

**UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ**  
**DEPARTAMENTO DE QUÍMICA**  
**CURSO DE BACHARELADO EM QUÍMICA**

**JACQUELINE DE FLORIO ALMEIDA**

**ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E MICROENCAPSULAÇÃO DE  
EXTRATO ETANÓLICO DE TOMILHO (*Thymus vulgaris* L.)**

**TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO**

**PATO BRANCO**

**2013**

JACQUELINE DE FLORIO ALMEIDA

**ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E  
MICROENCAPSULAÇÃO DE EXTRATO ETANÓLICO DE TOMILHO  
(*Thymus vulgaris L.*).**

Trabalho de Conclusão de Curso como requisito parcial para a conclusão do Curso Bacharelado em Química da UTFPR – Campus Pato Branco.

Professora Orientadora: Dr<sup>a</sup> Solange Teresinha Carpes.

Pato Branco, 2013

## TERMO DE APROVAÇÃO

O trabalho de diplomação intitulado **ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E MICROENCAPSULAÇÃO DE EXTRATO ETANÓLICO DE TOMILHO (*Thymus vulgaris L.*)** foi considerado APROVADO de acordo com a ata da banca examinadora N° **2.17/2013-B**.

Fizeram parte da banca os professores:

Prof<sup>a</sup>. Dra. Solange Teresinha Carpes

Prof<sup>a</sup>. Dra Tatiane Luiza Cadorin Oldoni

Prof<sup>a</sup>. Ma. Leila Serafini

## AGRADECIMENTOS

Antes de tudo, agradeço a Deus, pela graduação, pelas pessoas que conheci durante esta e por todas as bênçãos a mim concedidas.

Aos meus pais, Creudes e Marci, pelo apoio, amizade e amor incondicional concedido em todos os momentos de minha vida, por todo esforço despendido em minha formação, por muitas vezes abrirem mão de seus sonhos para tornar o meu realidade. Aos meus avós, Natalia (*in memoriam*), por todo amor e carinho dedicados a minha criação, e Vicente Joaquim, pelo amor e carinho, e por todos os momentos de bom humor que marcaram meus dias difíceis na graduação.

Aos meus irmãos, Douglas e Rodrigo, que sempre estiveram ao meu lado com sincera amizade, companheirismo e alegria.

Ao meu noivo, Ronaldo, pelo apoio e compreensão, por me incentivar a alcançar meus objetivos, por me amar e mostrar que sou capaz de enfrentar os maiores obstáculos.

Aos meus amigos e familiares, por me manterem forte nos momentos difíceis.

À minha amiga Giulia, por sua amizade e companheirismo em todos os momentos, desde o primeiro dia de faculdade. Sem você tudo teria sido mais difícil.

À minha amiga Nathalie, por seu carinho, amizade e apoio em todos os momentos de necessidade.

Às minhas amigas de Campo Mourão Natara Tosoni e Solange Fávaro, que pacientemente me ajudaram e contribuíram na realização deste projeto.

Ao professor Dr. Manuel Salvador Vicente Plata Oviedo, pelo apoio e dedicação durante a elaboração deste projeto.

À minha orientadora Dra. Solange Teresinha Carpes, pelo apoio, compreensão e amizade, seu empenho e dedicação foram essenciais na realização deste trabalho, onde encontrei mais que uma orientadora, encontrei uma amiga.

À professora Dra. Tatiane Luiza Cadorin Oldoni e Leila Serafini, pela gentileza e disponibilidade para ser banca deste trabalho, contribuindo com o mesmo.

À todos os meus professores do Departamento de Química, pela amizade e apoio durante os quatro anos de graduação, por transmitirem seus conhecimentos e ensinamentos com amor e dedicação.

À todos, o meu muito obrigada!

## EPÍGRAFE

*“No lugar que tem tristeza, eu vou levar alegria  
Vou levar sinceridade onde existe hipocrisia  
No lugar que tem mentira eu vou levar a verdade  
Vou levar amor sincero, onde existe falsidade (...)”*

*“Meu mestre é Deus nas alturas, o Mundo é o meu colégio (...)”*

*José Dias Nunes*

## RESUMO

A tendência atual na busca por melhores qualidades de vida, aliada a preocupação com a saúde e dieta, tem impulsionado pesquisas na busca por produtos naturais com características biológicas positivas, seja para serem utilizados como suplementos alimentares ou na substituição aos compostos sintéticos nos alimentos. Assim, torna-se necessária a utilização de produtos naturais na formulação de ingredientes com elevado valor agregado, como nos casos de produtos naturais microencapsulados. O tomilho (*Thymus vulgaris L.*) é uma erva aromática pertencente à família *Lamiaceae*, e é amplamente utilizado como condimento na culinária típica. Dentro desse contexto, este trabalho teve como objetivos avaliar os teores de compostos fenólicos totais, flavonoides totais e o potencial antioxidante do extrato hidroalcoólico de Tomilho (*Thymus vulgaris L.*), bem como produzir micropartículas por processo de atomização em *spray-drying*, utilizando mistura de maltodextrina e amido modificado como material de parede. O extrato de tomilho apresentou teor de 33,55 mg EAG.g<sup>-1</sup> para compostos fenólicos e 23,46 mg EQ.g<sup>-1</sup> para flavonoides totais. Na atividade antioxidante foram encontrados valores de 132,29 mmol trolox. g<sup>-1</sup> pelo método do sequestro do radical DPPH, 265,79 µmol de TEAC.g<sup>-1</sup> pelo método de sequestro do radical ABTS, 314,72 µmol de Fe<sup>+2</sup>.g<sup>-1</sup> pelo método do poder de redução do ferro – FRAP e 89,62 % de capacidade antioxidante na inibição da oxidação pelo método do sistema β-caroteno/ácido linoleico. O extrato de tomilho apresentou conteúdos apreciáveis de compostos fenólicos totais e flavonoides totais, e conseqüentemente boa atividade antioxidante. A microencapsulação do tomilho por *spray-drying* originou microesferas lisas, homogêneas quanto a forma e estrutura, sem fissuras ou rachaduras, e apresentou uma eficiência de 68% em relação aos compostos fenólicos, tornando o tomilho um potencial ingrediente para a aplicação industrial, um produto natural com valor agregado.

**Palavras-chave:** Compostos fenólicos, atividade antioxidante, Tomilho, microencapsulação.

## ABSTRACT

The current trend in search for better quality of life, coupled with concern about health and diet, has driven research in the search for natural products with positive biological characteristics, is to be used as food supplement or substitute the synthetic compounds in foods. Thus, it becomes necessary to use natural products in the formulation of ingredients with high added value, as in cases of microencapsulated natural products. Thyme (*Thymus vulgaris L.*) is an aromatic herb belonging to the family *Lamiaceae*, and is widely used as a spice in cooking typical. Within this context, this study aimed to evaluate the content of total phenolic compounds, total flavonoids and antioxidant potential of hydroalcoholic extract of thyme (*Thymus vulgaris L.*), as well as produce microparticles by spray – drying process, using mixture of maltodextrin and modified starch as wall material. The extract of thyme submitted content 33,55 mg EAG.g<sup>-1</sup> for phenolic compounds and 23,46 mg EQ.g<sup>-1</sup> for total flavonoids . Antioxidant activity were found values of 132,29 mmol trolox. g<sup>-1</sup> for the method to sequester DPPH , 265,79 μmol of TEAC.g<sup>-1</sup> for the method of abduction of radical ABTS , 314,72 μmol Fe<sup>+2</sup>.g<sup>-1</sup> for the method of reducing power iron - FRAP, and showed 89.62 % antioxidant capacity in inhibiting the oxidation of linoleic method for β-caroteno/ácido system. The thyme extract showed appreciable content of total phenolic compounds , total flavonoids and antioxidant activity. Microencapsulation of thyme by spray-drying yielded smooth, homogeneous microspheres as the form and structure without fissures or cracks, and showed an efficiency of 68 % compared to phenolic compounds, making thyme a potential ingredient for industrial application, a product natural with added value.

Keywords: Phenolic compounds, antioxidant activity, Thyme, microencapsulation.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Tomilho. Fonte: Jakiemiu (2008).....	15
Figura 2 - Principais constituintes do Tomilho. Fonte: Hubaib et al. (2002). ....	16
Figura 3 - Mecanismo de ação de antioxidantes primários .....	18
Figura 4 - Estrutura fenólica dos antioxidantes sintéticos. ....	19
Figura 5 – Estrutura química do fenol. Fonte: Bravo (1998).....	20
Figura 6 - Estrutura geral dos ácidos fenólicos. À esquerda, estrutura geral dos ácidos hidroxicinâmicos, e à direita, a estrutura geral dos ácidos hidroxibenzóicos. ....	21
Figura 7 - Estrutura básica dos flavonoides. ....	22
Figura 8 - Estrutura química do radical DPPH <sup>•</sup> e reação de estabilização com um antioxidante. Fonte: Moon e Shibamoto (2009).....	23
Figura 9 - Formação do radical estável com persulfato de potássio e reação com antioxidante pelo método ABTS <sup>•+</sup> .....	24
Figura 10 - Redução do complexo TPTZ, método FRAP. ....	25
Figura 11 - Estrutura beta-caroteno (5); estrutura ácido linoleico (6). ....	26
Figura 12 - Estrutura das micropartículas. ....	27
Figura 13 - Esquema básico de um spray dryer.....	29
Figura 14 - Compostos fenólicos e flavonoides totais dos EET.....	42
Figura 15 - Curva Padrão de Ácido Gálico para análise de compostos fenólicos totais.....	43
Figura 16 - Curva Padrão de quercetina para análise de compostos flavonoides totais.....	45
Figura 17 - Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) do EET.....	47
Figura 18 - Componente da emulsão Maltodextrina e Capsul. ....	53
Figura 19 - Emulsão Homogeneizada em Ultraturax (Tomilho - Maltodextrina - Capsul).....	54
Figura 20 - Spray Dryer utilizado para microencapsulação da amostra de tomilho...55	
Figura 21 - Tomilho, após secagem, produzido por <i>spray drying</i> .....	57
Figura 22 - Micrografias das partículas de pó proveniente de extrato de Tomilho, submetidos à secagem em <i>spray drying</i> . ....	60
Figura 23 - Micrografias das partículas de pó proveniente de extrato de Tomilho, submetidos à secagem em <i>spray drying</i> . ....	61



