parede mostrou aproximadamente 90% de liberação de

D-limoneno após 20 dias de armazenamento a 25 °C e UR = 50%. Os resultados obtidos no presente trabalho sugerem maior proteção para este composto em sistemas de encapsulamento que consistem em interações proteína-polissacarídeo.

O germacreno D apresentou as maiores taxas de liberação entre os compostos avaliados. No final de 20 dias de armazenamento, 100% do composto foi liberado do óleo essencial puro (Fig. 10f). As microcápsulas também apresentaram altas taxas de liberação, com a formulação de camada dupla retendo mais composto (85,2%) do que a formulação de camada única (90,5%) ($p < 0,05$). A alta taxa de liberação deste composto pode ser explicada por uma maior tendência do composto a perdas de volatilização, como mostrado na Tabela 3, onde se apresentou como o composto com a maior redução na área do pico do cromatograma após o processo de microencapsulação por *spray drying*. De fato, o germacreno D é reconhecido na literatura como um composto instável (KRAKER et al., 1998). Em teoria, o germacreno D seria o composto com maior resistência à volatilização entre os voláteis avaliados, devido ao seu maior peso molecular e ponto de ebulição. No entanto, outros fatores devem influenciar esse resultado, como a concentração de cada composto no óleo essencial e a maneira como as moléculas interagem.

Dos seis terpenos avaliados, em três compostos (δ-3-careno, D-limoneno e germacreno D) foi possível observar menor liberação nas microcápsulas de dupla camada após 20 dias de armazenamento ($p < 0,05$). A camada dupla produzida com o revestimento de pectina pode explicar esses resultados, pois os compostos voláteis podem ser mais facilmente retidos na rede de gel formada pelo polissacarídeo. Essa interação pode ocorrer através das interações de Van der Waals de um grupo de pectina hidrofóbica com o adesivo alquil de uma molécula volátil (Burgós-Diaz et al., 2018). No entanto, mais estudos devem ser realizados para entender como a camada de revestimento de pectina atua nas moléculas dos compostos voláteis microencapsulados.

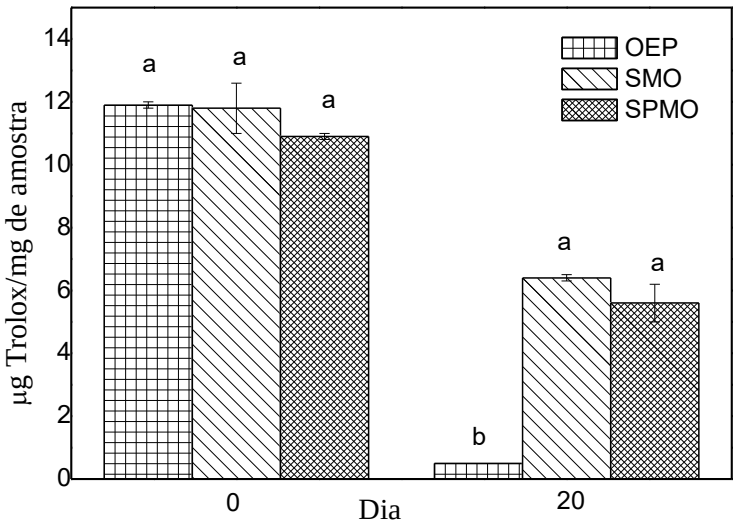
Os resultados encontrados neste trabalho destacam a individualidade do comportamento de liberação de cada volátil presente no óleo essencial. O conhecimento dessas particularidades é importante ao projetar sistemas eficientes de liberação controlada para esses compostos, a fim de alcançar a ação bioativa desejada.

5.3.3 Atividade antioxidante

A Figura 11 apresenta os resultados obtidos no ensaio ABTS para as amostras OEP, SMO e SPMO no inicio e ao fim do período de armazenamento de 20 dias.

A partir dos resultados apresentados, observa-se que não houve diferença ($p < 0,05$) na atividade antioxidante das amostras no início do armazenamento, uma vez que todas apresentaram valores em torno de 11 μg de Trolox/mg de óleo. Esse resultado se encontra dentro da faixa de valores determinados por Asensio et al. (2017) para microcápsulas de óleo essencial de orégano produzidas por *spray dryer*, que variaram de 0,17 a 12,7 μg de Trolox/mg de óleo. A atividade antioxidante do óleo essencial de pimenta rosa ainda se mostra próxima a atividade de legumes e verduras comumente consumidos no Brasil, como a acelga, brócolis, rabanete e espinafre (TIVERON, 2010). Uma vez que as microcápsulas foram armazenadas logo após sua produção é possível concluir que o processo de microencapsulação por *spray dryer* não acarretou em perda das propriedades antioxidantes presentes no óleo essencial puro.

Figura 11 - Atividade antioxidante equivalente ao Trolox (μg Trolox/mg de amostra) do óleo essencial puro (PEO) e dos óleos extraídos de microcápsulas de camada única (SMO) e de camada dupla (SPMO) no tempo t = 0 e t = 20 dias de armazenamento (25 ºC / UR: 52,3%)



Letras diferentes no mesmo período indicam diferença significativa entre as amostras ($p < 0,05$).
Fonte: AUTOR, 2020.

Ao término do período de armazenamento, perdas expressivas foram observadas para o óleo essencial puro (0,5 μg de Trolox/mg de óleo). As microcápsulas SMO e SPMO também

apresentaram perda de suas propriedades antioxidantes, mas em menor grandeza do que o óleo puro, apresentando valores de 6,4 e 5,6 μg de Trolox/mg de óleo, respectivamente. A redução da atividade antioxidante das amostras ao fim do armazenamento se deve a liberação dos compostos voláteis do óleo essencial que, como apresentado anteriormente, foi maior para o óleo livre do que para as microcápsulas. Embora as duas formulações tenham se mostrado eficazes em preservar as propriedades do óleo essencial de pimenta rosa, não foi observada diferença na ação antioxidante das estruturas com e sem adição de pectina ($p < 0,05$).

5.4 Atividade antimicrobiana das microcápsulas

5.4.1 Atividade antimicrobiana *in vitro*

Seis bactérias foram avaliadas no ensaio *in vitro* de atividade antimicrobiana das microcápsulas de óleo essencial de pimenta rosa. Foram observados halos de inibição apenas para as bactérias gram-positivas avaliadas, enquanto que para as bactérias gram-negativas, *Salmonella typhimurium* e *Escherichia coli*, não houve atividade inibitória. De forma geral, os óleos essenciais tendem a apresentar melhores resultados de inibição para bactérias gram-positivas do que para bactérias gram-negativas. Isso ocorre devido a diferença encontrada na parede celular dessas bactérias que, no caso das gram-negativas, apresentam uma membrana externa composta de duas camadas de lipopolissacarídeo, sendo mais resistentes à passagem de moléculas de agentes antimicrobianos do que as células de bactérias gram-positivas, revestidas por apenas uma camada de peptidoglicano (DANNENBERG et al., 2019).

A Tabela 6 apresenta os resultados obtidos para as quatro bactérias gram-positivas avaliadas. Nos ensaios, a atividade antimicrobiana das microcápsulas foi avaliada em diferentes tempos, após a produção em *spray dryer* até 90 dias em armazenamento em dessecador a temperatura ambiente. Durante o período de 90 dias avaliado, os halos de inibição para as microcápsulas SMO variaram de 10,6 a 19,8 mm para *S. aureus*, de 8,8 a 15,0 mm para *B. subtilis*, de 0,0 a 12,0 mm para *L. monocytogenes* e de 0,0 a 14,0 mm para *L. innocua*, enquanto que para as microcápsulas SPMO os halos variaram de de 13,1 a 22,2 mm para *S. aureus*, de 11,0 a 16,1 mm para *B. subtilis*, de 0,0 a 14,6 mm para *L. monocytogenes* e de 0,0 a 15,4 mm para *L. innocua.*

Foi observado, nos tempos t = 0 e t = 15 dias, uma maior inibição das microcápsulas de dupla camada (SPMO) em relação às microcápsulas de camada única (SMO) ($p < 0,05$). Essa maior ação inibitória das microcápsulas de dupla camada nos primeiros dias de armazenamento pode ser decorrente da maior retenção de óleo dessa formulação e da maior proteção proporcionada pelo recobrimento de pectina na retenção dos compostos voláteis do óleo durante a secagem em *spray dryer*, conforme apresentado na Tabela 3 deste trabalho. Nota-se ainda que, após o dia 15 até o término do período avaliado, não foram observadas diferenças entre as amostras. Este fato sugere que houve liberação mais expressiva dos voláteis das microcápsulas SPMO nos primeiros dias de armazenamento e, que após certo tempo, as microcápsulas com e sem a adição de pectina passaram a ter taxas de liberação semelhantes.