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Vantagens e desvantagens do uso da técnica de <i>spray drying</i> . ....	29
Tabela 2 - Teor de compostos fenólicos e flavonoides totais do EET .....	42
Tabela 3 -Compostos fenólicos identificados na análise cromatográfica do EET. ....	46
Tabela 4 - Atividade Antioxidante obtida para o tomilho pelos métodos: ABTS, FRAP, DPPH e $\beta$ -caroteno. ....	48

## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>12</b>
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	<b>14</b>
2.1 OBJETIVO GERAL .....	14
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	14
<b>3 REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	<b>15</b>
3.1 TOMILHO.....	15
3.2 ANTIOXIDANTES .....	16
3.3 MÉTODOS PARA AVALIAR A ATIVIDADE ANTIOXIDANTE <i>in vitro</i> .....	22
3.4 MICROENCAPSULAÇÃO .....	26
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>33</b>
4.1 COLETA DA AMOSTRA .....	33
4.2 PREPARO DO EXTRATO ETANÓLICO DE TOMILHO (EET) .....	33
4.3 DETERMINAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS.....	33
4.4 DETERMINAÇÃO DE FLAVONOIDES TOTAIS .....	34
4.5 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA .....	34
4.6 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE .....	35
4.6.1 Atividade antioxidante pelo método do sequestro do radical DPPH* .....	35
4.6.2 Determinação da atividade antioxidante pelo método do radical ABTS <sup>•+</sup> .....	35
4.6.3 Atividade antioxidante pelo FRAP (Poder Antioxidante de Redução do Ferro) .....	36
4.6.4 Atividade antioxidante pelo sistema $\beta$ -caroteno/ácido linoleico.....	36
4.7 MICROENCAPSULAÇÃO DA AMOSTRA .....	37
4.7.1 Eficiência da encapsulação (%) .....	38
4.7.1.1 Extração dos compostos fenólicos não microencapsulados .....	38
4.7.1.2 Ruptura das micropartículas para liberação dos compostos fenólicos microencapsulados .....	39
4.7.1.3 Compostos fenólicos para eficiência da microencapsulação .....	39
4.7.2 Análise da estrutura das microcápsulas .....	40
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>41</b>
5.1 AMOSTRAS .....	41
5.2 TEOR DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS E FLAVONOIDES TOTAIS .....	41
5.3 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA .....	45

5.4 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELOS MÉTODOS ABTS <sup>•+</sup> , DPPH <sup>•</sup> , FRAP E B-CAROTENO/ÁCIDO LINOLEICO.....	48
5.5 MICROENCAPSULAÇÃO .....	52
5.5.1 Eficiência da Microencapsulação .....	57
5.5.2 Microscopia eletrônica de varredura .....	58
<b>6 CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>62</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>63</b>

## INTRODUÇÃO

Atualmente, é crescente a preocupação com o papel da dieta na saúde e na qualidade de vida, sendo cada vez maior o interesse por produtos naturais que venham a contribuir com diferentes propriedades biológicas benéficas à saúde. A comunidade científica, impulsionada por essa perspectiva, têm voltado suas pesquisas para a busca de compostos bioativos presentes, principalmente, em produtos naturais. Dentre essas substâncias, destacam-se os compostos fenólicos, amplamente encontrados na natureza como produtos do metabolismo secundário das plantas, e que possuem grande potencial antioxidante, ou seja, são capazes de, em pequenas quantidades, combaterem a oxidação causada pela ação desequilibrada dos radicais livres (MELO, 2010).

Nesse contexto, destacam-se as ervas aromáticas ou especiarias, pois são consideradas fontes naturais de antioxidantes e muitas ainda apresentam diversas propriedades biológicas benéficas. Por serem comumente utilizadas como ingredientes típicos, condimentos, temperos e aromatizantes, representam ainda um potencial de aplicação industrial com intuito de evitar a oxidação em produtos lipídicos. Dentre as ervas aromáticas, as mais estudadas são da família *Lamiaceae*, que compreende diversas espécies distribuídas no mundo, dentre elas o Tomilho (*Thymus vulgaris* L.), amplamente reconhecido por suas propriedades antioxidantes e antimicrobianas (HUBAIB et al., 2002; MARIUTI e BRAGAGNOLO, 2007).

A grande problemática, quanto ao uso de produtos naturais, como as ervas aromáticas, pela indústria de alimentos, está no fato de que a grande parte dos constituintes responsáveis pelas propriedades biológicas, como atividade antioxidante, são compostos altamente suscetíveis a oxidação e a volatilização, sendo instáveis na presença de calor, luz e oxigênio. Além disso, apresentam sabores e odores característicos que podem influenciar na qualidade sensorial dos produtos (AZEREDO, 2005).

Uma alternativa para aumentar a estabilidade destes constituintes e manter a bioatividade dos mesmos, é apresentada pelos processos de microencapsulação. Tais processos consistem, basicamente, em um empacotamento de partículas, as quais permanecem com conteúdo protegido do meio externo, podendo ser liberadas no tempo e lugar adequados. Trata-se de uma tecnologia inovadora empregada com

êxito em diversos setores das indústrias, não só alimentícia como também farmacêutica e de cosméticos (SUAVE et. al., 2006).

A microencapsulação de compostos ativos é uma técnica relativamente recente, e tem se tornado muito atraente. Para indústria de alimentos esta técnica vem solucionando limitações quanto ao emprego de ingredientes naturais, visto que a mesma pode atenuar *flavors* indesejáveis, reduzir a volatilidade e a reatividade, aumentando assim, a estabilidade de compostos ativos em condições ambientais adversas (SILVA et. al., 2013).

Dentro deste contexto, o presente estudo visa avaliar a atividade antioxidante do Tomilho (*Thymus vulgaris L.*), bem como a produção de micropartículas produzidas por *spray drying*, visando obter maior estabilidade para os compostos responsáveis pela atividade antioxidante e sua funcionalidade como aditivo em alimentos.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Determinar a atividade antioxidante do extrato etanólico de tomilho (*Thymus vulgaris L.*) e elaborar microcápsulas por processamento de atomização em *spray-dryer*, visando à funcionalidade e bioatividade das microcápsulas nos alimentos.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Coletar o tomilho (*Thymus vulgaris L.*), cultivado em Curitiba, Estado do Paraná;
- Preparar extrato etanólico de tomilho;
- Determinar o teor de compostos fenólicos e flavonoides totais do extrato;
- Identificar e quantificar os compostos fenólicos do extrato de tomilho por CLAE.
- Avaliar as propriedades antioxidantes do extrato pelos métodos: de sequestro do radical DPPH• (2,2 difenil-1-picrilhidrazina), ABTS•+ (2,2 – azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfônico)), redução do ferro - FRAP e sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico.
- Preparar microcápsulas utilizando processo de atomização em *spray drying*, visando a funcionalidade do extrato de tomilho como ingrediente alimentício.

### 3 REFERENCIAL TEÓRICO

#### 3.1 TOMILHO

O tomilho (*Thymus vulgaris* L.) também conhecido como timo, é uma planta aromática nativa dos países do Mediterrâneo, pertencente à família *Lamiaceae*. Tal família abrange 150 gêneros, com cerca de 2800 espécies distribuídas em todo mundo. As ervas aromáticas da família *Lamiaceae* têm sido amplamente estudadas devido às suas propriedades antioxidantes e antimicrobianas (MARIUTI e BRAGAGNOLO, 2007; PORTE E GODOY, 2001).

O *Thymus vulgaris* (Figura 1), apresenta arbusto de pequeno porte, medindo de 20 a 30 cm de altura, com caules tortuosos, lenhosos, e compactos; poucos ramos; folhas pequenas com formato oval e bastante aromáticas. Em geral, tem preferência por regiões secas, áridas, solos arenosos e pobres, evitando umidade e terras compactadas (CASTRO e CHEMALE, 1995).



Figura 1 – Tomilho. Fonte: Jakiemiu (2008).

Muitos estudos fitoquímicos são realizados para investigar a composição dos extratos e óleos essenciais do tomilho. Hubaib et al. (2002), na Itália, analisaram óleos essenciais de tomilho por cromatografia à gás. O óleo foi considerado rico em monoterpenos (timol e carvacrol) e em seus precursores correspondentes, hidrocarbonetos monoterpênicos (*p*-cimeno e *γ*-terpineno) (Figura 2).

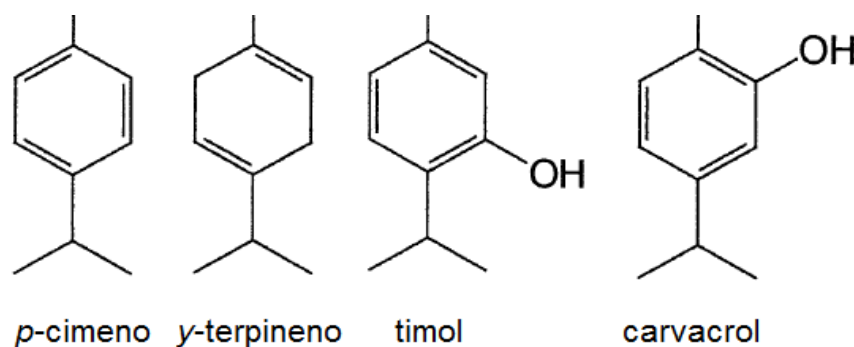


Figura 2 - Principais constituintes do Tomilho. Fonte: Hubaib et al. (2002).

O tomilho é amplamente empregado como aromatizante de alimentos, servindo como tempero ou condimento. Seu óleo essencial é reconhecido por inúmeras propriedades biológicas como atividade antimicrobiana, antioxidante, expectorante, cicatrizante, antisséptico, digestivo e estimulante. Tais atividades, em sua maioria, são atribuídas ao timol e ao carvacrol, componentes majoritários do tomilho (JAKIEMI, 2008).

Assim, muitas pesquisas vêm sendo realizadas com ervas aromáticas visando um estudo mais aprofundado dos seus constituintes, seus mecanismos de ação e, possivelmente, aplicações de interesse industrial (HUBAIB et al., 2002; MARIUTI E BRAGAGNOLO, 2007; PORTE E GODOY, 2007), principalmente devido as suas propriedades antioxidantes.

### 3.2 ANTIOXIDANTES

Atualmente é crescente a preocupação dedicada ao papel da dieta na saúde humana. Estudos epidemiológicos associam o consumo contínuo de produtos



vegetais com uma redução significativa no risco de doenças crônicas como aterosclerose e câncer, bem como inúmeros efeitos benéficos à saúde humana. Tais efeitos têm sido atribuídos a atividade antioxidante de diversos compostos presentes nos vegetais, como as vitaminas A e C, os carotenoides, e em especial os compostos fenólicos, amplamente reconhecidos por reagirem com os radicais livres e, conseqüentemente, proporcionar benefícios ao organismo humano (SILVA et al., 2010).

Os radicais livres são átomos ou moléculas instáveis que, para adquirir estabilidade, precisam capturar elétrons de outras substâncias. São produzidos por processos metabólicos e atuam como mediadores na transferência de elétrons em inúmeras reações bioquímicas, desempenhando importantes papéis no organismo. Porém, em excesso, podem causar inúmeros efeitos negativos no organismo, como danos ao DNA, às proteínas e às estruturas celulares (ALVES et al., 2010).

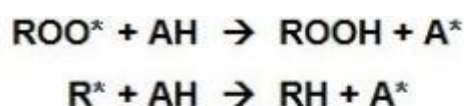
O estresse oxidativo é consequência de um desequilíbrio no sistema pró - oxidante/antioxidante causado pelo excesso de radicais livres no organismo. Para alcançar uma proteção eficaz, os sistemas biológicos desenvolveram um sistema antioxidante que abrange vários componentes lipossolúveis, hidrossolúveis e enzimáticos. Entretanto, muitas vezes se faz necessário o uso de antioxidantes exógenos, obtidos através de uma dieta rica em antioxidantes naturais, como frutas e vegetais (SILVA et al. 2010; DAMODARAN et al., 2010).

Em se tratando de alimentos, a deterioração em virtude de sua natureza biológica, é inevitável. Durante a produção, o processamento, a distribuição e o armazenamento ocorrem várias reações de deterioração envolvendo ação de microorganismos e/ou processos químicos. Estes últimos são representados pela oxidação de lipídios e de substâncias fenólicas, promovendo alterações indesejáveis nos alimentos e até mesmo a formação de compostos tóxicos (ARAÚJO, 2008).

A ingestão de alimentos alterados representa uma fonte de substâncias potencialmente tóxicas à dieta. Os produtos oriundos da oxidação de lipídios (peróxidos e os produtos de sua degradação) podem ser absorvidos pelo organismo e, até mesmo na ausência da absorção, representam riscos para a mucosa intestinal. Os peróxidos afetam a atividade de diversas enzimas, alteram proteínas de baixa densidade (LDL) e interagem com o DNA, funcionando como promotores de carcinogênese (ARAÚJO, 2008).

Segundo Mariuti e Bragagnolo (2007), a autoxidação nos alimentos ocorre por meio de um processo de reação em cadeia dos radicais livres, que é dividida em três etapas: iniciação, propagação e terminação. Na iniciação, o ácido graxo insaturado abstrai um átomo de hidrogênio de sua molécula, gerando um radical livre que reage rapidamente com o oxigênio triplete ( $_3\text{O}_2$ ), formando um radical peróxido. Durante a etapa de propagação, a reação em cadeia é acelerada, dando origem à terceira etapa: fase onde os radicais livres começam a reagir entre si, formando espécies estáveis.

Os antioxidantes são amplamente reconhecidos pela ação em diferentes níveis do processo de oxidação envolvendo moléculas lipídicas. Podem atuar interceptando o oxigênio singlete diminuindo, assim, a concentração de oxigênio; evitando a fase de iniciação da oxidação através do sequestro dos radicais hidroxil, quelando íons metálicos e decompondo produtos primários a compostos não radicalares (ARAÚJO, 2008; SILVA et al., 2010; DAMODARAN et al., 2010). São classificados em compostos antioxidantes primários, os caracterizados por atuarem na redução dos radicais livres, e em compostos secundários, os que apresentarem mecanismo de efeito que não envolve a redução direta dos radicais livres (MESSIAS, 2009; OETTERER, 2006). O mecanismo de ação dos antioxidantes primários está representado pela Figura 3.

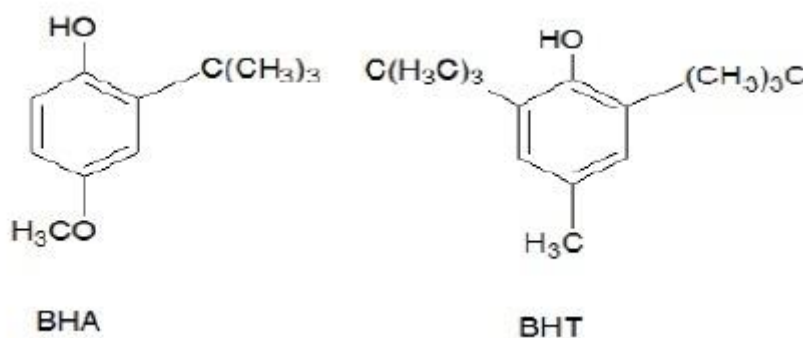


ROO\* e R\* – Radicais livres;  
 AH – Antioxidante com um átomo de hidrogênio ativo  
 A\* - Radical inerte

**Figura 3 - Mecanismo de ação de antioxidantes primários**  
 Fonte: Ramalho; Jorge (2006).

Assim, segundo Halliwell e Guteridge (1990), denominam-se antioxidantes as substâncias que presentes em concentrações baixas, comparadas ao composto oxidável de interesse, são capazes de diminuir ou prevenir significativamente a oxidação do substrato.

Antioxidantes podem ser encontrados naturalmente nos alimentos ou adicionados intencionalmente. São comumente utilizados na indústria alimentícia para controlar a oxidação lipídica de alimentos processados, e seu emprego se apresenta como umas das principais formas de minimizar a rancificação, retardar ou inibir a formação de produtos tóxicos, sustentar a qualidade sensorial e aumentar a vida prateleira dos produtos. Nesse sentido, existem duas categorias básicas de antioxidantes: os sintéticos, como o BHA (butil hidroxianisol) e o BHT (butil hidroxitolueno) (Figura 4), amplamente empregados pela indústria brasileira de alimentos e, os naturais, que são substâncias bioativas tais como compostos fenólicos e terpenos, constituintes naturais de diversos alimentos (MELO, 2010).



**Figura 4 - Estrutura fenólica dos antioxidantes sintéticos.**  
Fonte: Ramalho; Jorge (2006) – com alterações.

Além dos benefícios à saúde, os antioxidantes naturais ganham destaque no meio científico por serem potenciais substituintes aos antioxidantes sintéticos, devido a seu efeito equivalente ou maior na inibição da oxidação. É crescente a rejeição ao uso de compostos sintéticos nos alimentos visto que muitos estudos vinculam tais compostos como sendo agentes mutagênicos e com potencial toxicidade (MELO, 2010).

Dentro desse contexto, muitos condimentos como tomilho vêm sendo estudados. Extratos de alecrim, sálvia, orégano e tomilho mostraram-se eficientes na inibição do processo oxidativo atuando na neutralização de radicais e bloqueando a peroxidação catalisada por ferro (DORMAN et al., 2003, 2004; SHAN et al., 2005). Tal atividade apresentada vem sendo atribuída, principalmente, aos compostos

fenólicos presentes nas ervas aromáticas da família *Lamiaceae* (MARIUTTI E BRAGAGNOLO, 2007).

### 3.2.1 Compostos Fenólicos

Em termos de ação biológica, a principal classe de constituintes das ervas aromáticas é a dos compostos fenólicos. São substâncias sintetizadas a partir do metabolismo secundário de plantas e vegetais, e constituem um grupo com milhares de compostos que podem ser encontrados em folhas, frutos, raízes, cascas, possuindo amplos efeitos biológicos, incluindo ação antioxidante. Tais compostos vêm sendo amplamente estudados devido a sua influência na qualidade dos alimentos. Esses estudos visam, em sua maioria, avaliar o potencial antioxidante na conservação de alimentos, bem como na ação antioxidante destes compostos no sistema biológico (SOARES, 2002).

Os compostos fenólicos, amplamente difundidos na natureza, compõem um grupo com mais de 8000 compostos já identificados em plantas, podendo ser pigmentos que dão cor aos alimentos ou produtos do metabolismo secundário das plantas, normalmente derivados de mecanismos de defesa contra agressões externas. Tais compostos pertencem a uma classe que abrange uma diversidade de estruturas químicas, simples e complexas, que se caracterizam estruturalmente pela presença de hidroxilas e anéis aromáticos que lhes oferecem características como a de compostos antioxidantes e inúmeros efeitos biológicos, dentre os quais estão atividade antimicrobiana, anti-inflamatória, antialérgica e vasodilatadora, sendo o fenol seu composto mais simples (Figura 5) (BRAVO, 1998; GALLICE, 2010; SILVA et al., 2010).

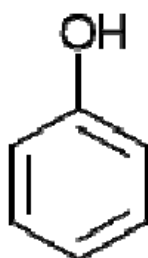


Figura 5 – Estrutura química do fenol. Fonte: Bravo (1998).

Como fruto de sua atuação, esses antioxidantes fenólicos formam produtos intermediários estáveis, e se caracterizam por inibirem a oxidação de vários ingredientes do alimento, em principal os lipídeos (OLDONI, 2010). Entretanto, os compostos fenólicos são facilmente oxidáveis, seja pela ação de enzimas vegetais específicas ou pela influência de metais, radiação UV, calor ou meio alcalino (CARPES, 2008).

Esta grande classe de compostos é dividida em flavonoides e não flavonoides. Composto o grupo dos flavonoides estão os polifenóis e dos não flavonoides estão os ácidos fenólicos (SILVA et al., 2010).

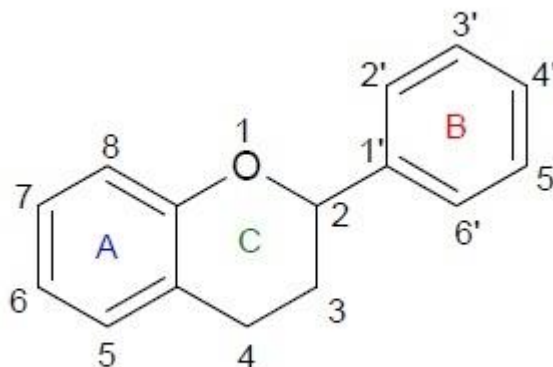
Os ácidos fenólicos são divididos em dois grupos que apresentam estruturas diferentes, os hidroxicinâmicos e os hidroxibenzóicos. Apesar da semelhança nas estruturas eles se diferenciam pelo número e posição da hidroxila no anel aromático (STALIKAS, 2007). A Figura 6 representa as estruturas gerais dos ácidos pertencentes a essas classes.