Tabela 6 - Atividade antimicrobiana de microcapsulas de óleo essencial de pimenta rosa de camada única (SMO) e de camada dupla (SPMO) em diferentes tempos de armazenamento.

Bacteria	**Zona de inibição (mm)**									
	t = 0		**t = 15 dias**		**t = 30 dias**		**t = 60 dias**		**t = 90 dias**	
	SMO	**SPMO**	**SMO**	**SPMO**	**SMO**	**SPMO**	**SMO**	**SPMO**	**SMO**	**SPMO**
S. aureus ATCC 6538	$10,6 \pm 0,7^{Cb}$	$13,1 \pm 0,6^{Ca}$	$12,8 \pm 0,4^{Cb}$	$14,0 \pm 0,5^{Ca}$	$19,2 \pm 1,2^{Ba}$	$19,0 \pm 0,0^{ABa}$	$19,8 \pm 0,6^{Ab}$	$22,2 \pm 0,6^{Aa}$	$13,6 \pm 1,0^{BCa}$	$15,3 \pm 2,0^{BCa}$
B. subtilis ATCC 6633	$8,8 \pm 0,8^{Cb}$	$16,1 \pm 1,2^{Aa}$	$13,1 \pm 0,7^{ABb}$	$15,5 \pm 0,8^{Aa}$	$15,0 \pm 0,9^{Aa}$	$14,8 \pm 0,7^{Aa}$	$12,3 \pm 0,7^{Ba}$	$13,6 \pm 0,5^{ABa}$	$9,8 \pm 0,4^{Ca}$	$11,0 \pm 0,9^{Ba}$
L. monocytogenes ATCC 15313	$12,0 \pm 0,9^{Ab}$	$14,1 \pm 0,5^{Aa}$	$11,0 \pm 0,8^{Ab}$	$14,6 \pm 0,6^{Aa}$	$11,3 \pm 0,5^{Aa}$	$12,1 \pm 0,5^{Ba}$	$00,0 \pm 0,0^{Ba}$	$00,0 \pm 0,0^{Ca}$	$00,0 \pm 0,0^{Ba}$	$00,0 \pm 0,0^{Ca}$
L. innocua ATCC 33090	$10,1 \pm 0,7^{Bb}$	$13,6 \pm 0,5^{Aa}$	$11,2 \pm 0,8^{Bb}$	$14,3 \pm 0,4^{Aa}$	$14,0 \pm 1,4^{Aa}$	$15,4 \pm 1,0^{Aa}$	$00,0 \pm 0,0^{Ca}$	$00,0 \pm 0,0^{Ba}$	$00,0 \pm 0,0^{Ca}$	$00,0 \pm 0,0^{Ba}$

SPMO = microcápsulas de óleo essencial de pimenta rosa com isolado proteico de soja, pectina de alta metoxilação e maltodextrina como materiais de parede. SMO = microcápsulas de óleo essencial de pimenta rosa com isolado proteico de soja e maltodextrina como materiais de parede. Dados expressos em média ± desvio padrão. Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significative ($p < 0,05$). Letras minúsculas: diferença entre as amostras SMO e SPOMO em cada período. Letras maiúsculas: diferença entre uma mesma amostra em diferentes períodos.

Em estudo realizado por Wang et al. (2019), também foi observado melhores resultados de inibição para microcápsulas de dupla camada. Os autores produziram microcápsulas de citral em *spray dryer* utilizando apenas caseinato de sódio como estabilizante em uma formulação e caseinato de sódio e pectina em outra formulação. Em ensaios realizados com a bactéria gram-positiva *Kocuria rhizophila,* foram obtidos halos de inibição variando de 19,2 a 25,7 mm para microcápsulas de citral estabilizadas apenas por caseinato de sódio e halos de inibição variando de 21,8 a 32,5 mm para microcápsulas de citral estabilizadas por caseinato de sódio e pectina.

A partir do 60º dia as microcápsulas de óleo essencial de pimenta rosa não apresentaram atividade inibitória para *L. monocytogenes* e *L. inoccua*. Uma hipótese para esse resultado observado é a perda por volatilização de compostos que agiam diretamente na inibição dessas espécies de microrganismos. Embora a atividade antimicrobiana de óleos essenciais seja relacionada aos seus compostos majoritários, evidencias na literatura apontam que a ação inibitória desses óleos sobre microrganismo não se limita apenas aos compostos em maiores quantidades, mas também das suas interações sinérgicas com os compostos minoritários presentes (HYLDGAARD et al., 2012) e que podem se perder mais rapidamente.

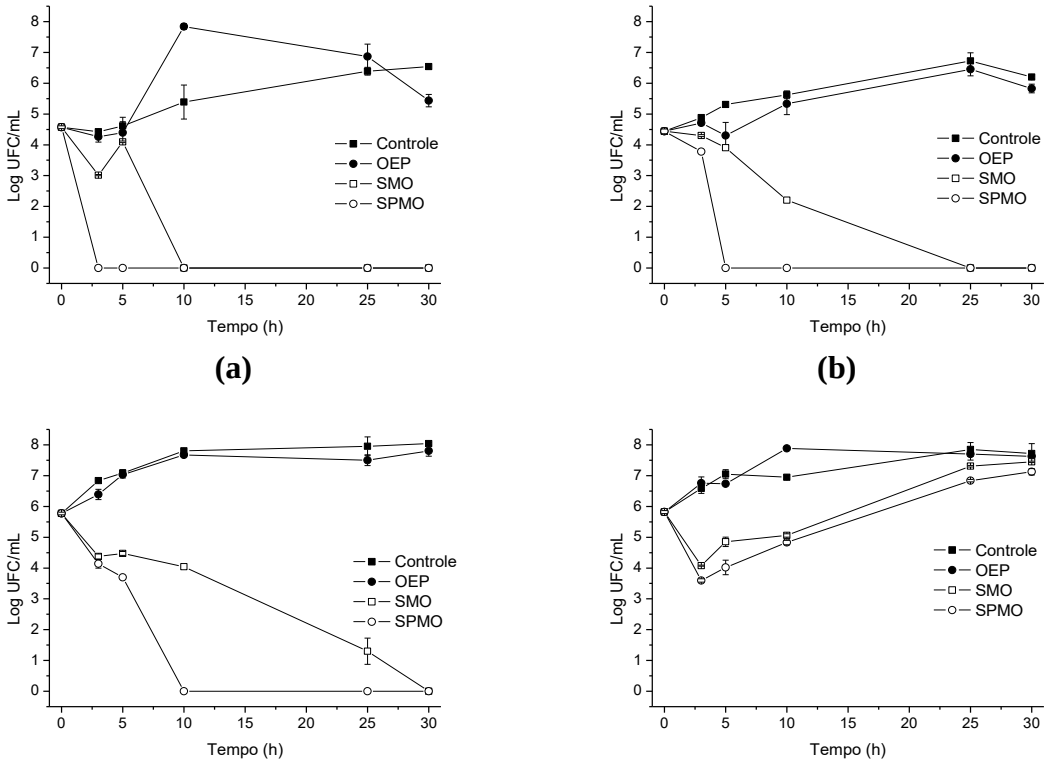
5.4.2 Efeito inibidor do crescimento bacteriano em leite

A Figura 12 apresenta o crescimento de duas bactérias a 37 ºC, *S. aureus* e *L. monocytogenes*, utilizando-se dois sistemas modelo: leite integral e desnatado. Foi incubada uma amostra controle (sem nenhum tratamento), duas amostras tratadas com as microcápsulas de óleo essencial de pimenta rosa, SMO e SPMO, diluídas no leite na proporção 1:10 (m/m) e uma última amostra contendo o óleo essencial puro. Com o intuito de comparar o efeito inibidor do óleo essencial puro, a mesma proporção de óleo contido nas microcápsulas foi utilizada, com base em resultados de retenção total de óleo apresentados anteriormente.

Para os dois tipos de leite, o óleo essencial livre não apresentou resultados de inibição para as bactérias avaliadas, mostrando um perfil de crescimento semelhante ao controle. Já as microcápsulas apresentaram resultados satisfatórios de inibição do crescimento microbiano, em especial a microcápsula de dupla camada (SPMO) que em poucas horas após a contaminação (3 - 10 h) conseguiu reduzir aos níveis mínimos de detecção da técnica o crescimento de *S. aureus* (nos dois tipos de leite) e de *L. monocytogenes* (em leite desnatado), com reduções variando de 4 a 6 Log UFC/mL da população bacteriana. Para o leite integral contaminado com *L. monocytogenes*, houve um efeito inibidor das microcápsulas nas primeiras horas após a

contaminação, com uma redução na população bacteriana de 2 Log UFC/mL, seguido por um crescimento gradual até ficar próximo ao crescimento dos tratamentos OEP e controle ao fim das 30 horas avaliadas.

Figura 12 - Crescimento de *S. aureus* ATCC 6538 em leite desnatado (a) ou integral (b) e de *L. monocytogenes* ATCC 15313 em leite desnatado (c) ou integral (d) a 37°C.



Controle (■): leite contaminado com microorganismo; OEP (●): leite contaminado com microorganismo e tratado com óleo essencial puro; SMO (○): leite contaminado com microorganismo e tratado com microcapsulas de camada única; SPMO (□): leite contaminado com microorganismo e tratado com microcápsulas de camada dupla. Cada ponto representa a média ± desvio padrão de três experimentos independentes.
Fonte: AUTOR, 2020.

Os resultados obtidos para o óleo essencial puro podem ser explicados pela interação com os outros componentes presentes nos alimentos (carboidratos, proteínas, lipídeos, etc.), o que torna a sua biodisponibilidade reduzida para atuar como inibidor do crescimento microbiano. Dessa forma, a microencapsulação protege o óleo essencial, uma vez que a barreira formada pelos materiais de parede evita a interação com os componentes presentes no alimento, tornando-o mais disponível para desempenhar sua função como agente de preservação

(CASTRO-ROSAS et al., 2017). De forma geral, pode-se observar ainda que melhores resultados de inibição foram obtidos para o leite desnatado, o que sugere que a maior parte das interações que tornam o óleo essencial menos disponível para atuar como bioconservante são interações do óleo essencial com outros lipídios do modelo.

As microcápsulas de camada dupla, com a interação proteína-pectina, se mostraram ainda mais eficazes em inibir o crescimento microbiano em menor tempo, nos dois tipos de leite. Este fato pode ser atribuído a aspectos já discutidos anteriormente, como a maior retenção dos compostos voláteis apresentada por está estrutura quando comparada com a formulação estabilizada apenas por SPI. A maior proteção atribuída a camada de revestimento da pectina pode ainda servir como uma barreira adicional à interação do material encapsulado com os componentes presentes em matrizes alimentícias, contudo mais estudos devem ser conduzidos para avaliar o comportamento da parede das microcápsulas quando adicionadas a alimentos.

6 CONCLUSÃO

O óleo essencial de pimenta rosa apresentou predominância de α-pineno, β-pineno, β-mirceno, δ-3-careno, D-limoneno e germacreno D em sua composição química. As microcápsulas de SPI/pectina apresentaram melhor preservação dos compostos voláteis após o processo de microencapsulação, enquanto as microcápsulas de camada única, estabilizadas apenas com SPI, apresentaram maior perda de voláteis após a secagem em *spray dryer*. Isto sugere que o revestimento de pectina nas partículas durante a secagem por *spray drying* permite a formação de uma camada semipermeável nas microcápsulas, influenciando a retenção mais eficaz de voláteis na matriz encapsulante de proteína-pectina. A adição de pectina afetou ainda as propriedades dos pós secos em *spray dryer* relacionadas à vida de prateleira, reconstituição, fluxo, tamanho de partícula e morfologia. Pós de SPI/pectina absorveram menos água e foram menos coesos. Ambos os pós mostraram boa solubilidade e dissolução em água e óleo. As microcápsulas se apresentaram esféricas, com ligeiras depressões e livres de rachaduras. A adição de pectina reduziu a formação de partículas e aglomerados superdimensionados, permitindo uma distribuição de tamanho de partícula mais homogênea As isotermas de sorção dos pós foram classificadas como isotermas sigmóides do tipo II, com as microcápsulas sem adição de pectina absorvendo mais água quando armazenadas em altas umidades relativas. O perfil de liberação de voláteis foi semelhante nas duas formulações nas condições de armazenamento avaliadas, sendo que ambas microcápsulas permitiram uma liberação mais gradual de voláteis, bem como uma melhor preservação de suas propriedades antioxidantes durante o armazenamento em comparação ao óleo livre. No ensaio de atividade antimicrobiana *in vitro*, as partículas de SPI/pectina apresentaram maiores halos de inibição nos primeiros dias avaliados. Quando adicionadas ao leite, ambas as formulações de microcápsulas reduziram o crescimento bacteriano para as amostras avaliadas, sendo que uma redução mais rápida do crescimento microbiano foi observada para partículas de SPI/pectina. O óleo puro apresentou um comportamento semelhante ao controle, não apresentando bons resultados de inibição, o que pode ser explicado pela interação do óleo essencial com os componentes do leite, tornando-o menos biodisponível, enquanto que no caso das microcápsulas, a parede formada pelos biopolímeros diminuiu a interação do óleo com os demais componentes do leite, aumentando sua bioatividade. De forma geral, a adição de pectina na produção das microcápsulas se mostrou uma estratégia de reforço eficaz, melhorando resultados de propriedades físico-químicas, de estabilidade ao armazenamento e de atividade antimicrobiana do óleo encapsulado e destacando o potencial de aplicação dessas partículas como um bioconservante em alimentos.

7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Para trabalhos futuros a serem desenvolvidos na área de microencapsulação de óleos essenciais por *spray drying*, as seguintes sugestões são apresentadas:

- Avaliação da composição de voláteis presentes em microcápsulas produzidas em *spray drying* utilizando-se temperaturas de secagem superiores à temperatura utilizada neste trabalho (140ºC);
- Investigar a estabilidade dos voláteis presentes no óleo essencial utilizando diferentes temperaturas e umidades relativas, além de avaliar a estabilidade oxidativa das microcápsulas na presença de luz;
- Determinar a concentração mínima inibitória de microcápsulas de óleo essencial para inibição de crescimento dos principais microrganismos patogênicos e deteriorantes em alimentos.

REFERÊNCIAS

ABDOU, R.; SALEH, S.; KHALIL, W. Toxicological and biochemical studies on Schinus terebinthifolius concerning its curative and hepatoprotective effects against carbon tetrachloride-induced liver injury. **Pharmacognosy Magazine**, v. 11, n. 42, p. 93, 2015.

ABERKANE, L.; ROUDAUT, G.; SAUREL, R. Encapsulation and Oxidative Stability of PUFA-Rich Oil Microencapsulated by Spray Drying Using Pea Protein and Pectin. **Food Bioprocess Technology**, v. 7, n. 5, p. 1505–1517, 2014.

AFFONSO, C. R. G.; FERNANDES, R. M.; OLIVEIRA, J. M. G.; MARTINS, M. C. C.; LIMA, S. G.; JÚNIOR, G. R. S.; MORENO FERNANDES, M. Z. L. C.; ZANINI, S. F. Effects of the Essential Oil from Fruits of *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae) on Reproductive Functions in Male Rats. **Journal of the Brazillian Chemical Society**, v. 23, n. 1, p. 180 – 185, 2012.

AL-ZOREKY, N. S.; AL-TAHER, A. Y. In vitro and in situ inhibition of some food-borne pathogens by essential oils from date palm (Phoenix dactylifera L.) spathe. **International Journal of Food Microbiology**, v. 299, p. 64 – 70, 2019.

ALBANO, K. M.; CAVALLIERI, Â. L. F.; NICOLETTI, V. R. Electrostatic interaction between proteins and polysaccharides: Physicochemical aspects and applications in emulsion stabilization. **Food Reviews International**, v. 35, n. 1, p. 54–89, 2019.

ALBANO, K. M.; NICOLETTI, V. R. Ultrasound impact on whey protein concentrate-pectin complexes and in the O/W emulsions with low oil soybean content stabilization. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 41, p. 562–571, 2018.

ALVARENGA BOTREL, D.; VILELA BORGES, S.; VICTÓRIA DE BARROS FERNANDES, R.; DANTAS VIANA, A.; MARIA GOMES DA COSTA, J.; REGINALDO MARQUES, G. Evaluation of spray drying conditions on properties of microencapsulated oregano essential oil. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 47, n. 11, p. 2289 – 2296, 2012.

ANDRADE, K. S.; PONCELET, D.; FERREIRA, S. R. S. Sustainable extraction and encapsulation of pink pepper oil. **Journal of Food Engineering**, v. 204, p. 38 – 45, 2017.

AOAC. **Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists**. 15. ed. Arlington, VA: Association of Official Analytical Chemists, 1990.

ASBAHANI, A. El; MILADI, K.; BADRI, W.; SALA, M.; ADDI, E. H. A.; CASABIANCA, H.; MOUSADIK, A. El; 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.