**Figura 6 - Estrutura geral dos ácidos fenólicos. À esquerda, estrutura geral dos ácidos hidroxicinâmicos, e à direita, a estrutura geral dos ácidos hidroxibenzóicos. Fonte: Do autor (2014).**

Os flavonoides compreendem um grupo de compostos fenólicos mais abundantes na dieta humana, pois podem ser encontrados em um grande número de frutas e hortaliças (SILVA et al., 2010). Estruturalmente, são substâncias aromáticas com 15 átomos de carbono (C<sub>15</sub>) no seu esqueleto básico, onde dois anéis, obrigatoriamente aromáticos, se encontram conectados por uma ponte de carbonos que geralmente contém um átomo de oxigênio e uma carbonila. Os

flavonoides apresentam-se em diferentes estruturas, mas tem como estrutura básica a representada na Figura 7 (LOPES et al., 2003; BRAVO, 1998).



**Figura 7 - Estrutura básica dos flavonoides.**  
Fonte: Do autor (2014).

As várias classificações desse grupo de compostos, bem como as atividades bioquímicas e de seus metabólitos dependem de suas estruturas e da orientação das várias posições na molécula, relacionando-se também com as características do anel C como a presença ou ausência do anel central, hidroxilas ou duplas ligações ligadas a este (CARPES, 2008). Segundo Silva et al. (2010), os flavonoides se apresentam sob muitas variações como flavonois, antocianinas, flavonas e flavanonas, catequinas, antocianinas, isoflavonas e chalconas.

### 3.3 MÉTODOS PARA AVALIAR A ATIVIDADE ANTIOXIDANTE *in vitro*

Há uma grande variedade de métodos empregados na determinação da atividade antioxidante *in vitro* de compostos bioativos. Cada método apresenta um princípio diferente que depende da matriz de reação, podendo ser métodos que avaliam a habilidade de sequestrar radicais livres e métodos que testam a capacidade de inibir a oxidação lipídica (MARIUTI e BRAGAGNOLO, 2007).

Os vários radicais livres existentes apresentam mecanismos diferentes de atuação em organismos vivos o que torna difícil a existência de um método simples e universal com o qual se consiga obter medidas quantitativas da atividade antioxidante, sendo assim, quanto mais métodos forem utilizados em conjunto, melhor será o informativo obtido do potencial antioxidante total (ALVES et al., 2010).

Dentre os métodos espectrofotométricos *in vitro*, os mais utilizados na análise de atividade antioxidante são: o método do radical DPPH<sup>•</sup> (2,2-difenil-1-picrihidrazil), o ABTS<sup>•+</sup> (2,2-azino-bis-(3-etil-benzotiazolona-6-ácido sulfônico)), do FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) e o sistema β-caroteno/ácido linoleico (BCAL), (BERGAMASCHI, 2010).

O método do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH<sup>•</sup>) é bastante popular na avaliação da atividade antioxidante de produtos naturais, visto que é uma técnica simples com elevada sensibilidade (BERGAMASHI, 2010). Trata-se de um radical livre que, por apresentar uma deslocalização do elétron desemparelhado em toda sua molécula, é dito estável. Tal deslocalização confere ao DPPH<sup>•</sup> uma coloração violeta que, em solução etanólica, apresenta absorção na faixa de 515-520nm (ALVES et al., 2010). Neste ensaio o composto antioxidante atua como doador de hidrogênio ou elétron que, quando é adicionado à solução alcoólica de DPPH<sup>•</sup>, o reduz e descora o meio de violeta para amarelo pálido (Figura 8). Assim o efeito antioxidante é proporcional ao descoloramento acarretado pelo desaparecimento do radical DPPH<sup>•</sup> do meio reacional (BERGAMASCHI, 2010).

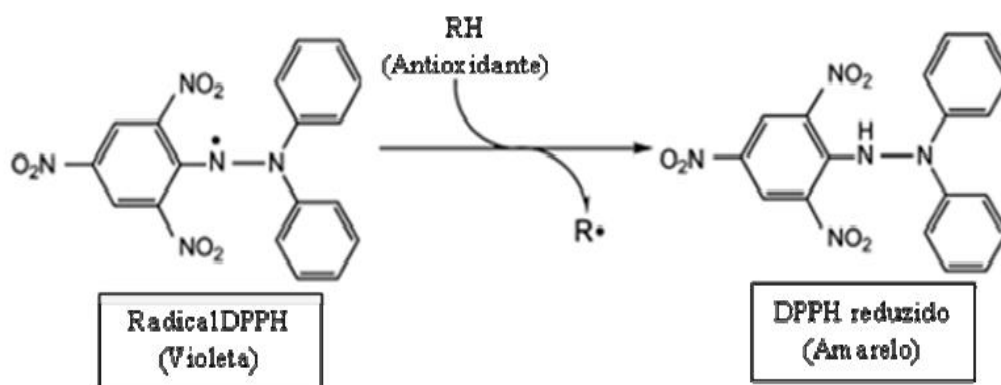


Figura 8 - Estrutura química do radical DPPH<sup>•</sup> e reação de estabilização com um antioxidante.  
Fonte: Moon e Shibamoto (2009).

O método pelo radical  $\text{ABTS}^{+\cdot}$  (2,2-azino-bis-(3-etil-benzotiazolína-6-ácido sulfônico)), baseia-se na avaliação da atividade antioxidante total pela captura do radical livre, sendo aplicado, principalmente, na determinação de agentes antioxidantes em alimentos e bebidas (BERGAMASCHI, 2010). Segundo Re et al. (1999), o radical  $\text{ABTS}^{+\cdot}$ , de coloração esverdeada, é formado pela reação de redução do persulfato de potássio com ABTS e o potencial antioxidante é determinado pela descoloração do ABTS na presença de agentes antioxidantes, medindo-se a redução do radical a uma absorvância de 734 nm (Figura 9)

A técnica por captura do radical  $\text{ABTS}^{+\cdot}$  apresenta muitas vantagens, pois além de ser um método simples, permite ser solubilizado em solventes orgânicos e aquosos, diferentemente do DPPH que, apesar de ser um radical que não necessita de preparo prévio, somente pode ser solubilizado em meios orgânicos (MELO, 2010).

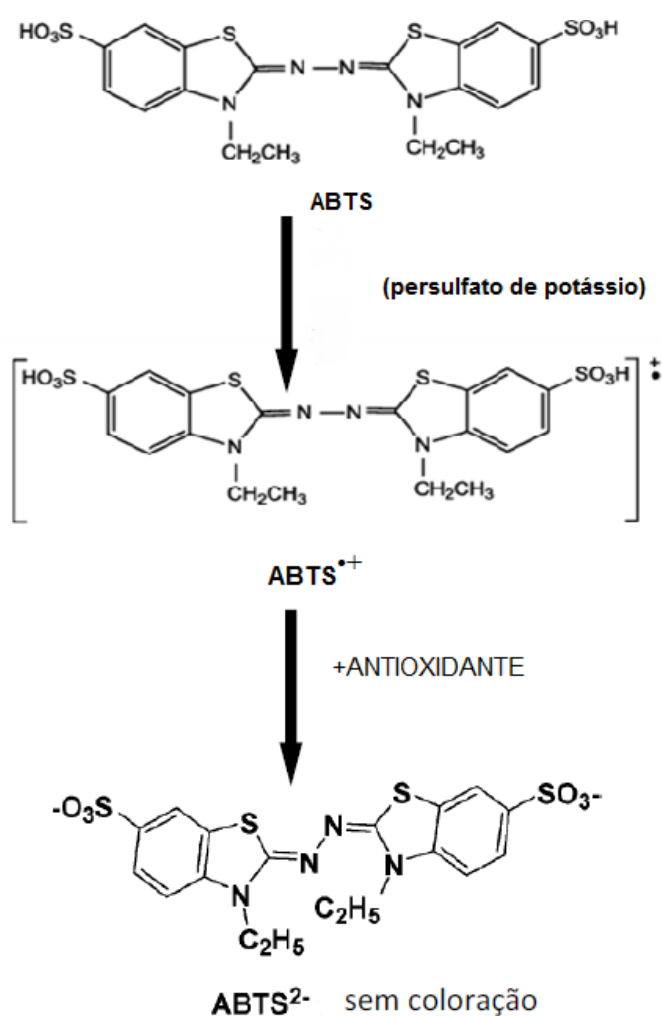
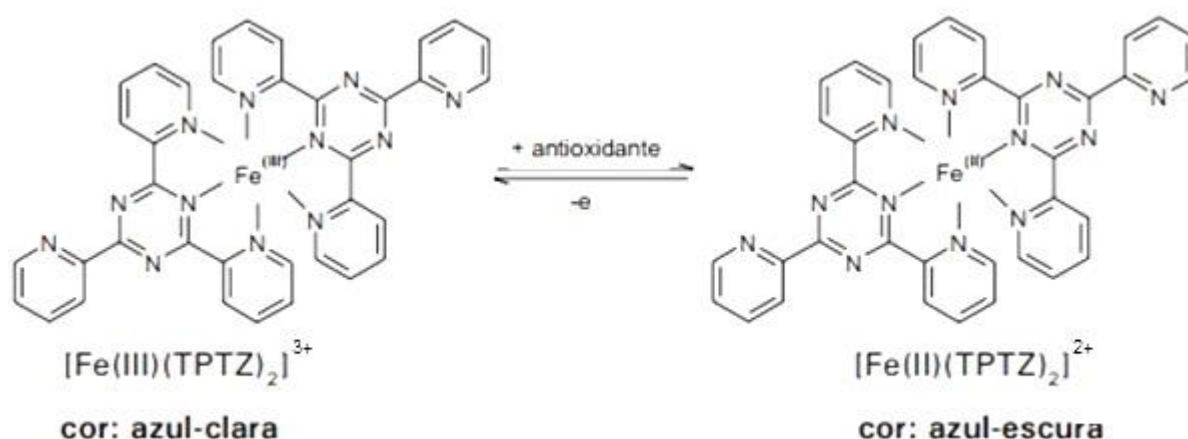


Figura 9 - Formação do radical estável com persulfato de potássio e reação com antioxidante pelo método  $\text{ABTS}^{+\cdot}$ .