ASCHERI, D. P. R.; ASCHERI, J. L. R.; CARVALHO, C. W. P. De. Caracterização da farinha de bagaço de jabuticaba e propriedades funcionais dos extrusados. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 4, p. 897 – 905, 2006.

ASENSIO, C. M.; PAREDES, A. J.; MARTIN, M. P.; ALLEMANDI, D. A.; NEPOTE, V.; GROSSO, N. R. Antioxidant Stability Study of Oregano Essential Oil Microcapsules Prepared by Spray drying. **Journal of Food Science**, v. 82, n. 12, p. 2864 – 2872, 2017.

AZEREDO, H. M. C. D. **Encapsulação: Aplicação à tecnologia de Alimentos**. Alimentos e Nutrição, v. 16, n. 1, p. 89 - 97, 2005.

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, 2015.

BALLESTEROS, J. L.; TACCHINI, M.; SPAGNOLETTI, A.; GRANDINI, A.; PAGANETTO, G.; NERI, L. M.; MARENGO, A.; ANGIOLELLA, L.; GUERRINI, A.; SACCHETTI, G. Rediscovering medicinal Amazonian aromatic plants: Piper carpunya (Piperaceae) essential oil as paradigmatic study. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2019, 2019.

BARBOSA, M. I. M. J.; BORSARELLI, C. D.; MERCADANTE, A. Z. Light stability of spray-dried bixin encapsulated with different edible polysaccharide preparations. **Food Research International**, v. 38, n. 8–9, p. 989 – 994, 2005.

BECK-BROICHSITTER, M.; RUPPERT, C.; SCHMEHL, T.; GUENTHER, A.; BETZ, T.; BAKOWSKY, U.; SEEGER, W.; KISSEL, T.; GESSLER, T. Biophysical investigation of pulmonary surfactant surface properties upon contact with polymeric nanoparticles in vitro. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 7, n. 3, p. 341 - 350, 2011.

BEHR, A.; JOHNEN, L. Myrcene as a natural base chemical in sustainable chemistry: A critical review. **ChemSusChem**, v. 2, n. 12, p. 1072 – 1095, 2009.

BENDAOUD, H.; ROMDHANE, M.; SOUCHARD, J. P.; CAZAUX, S.; BOUAJILA, J. Chemical Composition and Anticancer and Antioxidant Activities of Schinus Molle L. and Schinus Terebinthifolius Raddi Berries Essential Oils. **Journal of Food Science**, v. 75, n. 6, 2010.

BÖRJESSON, E.; INNINGS, F.; TRÄGÅRDH, C.; BERGENSTÅHL, B.; PAULSSON, M. The dissolution behavior of individual powder particles. **Dairy Science & Technology**, v. 93, n. 4–5, p. 357–371, 2013.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Doenças transmitidas por alimentos: causas, sintomas, tratamento e prevenção**. Brasília, DF. Disponível em: http://www.saude.gov.br/saude-de-a-z/doencas-transmitidas-por-alimentos. Acesso em: 07 de Dez de 2019.

BRUNAUER, S.; DEMING, L. S.; DEMING, W. E.; TELLER, E. On a Theory of the van der Waals Adsorption of Gases. **Journal of the American Chemical Society**, v. 62, n. 7, p. 1723–1732, 1940.

BURGOS-DÍAZ, C.; HERNÁNDEZ, X.; WANDERSLEBEN, T.; BARAHONA, T.;

MEDINA, C.; QUIROZ, A.; RUBILAR, M. Influence of multilayer O/W emulsions stabilized by proteins from a novel lupin variety AluProt-CGNA and ionic polysaccharides on D-limonene retention during spray drying. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 536, p. 234 – 241, 2018.

BUCKINGHAM, J. **Dictionary of Natural Products**, v. 10, Chapman & Hall/CRC, England, 1996.

CAI, Y. Z., & CORKE, H. Production and properties of spray-dried Amaranthus betacyanin pigments. **Journal of Food Science**, v. 65, n. 7, p. 1248 – 1252, 2000.

CAIRO, P. L. G.; GOIS, F. D.; SBARDELLA, M.; SILVEIRA, H.; OLIVEIRA, R. M.; ALLAMAN, I. B.; CANTARELLI, V. S.; COSTA, L. B. Effects of dietary supplementation of red pepper (*Schinus terebinthifolius* Raddi) essential oil on performance, small intestinal morphology and microbial counts of weanling pigs. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 98, p. 541-548, 2018.

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

CALVA-ESTRADA, S. J.; MENDOZA, M. R.; GARCÍA, O.; JIMÉNEZ-FERNÁNDEZ, V. M.; JIMÉNEZ, M. Microencapsulation of vanilla (Vanilla planifolia Andrews) and powder characterization. **Powder Technology**, v. 323, p. 416 – 423, 2018.

CAMPELO-FELIX, P. H.; SOUZA, H. J. B.; FIGUEIREDO, J. D. A.; DE BARROS FERNANDES, R. V.; BOTREL, D. A.; DE OLIVEIRA, C. R.; YOSHIDA, M. I.; BORGES, S. V. Prebiotic carbohydrates: Effect on reconstitution, storage, release, and antioxidant properties of lime essential oil microparticles. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 65, n. 2, p. 445 – 453, 2017.

CAMPELO, P. H.; SANCHES, E. A.; FERNANDES, R. V. de B.; BOTREL, D. A.; BORGES, S. V. Stability of lime essential oil microparticles produced with protein-carbohydrate blends. **Food Research International** , v. 105, p. 936–944, 2018.

CANO-CHAUCA, M., STRINGHETA, P.C., RAMOS, A.M., CAL-VIDAL, J. Effect of thecarriers on the microstructure of mango powder obtained by spray dry-ing and its functional characterization. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 6, p. 420 – 428, 2005.

CASTRO-ROSAS, J.; FERREIRA-GROSSO, C. R.; GÓMEZ-ALDAPA, C. A.; RANGEL-VARGAS, E.; RODRÍGUEZ-MARÍN, M. L.; GUZMÁN-ORTIZ, F. A.; FALFAN-CORTES, R. N. Recent advances in microencapsulation of natural sources of antimicrobial compounds used in food - A review. **Food Research International**, v. 102, p.575 – 587, 2017.

CHANG, C.; VARANKOVICH, N.; NICKERSON, M. T. Microencapsulation of canola oil by lentil protein isolate-based wall materials. **Food Chemistry**, v. 212, p. 264–273, 2016.

CLARKE, S. Chapter 3 - families of compounds that occur in essential oils. **Essential Chemistry for Aromatherapy**, 2ª Ed., Churchill Livingstone, Edinburgh, p. 41-77, 2008.

COMUNIAN, T. A.; FAVARO-TRINDADE, C. S. Microencapsulation using biopolymers as an alternative to produce food enhanced with phytosterols and omega-3 fatty acids: A review. **Food Hydrocolloids**, v. 61, p. 442 - 457, 2016.

COSTA, R.; MOGGRIDGE, G. D.; SARAIVA, P. M. Chemical product engineering: An emerging paradigm within chemical engineering. **Aiche Journal**, v. 52, n. 6, p. 1976 - 1986, 2006.

DAMODARAN S. Food proteins: an overview. In: DAMODARAN, S.; PARAF, A. (Ed.). **Food proteins and their applications**. New York: Marcel Dekker, Inc. 1997. 250 p.

DANNENBERG, G.; FUNCK, G. D.; MATTEI, F. J.; DA SILVA, W. P.; FIORENTINI, Â. M. Antimicrobial and antioxidant activity of essential oil from pink pepper tree (Schinus terebinthifolius Raddi) in vitro and in cheese experimentally contaminated with Listeria monocytogenes. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 36, p. 120 – 127, 2016.

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

DANNENBERG, G. da S.; FUNCK, G. D.; SILVA, W. P. Da; FIORENTINI, Â. M. Essential oil from pink pepper (Schinus terebinthifolius Raddi): Chemical composition, antibacterial activity and mechanism of action. **Food Control**, v. 95, n. April 2018, p. 115–120, 2019.

DESAI, K. G. H.; JIN, H. P. Recent Developments in Microencapsulation of Food Ingredients. **Drying Technology**, v. 23, n. 7, p. 1361-1394, 2005.

DICKINSON, E. Hydrocolloids as emulsifiers and emulsion stabilizers. **Food Hydrocolloids**, [s. l.], v. 23, n. 6, p. 1473–1482, 2009.

DICKINSON, E. **Introduction to Food Colloids**; Oxford Science Publishers: Oxford, Inglaterra, p.216, 1992

DOS SANTOS CAVALCANTI, A.; ALVES, M. de S.; DA SILVA, L. C. P.; PATROCÍNIO, D. D. S.; SANCHES, M. N.; CHAVES, D. S. de A.; DE SOUZA, M. A. A. Volatiles composition and extraction kinetics from Schinus terebinthifolius and Schinus molle leaves and fruit. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 25, n. 4, p. 356–362, 2015.

DZIEZAK, J. D. *Microencapsulation* and *Encapsulation Ingredients*. *Food Technology*, *v. 2*, n. *4*, *p. 136-151, 1988.*

E. TSAMI, G. K. VAGENAS, D. M.-K. Moisture Sorption Isotherms of Pectins. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 16, n. 3, p. 151 – 161, 1992.

EL-TINAY, A. H., & ISMAIL, I. A. Effect of some additives and processes on the characteristics of agglomerated and granulated spray-dried Roselle powder. **Acta Alimentaria Hungaricae**, v. 14, p. 283–295, 1985.

EVANS, M.; RATCLIFFE, I.; WILLIAMS, P. A. Emulsion stabilisation using polysaccharide-protein complexes. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 18, n. 4, p. 272–282, 2013.

FAVARO-TRINDADE, C. S.; SANTANA, A. S.; MONTERREY-QUINTERO, E. S.; TRINDADE, M. A.; NETTO, F. M. The use of spray drying technology to reduce bitter taste of casein hydrolysate. **Food Hydrocolloids**, v. 24, n. 4, p. 336 – 340, 2010.

FENNEMA, O. R.; , PARKIN, S. D. K. **Fennema's Food Chemistry**. 4. ed. Bosa Roca, United States: Taylor & Francis Inc, 2007.

FERNANDES, R. V. de B.; BORGES, S. V.; BOTREL, D. A. Influence of spray drying operating conditions on microencapsulated rosemary essential oil properties. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 33, p. 171–178, 2013.

FERNANDES, R. V de B..; MARQUES, G. R.; BORGES, S. V.; BOTREL, D. A. Effect of solids content and oil load on the microencapsulation process of rosemary essential oil. **Industrial Crops and Products**, v. 58, p. 173–181, 2014.

FIORAMONTI, S. A.; STEPANIC, E. M.; TIBALDO, A. M.; PAVÓN, Y. L.; SANTIAGO, L. G. Spray dried flaxseed oil powdered microcapsules obtained using milk whey proteins-alginate double layer emulsions. **Food Research International**, v. 119, n. September 2018, p. 931–940, 2019.

FITZPATRICK, J. J.; IQBAL, T.; DELANEY, C.; TWOMEY, T.; KEOGH, M. K. Effect of powder properties and storage conditions on the flowability of milk powders with different fat contents. **Journal of Food Engineering**, v. 64, n. 4, p. 435 – 444, 2004.

FREITAS, M. L. F.; ALBANO, K. M.; TELIS, V. R. N. Characterization of biopolymers and soy protein isolate-high-methoxyl pectin complex. **Polímeros**, v. 27, n. 1, p. 62–67, 2017.

GALET, L.; VU, T. O.; OULAHNA, D.; FAGES, J. The wetting behaviour and dispersion rate of cocoa powder in water. **Food and Bioproducts Processing**, v. 82, n. December, p. 298–303, 2004.

GARCIA-SOTELO, D.; SILVA-ESPINOZA, B.; PEREZ-TELLO, M.; OLIVAS, I.; ALVAREZ-PARRILLA, E.; GONZÁLEZ-AGUILAR, G. A.; AYALA-ZAVALA, J. F. Antimicrobial activity and thermal stability of rosemary essential oil:β−cyclodextrin capsules applied in tomato juice. **LWT - Food Science and Technology**, v. 111, n. April, p. 837–845, 2019.

GHARSALLAOUI, A.; ROUDAUT, G.; BENEY, L.; CHAMBIN, O.; VOILLEY, A.; SAUREL, R. Properties of spray-dried food flavours microencapsulated with two-layered membranes: Roles of interfacial interactions and water. **Food Chemistry**, v. 132, n. 4, p. 1713–1720, 2012.

GHARSALLAOUI, A.; ROUDAUT, G.; CHAMBIN, O.; VOILLEY, A.; SAUREL, R. Applications of spray drying in microencapsulation of food ingredients: An overview. **Food Research International**, v. 40, n. 9, p. 1107–1121, 2007.

GRANDVIEW-RESEARCH. **Essential Oil Market Analysis By Product (Orange, Corn Mint, Eucalyptus, Citronella, Peppermint, Lemon, Clove Leaf, Lime, Spearmint), By Application (Medical, Food & Beverage, Spa & Relaxation, Cleaning & Home) And Segment Forecasts To 2025.** Grand View Research, San Francisco, EUA, Fevereiro de 2019. Disponível em: https://www.grandviewresearch.com/press-release/global-essential-oil-market. Acesso em: 15 de Abril de 2019.

GOIS, F. D.; SBARDELLA, M.; LIMA, C. B.; MIGOTTO, D. L.; CAIRO, P. G.; GARBOSSA, C. A. P.; RACANICCI, A. M. C.; COSTA, L. B. Dietary Brazilian red pepper essential oil on pork meat quality and lipid oxidation. **Ciência Rural**, v. 47, n. 2, p. 1 – 7, 2017.

GONZÁLEZ, A.; MARTÍNEZ, M. L.; PAREDES, A. J.; LEÓN, A. E.; RIBOTTA, P. D. Study of the preparation process and variation of wall components in chia (Salvia hispanica L.) oil microencapsulation. **Powder Technology**, v. 301, p. 868–875, 2016.

HLA, P.; HOGEKAMP, S. Wetting behaviour of instantized cocoa beverage powders. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 34, n. 4, p. 335–342, 2003.

HYLDGAARD, M.; MYGIND, T.; MEYER, R. L. Essential oils in food preservation: Mode of action, synergies, and interactions with food matrix components. **Frontiers in Microbiology**, v. 3, n. JAN, p. 1–24, 2012.

J. Y. CHEN M. PIVA T. P. LABUZA. Evaluation of Water Binding Capacity (WBC) of Food Fiber Sources. **Journal of Food Science**, v. 49, n. 1, p. 59 – 63, 1984.

JAFARI, S. M.; ASSADPOOR, E.; HE, Y.; BHANDARI, B. Encapsulation efficiency of food flavours and oils during spray drying. **Drying Technology**, v. 26, n. 7, p. 816 – 835, 2008.

JAFARI, S. M.; HE, Y.; BHANDARI, B. Optimization of nano-emulsions production by microfluidization. **European Food Research and Technology**, v. 225, n. 5–6, p. 733–741, 2007

JAFARI, S. M.; HE, Y.; BHANDARI, B. Encapsulation of Nanoparticles of d-Limonene by Spray Drying: Role of Emulsifiers and Emulsifying Techniques. **Drying Technology**, v. 25, n. 6, p. 1069–1079, 2007. b.

JAMES F. STEFFE. **Rheological Methods on Food Process Enginnering**. East Lansing, MI. USA: Freeman Press, 1996.

JARAMILLO, D. P.; ROBERTS, R. F.; COUPLAND, J. N. Effect of pH on the properties of soy protein-pectin complexes. **Food Research International**, v. 44, n. 4, p. 911–916, 2011.

JAYASUNDERA, M.; ADHIKARI, B.; HOWES, T.; ALDRED, P. Surface protein coverage and its implications on spray drying of model sugar-rich foods: Solubility, powder production and characterisation. **Food Chemistry**, v. 128, n. 4, p. 1003–1016, 2011.

JINAPONG, N.; SUPHANTHARIKA, M.; JAMNONG, P. Production of instant soymilk powders by ultrafiltration, spray drying and fluidized bed agglomeration. **Journal of Food Engineering**, v. 84, n. 2, p. 194–205, 2008.

JUAREZ-ENRIQUEZ, E.; OLIVAS, G. I.; ORTEGA-RIVAS, E.; ZAMUDIO-FLORES, P. B.; PEREZ-VEGA, S. Water activity , not moisture content , explains the in fl uence of water on powder fl owability. **LWT - Food Science and Technology**, v. 100, n. August 2018, p. 35–39, 2019.

KACI, M.; ARAB-TEHRANY, E.; DESJARDINS, I.; BANON-DESOBRY, S.; DESOBRY, S. Emulsifier free emulsion: Comparative study between a new high frequency ultrasound process and standard emulsification processes. **Journal of Food Engineering**, v. 196, p. 109-118, 2017.