Fonte: Moon e Shibamoto (2009).



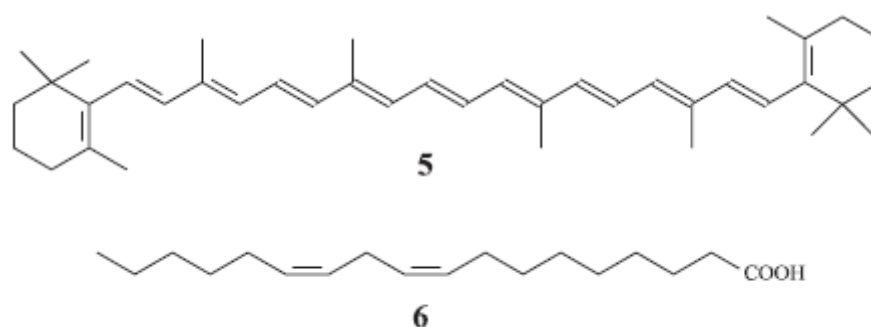
O ensaio FRAP (Poder Antioxidante de Redução do Ferro), baseia-se na avaliação direta da capacidade de um antioxidante reduzir  $\text{Fe}^{3+}$  em  $\text{Fe}^{2+}$ . A redução do 2,4,6-tri(2-pirilil)-1,3,5-triazina (TPTZ) é acompanhada pela formação de um complexo de cor azul intenso com o  $\text{Fe}^{2+}$ , caracterizado por banda de absorção na faixa de 593 nm (Figura 10). Este método proporciona resultados rápidos e reprodutíveis, sendo muito utilizado em conjunto com outros ensaios para avaliar a atividade antioxidante de plantas e alimentos. Porém, apresenta algumas desvantagens tais como o fato de que nem todos os antioxidantes presentes em uma matriz complexa reduzem o ferro, assim como nem todo redutor do  $\text{Fe}^{3+}$  a  $\text{Fe}^{2+}$  é um antioxidante (APAK et al., 2004; BERGAMASHI, 2010).



**Figura 10 - Redução do complexo TPTZ, método FRAP.**  
**Fonte: Rufino et al. (2006).**

Outro método empregado na avaliação da atividade antioxidante é o que engloba um sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico, e baseia-se na capacidade de um dado antioxidante inibir a oxidação. É amplamente utilizado para avaliar agentes antioxidantes em vários tipos de amostras, tais como compostos puros, extratos de plantas, frutas, vegetais, grãos, entre outros. O método consiste no uso do ácido linoleico (Figura 11) que, na presença de oxigênio, forma o radical peroxil, o agente oxidante. O  $\beta$ -caroteno (Figura 11) reage com o radical livre resultando na perda de

coloração da solução e, a adição de um composto antioxidante pode reagir com o radical peroxil, contribuindo para retardar a queda de coloração do  $\beta$ -caroteno. Assim, os antioxidantes constituintes das amostras podem ser facilmente monitorados espectrofotometricamente (ALVES et al., 2010).



**Figura 11 - Estrutura beta-caroteno (5); estrutura ácido linoleico (6).  
Fonte: Alves et al. (2010).**

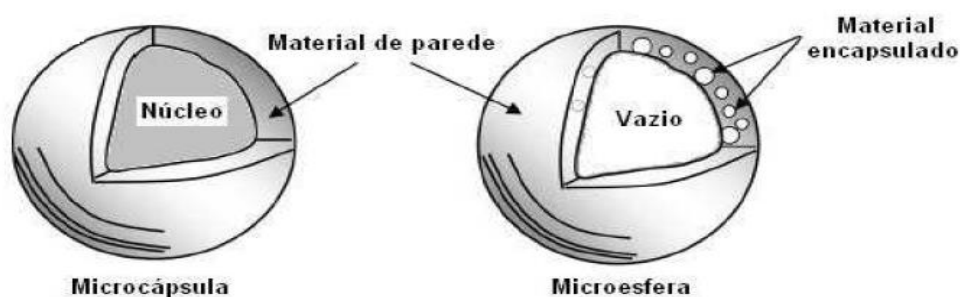
### 3.4 MICROENCAPSULAÇÃO

Na tentativa de manter o estado de conservação dos produtos naturais por mais tempo, muitas técnicas passaram a ser exploradas. Dentre essas técnicas, a microencapsulação se destaca por apresentar diversos métodos que permitem o desenvolvimento de formulações com conteúdo protegido do meio externo, podendo ser liberado sob condições específicas, exibindo assim, uma forma de melhor aproveitar os benefícios encontrados nos recursos naturais (CARNEIRO, 2011).

A microencapsulação é definida como processo em que minúsculas partículas ou gotas são envolvidas por uma cobertura, originando cápsulas com várias propriedades interessantes. O material externo é denominado agente encapsulante ou parede, e o ingrediente a ser encapsulado é o material ativo, recheio ou núcleo (AZEREDO, 2005; CARNEIRO, 2011; MENEZES et al., 2012).

Estruturalmente, as micropartículas formadas podem ser divididas em microcápsulas ou microesferas. As microcápsulas formam um sistema tipo reservatório, onde o núcleo é nitidamente observado na região central, envolvido por uma camada ou filme contínuo do material de parede. Já as microesferas resultam

em um sistema do tipo matricial, onde o material ativo ou núcleo se encontra distribuído em micropartículas junto à matriz encapsulante seca. Neste último, devido à expansão das partículas durante a secagem, a área central se encontra vazia, conforme mostra a Figura 12 (AZEREDO, 2005; JAFARI et al., 2008).



**Figura 12 - Estrutura das micropartículas.**  
**Fonte: Adaptado de Jafari et al. (2008).**

Na indústria de alimentos, a aplicação desta técnica tem como objetivos principais proteger o material ativo contra agentes atmosféricos, reduzindo, assim, interações que resultem em perda de coloração, aroma, sabor e valor nutricional; incorporar ingredientes como, por exemplo, temperos, aromas, vitaminas e minerais; inibir sabor, cor ou odor indesejável; promover melhor solubilidade; facilitar o manuseio; prolongar a vida de prateleira de compostos alimentares e reduzir perda de voláteis (SUAVE et al., 2006; MENEZES et al., 2012)

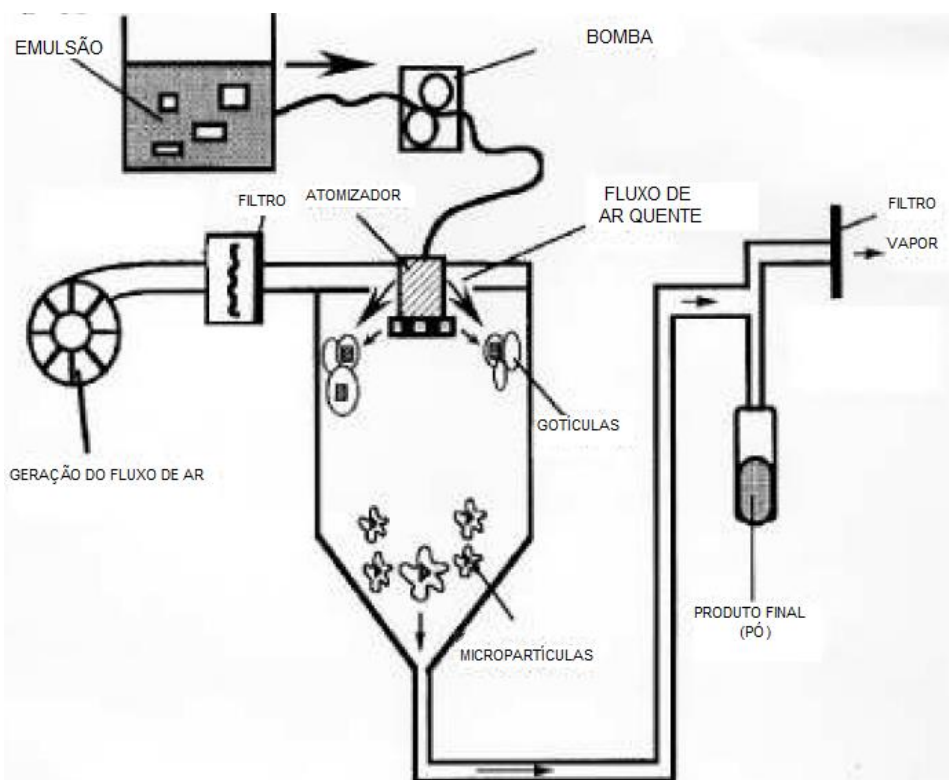
Segundo Andrade et al. (2011), a microencapsulação além de converter líquido à pó, ainda permite controlar a liberação de um determinado composto que possa atribuir sabor, odor ou que, de alguma forma, atue na conservação da qualidade do produto. Assim, nos últimos anos, com o conceito de liberação controlada do ingrediente encapsulado no lugar e no tempo certo, a microencapsulação de compostos bioativos se tornou muito atrativa. Mudança de pH, stress mecânico, tempo, temperatura, atividade enzimática, força osmótica dentre outros, são fatores que podem ser utilizados na liberação do ingrediente encapsulado (GOUIN, 2004).

Existem vários métodos para preparação de micropartículas e a escolha do método mais adequado depende de alguns fatores como, por exemplo, das propriedades do material ativo, das condições de produção e dos requisitos do

produto final. Quanto à natureza do encapsulamento, os métodos podem ser divididos em três grupos principais: químicos, como inclusão molecular e polimerização; físicos, como *spray drying*, *spray congealing*, *pan coating*, leite fluidizado, extrusão centrífuga; ou ainda físico-químicos como coacervação e separação de fases, emulsificação seguida da evaporação do solvente (SUAVE et al., 2006; FAVARO-TRINDADE et al., 2008; BRASILEIRO, 2011).

Dentre as técnicas de microencapsulação, a atomização por *spray drying* é uma das mais utilizadas pela indústria de alimentos. Trata-se de uma técnica econômica, com disponibilidade de equipamentos e métodos de produção relativamente baratos quando comparados com outros métodos. Possibilita preservar a bioatividade de muitos componentes alimentares e é um dos mais antigos métodos de encapsulação, tendo sido utilizado para os primeiros compostos de sabor encapsulados na década de 1930 (DZIEZAK, 1988; SANTOS et al., 2005).

Esta técnica é empregada com uso de um secador, chamado de atomizador (*spray dryer*) (Figura 13). O material ativo é emulsificado com o material encapsulante e a emulsão é então bombeada e dispersa em forma de gotículas (*spray*), por meio de bicos atomizadores. Estas, por sua vez, seguem para uma câmara com fluxo de ar aquecido e, à medida que são lançadas, elas tomam forma esférica e, em contato com ar quente, a água se evapora rapidamente da cápsula, originando partículas sólidas e secas. A alta relação área de superfície/volume das partículas promove rápida evaporação da água. Com isso, o tempo de exposição das partículas ao calor é relativamente curto e a temperatura do núcleo não ultrapassa os 100 °C, o que diminui o risco de alterações indesejáveis em compostos termossensíveis (DZIEZAK, 1988; OLIVEIRA e PETROVICK, 2010; BRASILEIRO, 2011).



**Figura 13 - Esquema básico de um spray dryer.**  
**Fonte: MICROBELCAPS (2006) - (adaptado).**

A microencapsulação envolve as seguintes etapas: escolha do material de parede adequado, preparo da emulsão e, finalmente, a secagem da emulsão por atomização em secador *spray dryer* (AZEREDO, 2005). A Tabela 1 apresenta as vantagens e desvantagens desse método.

**Tabela 1 - Vantagens e desvantagens do uso da técnica de *spray drying*.**

VANTAGENS	DESvantagens
Baixo custo de operação	Os materiais produzidos não apresentam uniformidade quanto ao tamanho
Alta qualidade das partículas resultantes	Custo do equipamento
Bom rendimento de processo	Limita a escolha do encapsulante
Boa solubilidade dos materiais resultantes	
Alta estabilidade dos materiais resultantes	

**Fonte: GOUIN, 2004; MULLER, 2011.**

A microencapsulação de alimentos emprega formulações contendo o ingrediente a ser preservado em mistura com agentes encapsulantes. Existe uma grande variedade de materiais que são utilizados como agentes encapsulantes no processo de microencapsulação, responsáveis pelo revestimento dos compostos de interesse. A escolha desse material inclui uma etapa crucial para garantir a estabilidade dos compostos encapsulados e uma boa eficiência de encapsulação, dependendo de uma série de fatores, tais como a técnica que será utilizada, o tipo de aplicação do produto final, as propriedades físicas e químicas do núcleo e do material de parede, a compatibilidade do núcleo com a parede, e inclusive, fatores econômicos (AZEREDO et al., 2005; SILVA, 2011).

O material de parede adequado deve ter boa capacidade emulsificante, e para isso o composto deve conter grupamentos hidrofílicos e hidrofóbicos, sendo que quanto maior a capacidade emulsificante melhor a retenção do material ativo. Devem ainda preencher alguns requisitos importantes para produção de uma boa matriz encapsulante, como formar bons filmes na interface; ter baixa viscosidade em elevadas concentrações de sólidos; exibir baixa higroscopicidade; não reagir com o núcleo; ausência de sabor ou odor desagradável; máxima proteção ao núcleo contra condições ambientais adversas; liberação gradual e total do material ativo e, finalmente, baixo custo e boa disponibilidade (SUAVE et al., 2006). Em geral, os materiais de parede são utilizados na forma de misturas com diferentes proporções, visto que quase nenhum material conhecido oferece todas essas propriedades listadas.

Uma série de biopolímeros pode ser utilizada nos processos de microencapsulação de ingredientes alimentícios por *spray drying*. Dentre eles, os mais utilizados são as gomas (arábicas e alginatos); maltodextrinas, amidos modificados ou ainda uma mistura desses em diferentes proporções (ABURTO, 1998; CAI e CORKE, 2000; CARNEIRO, 2011; BORRMANN et al., 2013).

Dentre os materiais de parede, as maltodextrinas ou amidos hidrolisados estão entre os mais utilizados na encapsulação de ingredientes alimentícios (ABURTO, 1998). São carboidratos formados pela hidrólise ácida de amidos de diferentes fontes, como por exemplo, do milho e da batata, e estão disponíveis em diferentes dextroses equivalentes (DE), indicando o nível de hidrólise do polímero de amido (DAMODARAN et al., 2010; SILVA, 2011).

A maltodextrina,  $[(C_6H_{12}O_5)_n H_2O]$ , polímero sacarídeo nutritivo, não doce que consiste de unidades de D-glicose ligadas por cadeia  $\alpha$  1-4, é definida como um produto com valores de DE inferiores a 20. Geralmente, estes produtos são menos higroscópicos, não apresentam doçura, além de serem excelentes para contribuir com o corpo de sistemas alimentícios. Tais amidos hidrolisados oferecem vantagens como baixo custo relativo, quando comparado com os amidos modificados, aroma e sabor neutros e baixa viscosidade em altas concentrações de sólidos, além de oferecerem boa proteção contra oxidação. O maior problema da utilização desse material é que ele tem pouca capacidade emulsificante (OBÓN et al., 2009; CARNEIRO, 2011; SILVA, 2011; MULLER, 2011).

Sendo assim, é desejável a utilização de maltodextrina em combinação com biopolímeros que apresentem atividade de superfície como no caso dos amidos modificados, com o principal objetivo de obter uma microencapsulação por *spray drying* eficaz, com alta retenção do material ativo e alta eficiência de encapsulação a baixo custo (JAFARI et al., 2008).

Os amidos modificados são caracterizados por apresentarem excelente retenção de voláteis, boa estabilidade de emulsão e baixa viscosidade em altas concentrações de sólidos, quando comparados com os amidos nativos. Esta modificação pode ser realizada por meios físicos (tratamento térmico, exposição a radiações), meios químicos (reagentes específicos para alterar a estrutura das macromoléculas) e biotecnológicos (processo enzimático) (DAMODARAN et al., 2010; CARNEIRO, 2011).

A produção de amidos modificados é uma alternativa que vem sendo desenvolvida há algum tempo com o objetivo de superar uma ou mais limitações dos amidos nativos e assim aumentar a utilização e aplicação deste polímero pelas indústrias (MULLER, 2011). Os amidos modificados empregados na microencapsulação devem ser modificados quimicamente pela incorporação de grupos lipofílicos em suas moléculas. Eles oferecem melhor retenção de voláteis durante a secagem e podem ser utilizados em elevadas concentrações de sólidos na alimentação, além de formar uma emulsão estável (SHAHIDI; HAN, 1993).

O octenilsuccinato de amido, o chamado amido-OSA, é um emulsificante obtido por esterificação do amido com o anidrido octenilsuccínico (OSA) sob condições alcalinas. Através desta modificação, a hidrofobicidade do OSA é introduzida, enquanto a hidrofiliabilidade das macromoléculas do amido é mantida.

Este derivado com propriedades anfífilas é um emulsionante eficaz, sendo usado como um transportador de liberação modificada de material (REINECCIUS, 1998; WANG et al., 2010). O resultado dessa modificação gera um amido hidrofobicamente modificado, cujo nome comercial é Capsul<sup>®</sup> (ABURTO et al., 1998; MULLER, 2011).

Este amido é amplamente empregado pela excelente retenção de voláteis, pela estabilização da emulsão e baixa viscosidade. Entretanto, os amidos modificados exercem pouca proteção contra oxidação durante a estocagem, por isso a importância de utilizá-los associados à maltodextrina (MULLER, 2011).

Aburto et al. (1998), estudaram o desempenho do material de parede, composto por goma arábica, maltodextrina e amido modificado no encapsulamento de óleo essencial de laranja, utilizaram diferentes temperaturas de secagem em *spray drying*, e obtiveram uma maior retenção de óleo, 94%, quando utilizaram a formulação contendo 10% de amido modificado e 36% de maltodextrina, independente da temperatura de secagem.

Rocha et al. (2012), realizaram microencapsulação em *spray drying* de licopeno avaliando a funcionalidade deste quando aplicado em amostras de bolos. Conforme descrito pelos autores e após os testes de estabilidade, observou-se que a microencapsulação ofereceu uma maior proteção ao licopeno quando comparado com sua forma livre, sendo liberados os pigmentos de forma homogênea na massa do bolo. Assim, a microencapsulação pode ser considerada uma alternativa para minimizar a instabilidade de ingredientes alimentícios.



## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 COLETA DA AMOSTRA

A amostra de tomilho foi coletada em Setembro por produtores rurais da cidade de Curitiba - PR, e, após a colheita, as partes aéreas da planta foram secas em estufa a 40°C, moídas em moinho de bancada Marconi modelo MA – 630 e guardadas em freezer, até o momento das análises.

### 4.2 PREPARO DO EXTRATO ETANÓLICO DE TOMILHO (EET)

Para o preparo do extrato etanólico de Tomilho, foram pesados 10 gramas do material de amostra, previamente desidratados e moídos conforme o item 4.1. A extração foi realizada com 100 mL de etanol a 80% (v/v) em erlenmeyer de 250 mL, homogeneizados em Incubadora Shaker Modelo SL 222, a 40°C, por 60 minutos. Em seguida, foi realizada uma filtração em papel de filtro Whatman nº 5, e o filtrado (EET) foi transferido para tubos de ensaio com tampas de rosca. O EET foi utilizado para as análises de compostos fenólicos totais, flavonoides totais, CLAE, atividade antioxidante e microencapsulação por processo de atomização *spray drying*. Após análises, o extrato preparado foi evaporado em evaporador rotativo até obter uma redução do volume em 50 %. Após esta etapa de concentração do extrato, o mesmo foi levado para o preparo das microcápsulas em *spray drying*.

### 4.3 DETERMINAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS

O conteúdo de compostos fenólicos foi determinado segundo método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu, descrito por Singleton et al. (1999), utilizando ácido gálico como padrão de referência. O reagente Folin-Ciocalteu é formado a partir de heteropoliácidos fosfomolibdicos e fosfotungsticos. Esse método envolve a oxidação de fenóis e a medida colorimétrica é feita pela formação de um

complexo azul Mo-W. Alíquotas de 0,5  $\mu\text{L}$  das amostras foram adicionados de 2,5 mL do reagente Folin-Ciocalteu 10%, e posteriormente adicionado de carbonato de sódio 4%. A mistura foi deixada em repouso por 2 horas ao abrigo da luz, e as leituras foram realizadas em espectrofotômetro a 740 nm. Uma amostra em branco foi produzida nas mesmas condições. Os resultados foram calculados com base em curva analítica e expressos em  $\text{mg EAG.g}^{-1}$  de tomilho (EAG: equivalente em ácido gálico). As análises foram realizadas em triplicata.