KHALIL, W.; ABDOU, R.; SALEH, S. Toxicological and biochemical studies on Schinus terebinthifolius concerning its curative and hepatoprotective effects against carbon tetrachloride-induced liver injury. **Pharmacognosy Magazine**, v. 11, n. 42, p. 93, 2015.

KOÇ, G. Ç.; DIRIM, S. N. Spray dried spinach juice: powder properties. **Journal of Food Measurement and Characterization**, v. 12, n. 3, p. 1654–1668, 2018.

KRAKER, J. W.; FRANSSEN, M. C. R.; DE GROOT, A.; KÖNIG, W. A.; BOUWMEESTER, H. J. (+)-Germacrene A biosynthesis - The committed step in the biosynthesis of bitter sesquiterpene lactones in chicory. **Plant Physiology**, v. 117, n. 4, p. 1381–1392, 1998.

KROKIDA, M. K.; MAROULIS, Z. B. Effect of drying method on shrinkage and porosity. **Drying Technology**, v. 15, n. 10, p. 2441–2458, 1997.

KUCK, L. S.; NOREÑA, C. P. Z. Microencapsulation of grape (Vitis labrusca var. Bordo) skin phenolic extract using gum Arabic, polydextrose, and partially hydrolyzed guar gum as encapsulating agents. **Food Chemistry**, v. 194, p. 569–576, 2016.

KUHN, K.R.; PICONE, C.S.F.; CUNHA, R.L. **Food Gels**. In: Biopolymer Engineering in Food Processing, TELIS, V.R.N., Ed.; CRC Press: New York, US., p. 111–144. 398 p., 2012.

LAKKIS, J. M. **Confectionary products as delivery systems for flavor, health and oral-care actives**. In: LAKKIS, J. M. Encapsulation and Controlled Release. Technologies in Food Systems. Blackwell Publishing, 2007. Cap. 8. p. 171-200.

LAM, M.; SHEN, R.; PAULSEN, P.; CORREDIG, M. Pectin stabilization of soy protein isolates at low pH. **Food Research International**, v. 40, n. 1, p. 101–110, 2007.

LAZGHAB, M.; SALEH, K.; PEZRON, I.; GUIGON, P.; KOMUNJER, L. Wettability assessment of finely divided solids. **Powder Technology**, v. 157, p. 79–91, 2005.

LOPES, N. A.; BARRETO PINILLA, C. M.; BRANDELLI, A. Antimicrobial activity of lysozyme-nisin co-encapsulated in liposomes coated with polysaccharides. **Food Hydrocolloids**, v. 93, p. 1–9, 2019.

LORENZI, H., MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil**. 2. ed. São Paulo: Nova Odessa, Instituto Plantarum, 2008.

LUQUE DE CASTRO, M. D.; JIMÉNEZ-CARMONA, M. M.; FERNÁNDEZ-PÉREZ, V. Towards more rational techniques for the isolation of valuable essential oils from plants. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 18, n. 11, p. 708–716, 1999.

MARESCA, D.; DE PRISCO, A.; LA STORIA, A.; CIRILLO, T.; ESPOSITO, F.; MAURIELLO, G. Microencapsulation of nisin in alginate beads by vibrating technology: Preliminary investigation. **LWT - Food Science and Technology**, v. 66, p. 436–443, 2016.

MÁRQUEZ-GÓMEZ, M.; GALICIA-GARCÍA, T.; MÁRQUEZ-MELÉNDEZ, R.; RUIZ-GUTIÉRREZ, M.; QUINTERO-RAMOS, A. Spray-dried microencapsulation of orange essential oil using modified rice starch as wall material. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 42, n. 2, 2018.

MARTINS, M. R.; ARANTES, S. CANDEIAS, F.; TINOCO, M. T.; CRUZ-MORAIS, J. Antioxidant, antimicrobial and toxicological properties of *Schinus molle L*. essential oils. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 151, p. 485–492, 2014.

MARTINS, P.; SBAITE, P.; BENITES, C.; MACIEL, M. Thermal characterization of orange, lemongrass, and basil essential oils. **Chemical Engineering Transactions**, v. 24, p. 463–468, 2011.

MASSARO SOUSA, L.; FERREIRA, M. C. Spent coffee grounds as a renewable source of energy: An analysis of bulk powder flowability. **Particuology**, v. 43, p. 92–100, 2019.

MELO-ESPINOSA, E. A.; SÁNCHEZ-BORROTO, Y.; ERRASTI, M.; PILOTO-RODRÍGUEZ, R.; SIERENS, R.; ROGER-RIBA, J.; CHRISTOPHER-HANSEN, A. Surface tension prediction of vegetable oils using artificial neural networks and multiple linear regression. **Energy Procedia**, v. 57, p. 886–895, 2014.

MOSER, P.; NICOLLETI, V. R.; BRUECKNER-GUEHMANN, M; DRUSCH, S. Microencapsulation of buriti oil using chickpea protein-pectin and oxidative stability. In: XXII Congresso Brasileiro de Engenharia Química, 2018, **Anais**.. São Paulo, 2018.

MOSER, P.; SOUZA, R. T. De; NICOLETTI TELIS, V. R. Spray Drying of Grape Juice From Hybrid CV. BRS Violeta: Microencapsulation of Anthocyanins Using Protein/Maltodextrin Blends as Drying Aids. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 41, n. 1, 2017.

NOCCHI, S. R.; MOURA-COSTA, G. F.; NOVELLO, C. R.; RODRIGUES, J.; LONGHINI, R.; MELLO, J. C. P.; FILHO, B. P. D.; NAKAMURA, C. V.; UEDA-NAKAMURA, T. *In vitro* cytotoxicity and anti-herpes simplex virus type 1 activity of hydroethanolic extract, fractions, and isolated compounds from stem bark of *Schinus terebinthifolius* Raddi. **Pharmacognosy Magazine**, v. 12, n. 46, p. 160 – 164, 2017.

PEREIRA, E. M. R.; GOMES, R. T.; FREIRE, N. R.; AGUIAR, E. G.; BRANDÃO, M. G. L.; SANTOS, V. R. In vitro Antimicrobial Activity of Brazilian Medicinal Plant Extracts against Pathogenic Microorganisms of Interest to Dentistry. **Planta Medica**, v. 77, p. 401-404, 2011.

PEREIRA SOUZA, A. C.; DEYSE GURAK, P.; DAMASCENO FERREIRA MARCZAK, L. Maltodextrin, pectin and soy protein isolate as carrier agents in the encapsulation of anthocyanins-rich extract from jaboticaba pomace. **Food and Bioproducts Processing**, v. 102, p. 186–194, 2017.

POURASHOURI, P.; SHABANPOUR, B.; RAZAVI, S. H.; JAFARI, S. M.; SHABANI, A.; AUBOURG, S. P. Impact of Wall Materials on Physicochemical Properties of Microencapsulated Fish Oil by Spray Drying. **Food and Bioprocess Technology**, v. 7, n. 8, p. 2354–2365, 2014.

QUIRIJNS, E. J.; VAN BOXTEL, A. J.; VAN LOON, W. K.; VAN STRATEN, G. Sorption isotherms, GAB parameters and isosteric heat of sorption. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 85, n. 11, p. 1805–1814, 2005.

RAMAKRISHNAN, Y.; ADZAHAN, N. M.; YUSOF, Y. A.; MUHAMMAD, K. Effect of wall materials on the spray drying efficiency, powder properties and stability of bioactive compounds in tamarillo juice microencapsulation. **Powder Technology**, v. 328, p. 406–414, 2018.

RÉ, M. I. Microcapsulation by spray drying. **Drying Technology**, v. 16, n. 6, p. 1195–1236, 1998.

ROCHA, J. de C. G.; DE BARROS, F. A. R.; PERRONE, Í. T.; VIANA, K. W. C.; TAVARES, G. M.; STEPHANI, R.; STRINGHETA, P. C. Microencapsulation by atomization of the mixture of phenolic extracts. **Powder Technology**, v. 343, p. 317–325, 2019.

ROMANI, V. P.; HERNÁNDEZ, C. P.; MARTINS, V. G. Pink pepper phenolic compounds incorporation in starch/protein blends and its potential to inhibit apple browning. **Food Packaging and Shelf Life**, v. 15, n. February 2017, p. 151–158, 2018.

SANTANA, A. A.; OLIVEIRA, R. A. De; PINEDO, A. A.; KUROZAWA, L. E.; PARK, K. J. Microencapsulation of babassu coconut milk. **Food Science and Technology**, v. 33, n. 4, p. 737–744, 2013.

SARAMAGO, J. **Todos os nomes.** 2. ed. São Paulo: Companhia das Letras, 2017.

SERFERT, Y.; SCHRÖDER, J.; MESCHER, A.; LAACKMANN, J.; SHAIKH, M. Q.; RÄTZKE, K.; GAUKEL, V.; SCHUCHMANN, H. P.; WALZEL, P.; MORITZ, H.-U.; DRUSCH, S.; SCHWARZ, K. Characterization of the spray drying behaviour of emulsions containing oil droplets with a structured interface. **Journal of Microencapsulation**, v. 30, n. 4, p. 325–334, 2013.

SERENIKI, A.; LINARD-MEDEIROS, C. F. B.; SILVA, S. N.; SILVA, J. B. R.; SOBRINHO, T. J. S. P.; SILVA, J. R.; ALVES, L. D. S.; SMAILI, S. S.; WANDERLEY, A. G.; LAFAYETTE, S. S. L. Schinus terebinthifolius administration prevented behavioral and

biochemical alterations in a rotenone model of Parkinson's disease. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 26, p. 240-245, 2016.

SHAH, R. B.; TAWAKKUL, M. A.; KHAN, M. A. Comparative Evaluation of Flow for Pharmaceutical Powders and Granules. **AAPS PharmSciTech**, v. 9, n. 1, p. 250–258, 2008.

SILVA, M. T.; BORGES, L. L.; FIUZA, T. de S.; TRESVENZOL, L. M. F.; DA CONCEIÇÃO, E. C.; BATISTA, C. R.; MATOS, C. B.; DA VEIGA JÚNIOR, V. F.; MOURÃO, R. H. V.; FERRI, P. H.; DE PAULA, J. R. Viscosity of the Oil-resins and Chemical Composition of the Essential Oils from Oils-resins of Copaifera multijuga Hayne Growing in the National Forest Saracá-Taquera Brazil. **Journal of Essential Oil-Bearing Plants**, v. 20, n. 5, p. 1226–1234, 2017.

SIGRIST, S. R. Aroeira. **Plantas medicinais**, São Paulo, 18 nov. 2014. Disponível em: <http://ci-67.ciagri.usp.br/pm/ver_1pl.asp?f_cod=13>. Acesso em: 24 de Fevereiro de 2018.

SINGH, M.; MOHAMED, A. Influence of gluten-soy protein blends on the quality of reduced carbohydrates cookies. **LWT - Food Science and Technology**, v. 40, n. 2, p. 353–360, 2007.

SINGH, P.; KUMAR, R.; SABAPATHY, S. N.; BAWA, A. S. Functional and Edible Uses of Soy Protein Products. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 7, n. 1, p. 14–28, 2008.

SOUZA, H. J. B.; DE OLIVEIRA, C. R.; FERNANDES, R. V. de B.; BORGES, S. V.; DA SILVA, Y. F.; SILVA, E. K.; DO CARMO, E. L.; BOTREL, D. A.; YOSHIDA, M. I. Study of ultrasound-assisted emulsions on microencapsulation of ginger essential oil by spray drying. **Industrial Crops and Products**, v. 94, p. 413–423, 2016.

SUAVE, J.; DALL'AGNOL, E. C. ; PEZZIN, A. P. T. ; SILVA, D. A. K. ;MEIER, M. M. ; SOLDI, V. Microencapsulação: Inovação em diferentes áreas. **Revista Saúde e Ambiente**, 2006.

SUN, X.; CAMERON, R. G.; BAI, J. Microencapsulation and antimicrobial activity of carvacrol in a pectin-alginate matrix. **Food Hydrocolloids**, v. 92, n. December 2018, p. 69–73, 2019.

SVOBODA, K. P.; GREENAWAY, R. I. Investigation of volatile oil glands of *Satureja hortensis* L. (summer savory) and phytochemical comparison of different varieties. **The International Journal of Aromatherapy**, v. 13, n. 4, p. 196-202, 2003.

SZULC, K.; LENART, A. Effect of composition on physical properties of food powders. **International Agrophysics**, v. 30, n. 2, p. 237–243, 2016.

TAK, J. H.; ISMAN, M. B. Enhanced cuticular penetration as the mechanism for synergy of insecticidal constituents of rosemary essential oil in Trichoplusia ni. **Scientific Reports**, v. 5, n. April, p. 1–10, 2015.

TEODORO, R. A. R.; DE BARROS FERNANDES, R. V.; BOTREL, D. A.; BORGES, S. V.;

DE SOUZA, A. U. Characterization of Microencapsulated Rosemary Essential Oil and Its Antimicrobial Effect on Fresh Dough. **Food Bioprocess Technology**, v. 7, n. 9, p. 2560–2569, 2014.

TEODORO, R. A. R.; DO CARMO, E. L.; BORGES, S. V.; BOTREL, D. A.; MARQUES, G. R.; CAMPELO-FELIX, P. H.; SILVA, E. K.; FERNANDES, R. V. de B. Effects of ultrasonication on the characteristics of emulsions and microparticles containing Indian clove essential oil. **Drying Technology**, v. 37, n. 9, p. 1162–1172, 2018.

TIMILSENA, Y. P.; ADHIKARI, R.; BARROW, C. J.; ADHIKARI, B. Microencapsulation of chia seed oil using chia seed protein isolate-chia seed gum complex coacervates. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 91, p. 347-357, 2016.

TIVERON, A. P. **Atividade antioxidante e composição fenólica de legumes e verduras consumidos no Brasil**. 2010. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010. doi:10.11606/D.11.2010.tde-20102010-101541. Acesso em: 2019-12-29.

VALIMAA, A.; TILSALA-TIMISJARVI, A.; VIRTANEN, E. Rapid detection and identification methods for Listeria monocytogenes in the food chain – A review. **Food Control**. 55, 103–114, 2015.

VEIGA, R. D. S. Da; APARECIDA DA SILVA-BUZANELLO, R.; CORSO, M. P.; CANAN, C. Essential oils microencapsulated obtained by spray drying: a review. **Journal of Essential Oil Research**, v. 00, n. 00, p. 1–17, 2019.

VÉLEZ-ERAZO, E. M.; CONSOLI, L.; HUBINGER, M. D. Mono and double-layer emulsions of chia oil produced with ultrasound mediation. **Food and Bioproducts Processing**, v. 112, p. 108–118, 2018.

VORAGEN, A. G. J.; COENEN, G.-J.; VERHOEF, R. P.; SCHOLS, H. A. Pectin, a versatile polysaccharide present in plant cell walls. **Structural Chemistry**, v. 20, n. 2, p. 263–275, 2009.

XIAO, D.; DAVIDSON, P. M.; ZHONG, Q. Spray-Dried Zein Capsules with Coencapsulated Nisin and Thymol as Antimicrobial Delivery System for Enhanced Antilisterial Properties. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, n. 13, p. 7393–7404, 2011.

WALSTRA, P. **Physical Chemistry of Foods**. Marcel Dekker Inc., New York, 2003.

WANG, J.; OUSSAMA KHELISSA, S.; CHIHIB, N. E.; DUMAS, E.; GHARSALLAOUI, A. Effect of drying and interfacial membrane composition on the antimicrobial activity of emulsified citral. **Food Chemistry**, v. 298, n. December 2018, p. 1–7, 2019.

WU, Y.; ZOU, L.; MAO, J.; HUANG, J.; LIU, S. Stability and encapsulation efficiency of sulforaphane microencapsulated by spray drying. **Carbohydrate Polymers**, v. 102, n. 1, p. 497–503, 2014.

APÊNDICE A – TESTES PRELIMINARES

Para definir os parâmetros de secagem em *spray dryer* e as proporções dos materiais de parede a serem utilizadas foram conduzidos alguns testes preliminares a fim de analisar as melhores condições para a produção das microcápsulas de óleo essencial de pimenta rosa. Devido à alta volatilidade dos óleos essenciais, temperaturas mais baixas de ar de secagem foram testadas, a fim de melhor preservar os compostos ativos presentes no óleo. Temperaturas de 120ºC, 140ºC, 160ºC e 180ºC foram avaliadas. Nesses testes, utilizou-se apenas a formulação com adição de pectina, a fim de avaliar a proporção de proteína:polissacarídeo adequada para ser utilizada no preparo das emulsões, visando boas condições de secagem.

1.1 MATERIAIS E MÉTODOS

1.1.1 Materiais

Óleo essencial de frutos maduros de pimenta rosa foi extraído e fornecido pela empresa LINAX - Óleos Essenciais e Destiladores (Votuporanga, SP, Brasil). Isolados de Proteína de Soja (SPI) (Ingredientes de Tovani Benzaquen, São Paulo, SP, Brasil), Pectina de Alta Metoxilação (HMP) (CP Kelco, São Paulo, SP, Brasil) e Maltodextrina DE 10 (Get do Brasil, São João da Boa Vista, SP, Brasil) foram usados como materiais de parede.