#### 4.4 DETERMINAÇÃO DE FLAVONOIDES TOTAIS

O teor de flavonoides totais foi determinado conforme metodologia descrita por Park et al. (1995), utilizando quercetina como padrão de referência. Alíquota de 0,5 mL do extrato foi adicionada de etanol 80 %, acetato de potássio e nitrato de alumínio. Uma amostra controle foi realizada paralelamente nas mesmas condições, porém, sem adição de nitrato de alumínio. Após 40 minutos de repouso, as leituras foram realizadas em espectrofotômetro a 415 nm. Os cálculos foram realizados a partir de curva analítica e os resultados expressos em  $\text{mg EQ.g}^{-1}$  de amostra (EQ: equivalente em quercetina). As análises foram realizadas em triplicata.

#### 4.5 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA

A análise de cromatografia líquida de alta eficiência foi realizada no Laboratório de Análise Instrumental da UTFPR – Câmpus Campo Mourão-PR. O extrato foi analisado por cromatografia líquida de alta eficiência em um sistema Dionex Ultimate 3000 (Dionex, Idstein, Alemanha) cromatógrafo equipado com RP-18 Acclaim® 120 coluna (4,6 mm x 250mm x 5  $\mu\text{m}$ ) e um conjunto de detector de diodos (HPLC/PDA). O EET foi filtrado através de um filtro de 0,22  $\mu\text{m}$  (Millipore) e injetado com 10  $\mu\text{L}$  do filtrado. A fase móvel consistiu de um gradiente linear de ácido fosfórico: água (1:100) (solvente A) e metanol (solvente B), começando com 5% de B e aumentando para 100% de B (45 minutos), mantendo a 100% de B durante 5 minutos e diminuindo a 5% de B (60 – 70 min) com uma taxa de fluxo de

solvente de 1 mL/min. Os compostos fenólicos foram identificados com base nos tempos de retenção e padrão de absorção de UV-Vis, e o pico de pureza confirmado pelo detector por arranjo de diodos (DAD) e software Chromeleon. A quantificação foi realizada por calibração externa (HAMINIUK et al., 2011). Foram examinados os seguintes padrões autênticos: ácido *p*-cumárico, ácido ferúlico, ácido siríngico, ácido gálico, quercetina, canferol, ácido trans-cinâmico, ácido cafêico, pinocebrina, crisina, rutina, galangina, miricetina e resveratrol.

#### 4.6 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

##### 4.6.1 Atividade antioxidante pelo método do sequestro do radical DPPH<sup>•</sup>

A medida da atividade antioxidante pelo método do sequestro do radical DPPH foi realizada segundo metodologia descrita por Brand-Williams et al. (1995), com algumas modificações. A mistura de reação foi constituída pela adição de 0,5 mL do extrato, 3,0 mL de etanol absoluto e 0,3 mL da solução do radical DPPH 0,5 mmol.L<sup>-1</sup> em etanol. Em paralelo foram realizadas amostras em branco com adição de etanol em substituição a solução de DPPH, para que, assim, pudesse ser descontada uma possível coloração que venha a influenciar na interpretação dos resultados. Foram realizadas em conjunto, amostras controle contendo 3,5 mL de etanol e 0,3 mL de solução do radical DPPH. Foi realizada curva padrão com o antioxidante sintético Trolox e os resultados foram expressos mmol de Trolox.g<sup>-1</sup> de amostra.

##### 4.6.2 Determinação da atividade antioxidante pelo método do radical ABTS<sup>•+</sup>

Este método foi realizado segundo metodologia descrita por Re et al. (1999), com algumas modificações. O radical ABTS<sup>•+</sup> foi formado pela reação de 5 mL de ABTS 7 mmol.L<sup>-1</sup> com persulfato de potássio 140 mmol.L<sup>-1</sup>, incubados à 25 °C por 16 horas, ao abrigo da luz. Logo após o tempo de reação, o radical foi diluído em etanol p.a. até apresentar absorbância entre 0,700 e 0,734 nm. Em ambiente escuro e em

triplicata, foram adicionados 30  $\mu\text{L}$  do extrato à 3 mL do radical corrigido. As absorbâncias foram lidas após seis minutos de reação, em espectrofotômetro a 734 nm, utilizando-se etanol como branco. A absorbância da mistura ABTS/Antioxidante foi comparada com a atividade do antioxidante sintético Trolox, que foi utilizado como padrão de referência. Os resultados da atividade foram expressos em  $\mu\text{mol}$  de trolox ou TEAC. $\text{g}^{-1}$  de amostra (atividade antioxidante equivalente ao Trolox).

#### 4.6.3 Atividade antioxidante pelo FRAP (Poder Antioxidante de Redução do Ferro)

A atividade antioxidante pelo método de redução do ferro – FRAP foi realizada segundo metodologia descrita por Pulido et al. (2000). O reagente FRAP foi preparado misturando-se solução de tampão acetato a 2,5 mL da solução TPTZ ( $10 \text{ mmol.L}^{-1}$  em  $40 \text{ mmol.L}^{-1}$  HCl) e 2,5 mL de cloreto férrico. Ao abrigo da luz e em triplicata, alíquotas de 100  $\mu\text{L}$  da amostra, previamente diluída, foram adicionadas à 3 mL do reagente FRAP e incubadas à  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  em banho-maria por 30 minutos. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro a 595 nm, sendo construída uma curva padrão com sulfato ferroso e os resultados expressos em  $\text{mmol}$  de  $\text{Fe}^{2+}.\text{g}^{-1}$  da amostra.

#### 4.6.4 Atividade antioxidante pelo sistema $\beta$ -caroteno/ácido linoleico

A medida da atividade antioxidante pelo sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico foi determinada segundo metodologia descrita por Ahn et al. (2004). Em triplicata, alíquotas de 300  $\mu\text{L}$  da amostra foram adicionadas a 3 mL da emulsão  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico, preparada previamente, e a solução foi incubada em banho-maria à  $50 \text{ }^\circ\text{C}$ , para reação de oxidação. A oxidação foi monitorada em espectrofotômetro a 470 nm, com leituras realizadas no tempo inicial e em intervalos de 20 min, até o tempo final de 100 minutos, utilizando etanol como branco. Para a amostra controle, foi utilizado 300  $\mu\text{L}$  de etanol 80% juntamente com 3 mL da emulsão. A atividade antioxidante foi expressa pela porcentagem de inibição relativa em relação ao controle depois de 100 min de incubação, usando a Equação (1):

$$\%AA = (DR_C - DR_S) / DR_C \times 100 \quad (\text{Eq. 1})$$

onde %AA representa a porcentagem de atividade antioxidante,  $DR_C$  a taxa de degradação da amostra controle ( $=\ln(a/b)/100$ );  $DR_S$  a taxa de degradação da substância teste ( $=\ln(a/b)/100$ );  $a$  absorvância inicial no tempo 0 e  $b$  a absorvância depois de 100 minutos.

#### 4.7 MICROENCAPSULAÇÃO DA AMOSTRA

As microcápsulas foram obtidas em secador por atomização, *spray dryer* de bancada, modelo MSD 1.0, da marca LABMAQ do Brasil, com vazão máxima de  $1\text{L.h}^{-1}$ . Esta planta de processamento e o equipamento se encontram na Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR), Câmpus Campo Mourão.

Através de estudos preliminares do grupo de pesquisa da UTFPR – Câmpus Campo Mourão, foram definidas as condições ótimas de operação do secador, à  $150\text{ }^\circ\text{C}$  e  $100\text{ }^\circ\text{C}$  do ar de secagem de entrada e saída do secador, respectivamente. Bico atomizador de 1,0 mm de diâmetro, fluxo de ar comprimido de  $50\text{ L.min}^{-1}$ , fluxo de ar de secagem de  $3,6\text{ m}^3.\text{min}^{-1}$  e vazão de alimentação de  $0,60\text{ L.h}^{-1}$ .

Os extratos concentrados obtidos em 4.2 foram adicionados de soluções contendo combinação de 70 % de maltodextrina comum (DE 10) e 30 % de amido modificado comercial Capsul<sup>®</sup>.

O material encapsulante foi dissolvido em 50 mL de água destilada fria sob agitação mecânica constante, até completa dissolução. Em seguida, foram adicionados mais 50 mL de água a  $90\text{ }^\circ\text{C}$  sob agitação por, aproximadamente, 2 minutos. O conjunto (encapsulante – água) foi aquecido em forno microondas até apresentar fervura. Após resfriar, o conjunto foi levado à agitação constante a 4000 rpm e, em seguida, foi adicionado o extrato lentamente, permanecendo em constante agitação por 5 minutos. A concentração de sólidos totais foi fixada em 20%. A emulsão resultante foi atomizada em *spray dryer*.

O pó obtido foi acondicionado em embalagem hermeticamente fechada e a respectiva embalagem foi armazenada a temperatura de congelamento.

#### 4.7.1 Eficiência da encapsulação (%)

Foi considerada como eficiência de encapsulação a relação existente entre a quantidade de compostos fenólicos não encapsulados, presentes na superfície das micropartículas, e o total de compostos fenólicos que foram microencapsulados.

O experimento para eficiência da encapsulação foi dividido em duas partes, sendo a primeira a de extração dos compostos fenólicos que não foram microencapsulados (item 4.7.1.1), e a segunda parte a ruptura das micropartículas, para quantificação dos compostos fenólicos que nelas estavam contidos (item 4.7.1.2).

A eficiência de encapsulação foi calculada usando a seguinte equação:

$$\text{Eficiência de encapsulação (\%)} = (FT - FS) / FT \times 100 \quad (\text{Eq 2})$$

Onde FT (fenólicos totais após a ruptura) é a quantidade de compostos fenólicos de uma quantidade conhecida de microcápsulas e FS (fenólicos da superfície) a quantidade de compostos fenólicos contidos na mesma quantidade de microcápsulas (SEMALAT et al., 2009).

##### 4.7.1.1 Extração dos compostos fenólicos não microencapsulados

Para extrair os compostos fenólicos localizados nas superfícies das micropartículas foram dissolvidos 0,2 g do tomilho microencapsulado em 2,0mL de etanol. A mistura foi agitada num agitador tubo e centrifugada a 4000xg durante 2 minutos. Em seguida foi quantificado o teor de compostos fenólicos do sobrenadante em espectrofotômetro UV, conforme metodologia descrita no item 4.7.1.3. O resultado obtido foi utilizado para cálculos da eficiência da encapsulação (item 4.7.1).