1.1.2 Métodos

1.1.2.1 Determinação da umidade dos materiais de parede

Foram determinadas as umidades dos materiais de parede utilizados (isolado proteico de soja, pectina de alta metoxilação e maltodextrina), a fim de se descontar o peso da água presente nesses materiais no momento do preparo das emulsões. A umidade foi determinada, em triplicata, pelo método gravimétrico (AOAC, 1990) em estufa a vácuo (Marconi modelo MA 030) a 70ºC. A umidade dos materiais de parede foi calculada pela relação entre a massa de água evaporada e a massa de pó seca e expressa em porcentagem.

1.1.2.2 Testes iniciais de secagem em *spray dryer* e determinação das proporções dos materiais de parede

Nos testes iniciais, foram produzidas duas emulsões com concentrações diferentes de proteína e pectina. Na primeira emulsão utilizou-se 2% de isolado proteico de soja (SPI) e 1% de pectina de alta metoxilação (HMP) e a segunda emulsão foi produzida com 0,9% de SPI e 0,5% de HMP (em relação ao peso total da emulsão). As emulsões foram preparadas conforme descrito no item 4.2.1.1.

Após preparadas, as emulsões foram secas em *spray dryer* (modelo B-290, Buchi, Suíça) com bico atomizador de 0,7 mm de diâmetro. A pressão do compressor foi mantida em 6 bar. A taxa de alimentação da emulsão foi mantida a 2 mL/min e o fluxo do ar de secagem utilizado foi de 819 L/h e 500 L/h. A temperatura do ar de secagem foi de 180 ºC.

Uma análise qualitativa foi feita das secagens realizadas, observando-se o comportamento das emulsões dentro da câmara de secagem e as características dos pós obtidos.

1.1.2.3 Testes de secagem utilizando diferentes temperaturas

Após a definição das concentrações de SPI e HMP na emulsão e do fluxo do ar de secagem, novas secagens foram realizadas visando avaliar a influência da temperatura do ar de secagem no rendimento e na umidade dos pós. As emulsões foram preparadas conforme descrito no item 2.1.2.2 e foram secas em *spray dryer* com taxa de alimentação de 2 mL/min, fluxo do ar de secagem de 819 L/h e com temperaturas do ar de secagem de 120 ºC, 140 ºC, 160 ºC e 180 ºC.

Foram aproveitados apenas pós obtidos no pote coletor após a passagem pelo ciclone do equipamento. As amostras de pós foram armazenadas em potes plásticos revestidos com alumínio e colocadas em dessecador com sílica gel para não absorverem umidade do ambiente.

O rendimento de secagem foi calculado pela razão entre a quantidade de pó obtida no pote coletor e a massa de sólidos presentes na emulsão inicial. Foi conduzida uma secagem para cada temperatura testada. Os resultados foram expressos em porcentagem.

Para determinação da umidade utilizou-se o método gravimétrico (AOAC, 1990). As amostras de pó foram pesadas em triplicata e mantidas em estufa a vácuo (Marconi modelo MA 030) a 70 ºC até peso constante. A umidade foi determinada pela relação entre a massa de água evaporada e a massa de pó seca e expressa em porcentagem.

1.2 AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS DE SECAGEM

1.2.1 Umidade dos materiais de parede

A Tabela 1A apresenta as umidades determinadas para os três materiais de parede utilizados na produção das microcápsulas. Pode-se observar que os materiais apresentaram umidade considerável, com a pectina de alta metoxilação possuindo uma umidade de quase 10%.

Tabela 1A - Umidade dos materiais de parede utilizados na produção das microcápsulas.

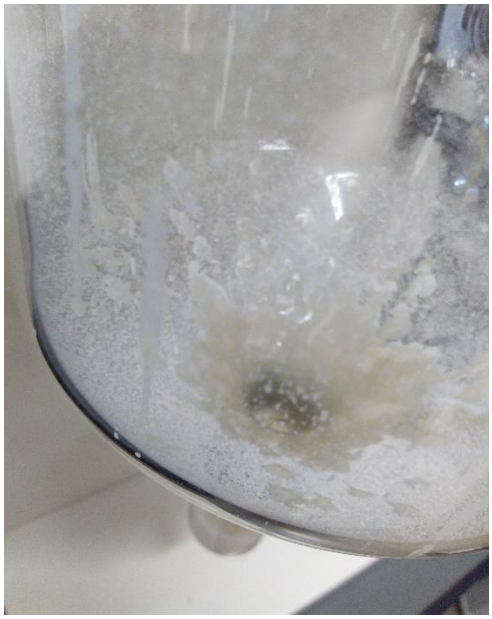
Material de parede	Umidade (b.s) (%)
Isolado proteico de soja	7,00 ± 0,12
Pectina de alta metoxilação	9,82 ± 0,09
Maltodextrina	6,28 ± 0,19

O conhecimento da umidade dos materiais de parede é importante em processos que envolvem secagem, como o *spray dryer*, para a conversão de dados em base seca e possibilitar descontar a água já existente nesses materiais no momento do preparo das emulsões, garantindo as proporções adequadas de cada componente.

1.2.2 Testes iniciais de secagem em *spray dryer* e proporções dos materiais de parede

O uso de 2% de SPI e 1% de HMP resultou uma emulsão muito viscosa e de difícil secagem no *spray dryer*. Houve maiores perdas nas paredes da câmara de secagem, formação de filmes no bico atomizador e gotejamento da amostra nos testes utilizando fluxos de ar de secagem de 500 L/h e 819 L/h (Figura 1A). Para reduzir a viscosidade da amostra e facilitar o seu bombeamento até o bico atomizador, a proporção proteína:polissacarídeo foi ajustada para 0,9% de SPI e 0,5% de HMP. A nova formulação possibilitou uma melhor secagem no equipamento, sem muitas perdas de amostra, sobretudo para um uso mais alto de fluxo de ar (819 L/h). A tabela 2A apresenta as proporções definidas para cada material utilizado no preparo das emulsões no restante do presente trabalho.

Figura 1A - Câmara de secagem com gotejamento da amostra.



Fonte: AUTOR, 2020.

Tabela 2A - Proporções dos materiais utilizados no preparo das emulsões testadas.

Materiais	**% com relação a massa total da emulsão**
Óleo Essencial de Pimenta Rosa	10
Isolado Proteico de Soja	0,9
Pectina de Alta Metoxilação	0,5
Maltodextrina	34,5
Água	54,1

1.2.3 Influência de diferentes temperaturas no rendimento de secagem e umidade dos pós

Após ajuste das proporções dos materiais de parede na emulsão efetuaram-se novas secagens em *spray dryer* a fim de avaliar a influência da temperatura na secagem. A Tabela 3A apresenta os resultados de rendimento de secagem e umidade para amostras secas a 120, 140, 160 e 180 ºC com taxa de alimentação da emulsão e fluxo do ar de secagem de 2 mL/min e 819 L/h, respectivamente.

A partir dos resultados obtidos, observou-se que as temperaturas de 140 ºC, 160 ºC e 180 ºC apresentaram bons rendimentos de secagem e de umidade dos pós. A emulsão seca a 120 ºC, no entanto, apresentou rendimento inferior (aproximadamente a metade dos demais tratamentos) e umidade superior a 5%. Segundo Peng et al. (2013), a umidade é um importante

indicador de eficiência do processo de secagem de pós alimentícios, sendo recomendado um valor inferior a 5% para a garantia de boa estabilidade físico-química do produto. Dessa forma, a secagem a 120 ºC não se mostrou satisfatória.

Tabela 3A - Rendimento e umidade dos pós secos a 120, 140, 160 e 180ºC.

Temperatura do ar de secagem (ºC)	**Rendimento de secagem (%)**	**Umidade (b.s) (%)**
120	22,40	5,84 ± 0,07
140	42,28	2,78 ± 0,13
160	40,10	2,48 ± 0,06
180	48,42	2,64 ± 0,11

Dentre os compostos químicos majoritários reportados na literatura para o óleo essencial de pimenta rosa estão o mirceno, α-pineno e limoneno, que possuem pontos de ebulição de 167 ºC, 157,9 ºC e 175,4 ºC, respectivamente (EL ASHBAHANI et al., 2015). Como os demais tratamentos apresentaram resultados semelhantes para rendimento e umidade, optou-se pelo uso da temperatura mais baixa dentre as três (140 ºC), de modo a melhor preservar as propriedades do óleo essencial durante a secagem.