#### 4.7.1.2 Ruptura das micropartículas para liberação dos compostos fenólicos microencapsulados

A ruptura das micropartículas foi realizada a fim de avaliar a eficiência da microencapsulação. Segundo metodologia descrita por Nori et al. (2011), 0,2 g de tomilho microencapsulado foi adicionado de 2,0mL de citrato de sódio 10% (m/v). Em seguida, o pH foi elevado para 8,0 com solução de NaOH 0,1 mol.L<sup>-1</sup>. Esta mistura foi agitada num misturador de tubo vortex por dois minutos. Em seguida, 5,0 mL de etanol 99,5% (v/v) foram adicionados à mistura, mantendo em agitação durante mais dois minutos. A mistura foi centrifugada a 4000xg durante vinte minutos. Em seguida, foi quantificado o teor de compostos fenólicos em espectrofotômetro UV, conforme descrito no item 4.7.1.3. O resultado obtido foi utilizado para cálculos da eficiência da encapsulação (item 4.7.1).

#### 4.7.1.3 Compostos fenólicos para eficiência da microencapsulação

Para análise de eficiência da microencapsulação foi realizado análise de compostos fenólicos totais segundo metodologia descrita por Singleton et al. (1999), porém com algumas modificações. Em um tubo com tampa de rosca, foi preparada uma solução contendo 0,1 mL das amostras (produtos dos itens 4.7.1.1 e 4.7.1.2), diluídas em 3,0 mL de água destilada e 0,25 mL de reagente Folin-Ciocalteu. Após três minutos de repouso foram adicionados 2,0 mL de solução de carbonato de sódio a 7,5 %. Logo após, o tubo foi devidamente tampado e encubado em banho maria à 37 °C por trinta minutos. A seguir, foram feitas leituras das absorbâncias em espectrofotômetro a 765 nm. Uma amostra branca foi realizada utilizando 2,0 mL da solução de carbonato de sódio a 7,5% e 3,0 mL de água destilada.

Os teores de compostos fenólicos totais foram determinados por interpolação da absorbância das amostras em uma curva de calibração construída com padrões de ácido gálico (50 a 500 mg.L<sup>-1</sup>).

Os resultados obtidos foram utilizados para cálculos da eficiência da encapsulação (item 4.7.1).

#### 4.7.2 Análise da estrutura das microcápsulas

A estrutura e morfologia das microcápsulas foram observadas em microscópio eletrônico de varredura (MEV), TM-3000 *Hitachi Tabletop Microscope* da UTFPR, Câmpus Pato Branco.

Pequenas quantidades de amostra foram colocadas na superfície de fitas dupla face, fixadas em *stubs*. A amostra foi observada sistematicamente sob ampliações a 1500, 2000, 3000 e 4000 vezes.



## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 AMOSTRAS

Após colheita, as partes aéreas do tomilho foram secas em estufa a 40 °C, por aproximadamente, 72 horas. A amostra foi moída em moinho de facas Marconi modelo MA – 630. O preparo do extrato etanólico foi realizado com etanol 80 % (v/v) em incubadora Shaker Modelo SL 222, a 40°C, por 60 minutos. Em seguida, foi realizada uma filtração em papel de filtro Whatman nº 5, e o filtrado (EET) foi transferido para tubos de ensaio com tampas de rosca. Com os extratos foram realizadas análises de fenólicos totais, flavonoides totais, CLAE e atividade antioxidante. Posterior as análises, o extrato foi concentrado para microencapsulação, até se obter uma solução com, aproximadamente, 20 % de sólidos solúveis totais (°Brix).

### 5.2 TEOR DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS E FLAVONOIDES TOTAIS

Os compostos fenólicos têm sido estudados devido a sua influência na qualidade e estabilidade dos alimentos, fazem parte desse grupo uma gama enorme de substâncias que, por sua constituição química, possuem propriedades antioxidantes. Tais compostos são multifuncionais como antioxidantes, podendo atuar no combate aos radicais livres, quelando metais de transição, interrompendo a reação de propagação dos radicais livres na oxidação lipídica, modificando o potencial redox do meio e reparando a lesão das moléculas atacadas pelos radicais livres (SOARES, 2002; OETTERER, 2006).

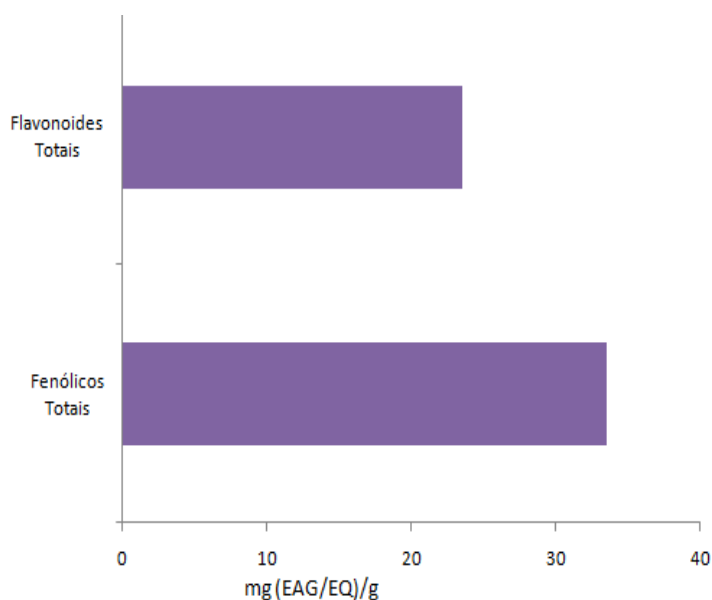
As propriedades biológicas de compostos fenólicos estão relacionadas com atividade antioxidante que cada fenol exerce sobre determinado meio. Para se medir a capacidade antioxidante é necessária a extração dos compostos fenólicos e, em geral, soluções de etanol ou metanol contendo um pouco de água são mais efetivos na extração de compostos fenólicos do que solventes puros (RICE-EVANS et al., 1997).

A Tabela 2 apresenta os resultados dos teores de compostos fenólicos e flavonoides totais do extrato de tomilho (*Thymus vulgaris L.*) (Figura 14).

**Tabela 2 - Teor de compostos fenólicos e flavonoides totais do EET**

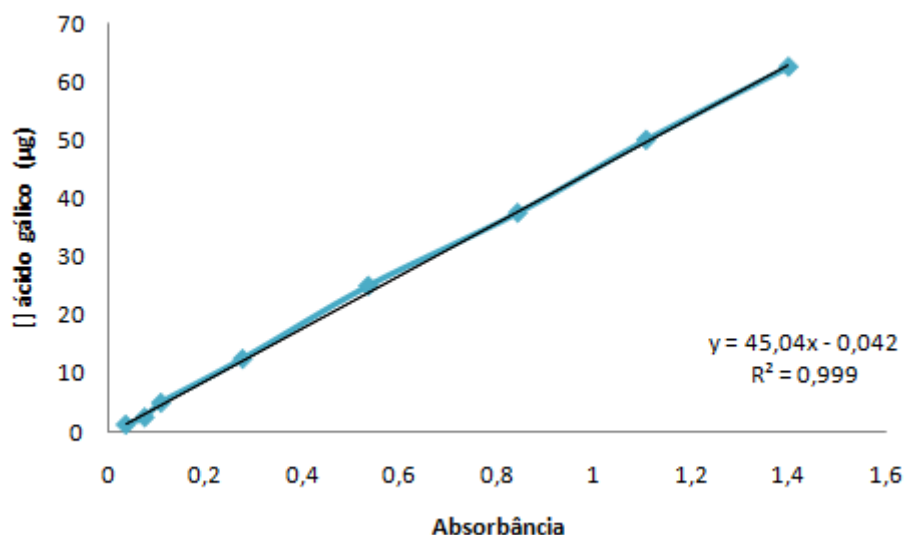
<i>Amostra</i>	<i>Fenólicos totais (mg EAG*.g<sup>-1</sup> de amostra)</i>	<i>Flavonoides totais (mg EQ**g<sup>-1</sup> de amostra)</i>
Tomilho***	33,55±0,45	23,46±0,10

Valores representam a média das triplicatas ± desvio padrão; \*\*\*500ppm; \*EAG: Equivalente em ácido gálico; \*\*EQ: Equivalente a quercetina.



**Figura 14 - Compostos fenólicos e flavonoides totais dos EET.**

O teor de compostos fenólicos totais foi calculado através da equação da reta de uma curva padrão de ácido gálico ( $R^2=0,999$ ) (Figura 15). Durante o ensaio foi observado o gradiente de coloração da curva padrão que variou de azul intenso até azul claro.



**Figura 15 - Curva Padrão de Ácido Gálico para análise de compostos fenólicos totais.**

Katalinic et al. (2006) trabalharam com 70 amostras de plantas medicinais e também determinaram a concentração de compostos fenólicos pelo método de Folin-Ciocalteu. Entre suas amostras, analisaram a erva tomilho encontrando 87,6 mg EAG.g<sup>-1</sup> de tomilho. Dormana et al. (2003) também estudaram amostra de tomilho e encontraram valores de 95,6 mg EAG.g<sup>-1</sup> de amostra. Ambos os valores mencionados foram superiores ao encontrado pelo presente estudo, que foi de 33,55 mg EAG.g<sup>-1</sup> de tomilho (Tabela 2).

O total de compostos fenólicos de extrato etanólico e aquoso de tomilho também foram analisados por Mata et al. (2007), usando método de Folin-Ciocalteu. Os valores encontrados foram de 113 e 74,9 mg EAG.g<sup>-1</sup> de amostra, para extrato etanólico e aquoso, respectivamente. O resultado apresentado também é superior ao encontrado pelo presente estudo, porém evidencia a eficiência do extrato etanólico perante o extrato aquoso

Esses resultados também são superiores aos reportados por Zácari (2008), que determinou compostos fenólicos de cinco plantas pelo método de Folin-Ciocalteu, sendo que, das plantas analisadas, o orégano e o tomilho foram as ervas que se destacaram apresentando maiores concentrações de compostos fenólicos. Para o tomilho foi encontrada concentração de 25,75 mg EAG.g<sup>-1</sup> de erva seca em laboratório e 21,90 mg EAG.g<sup>-1</sup> de erva seca industrialmente. Esses valores são inferiores ao encontrado pelo presente estudo que encontrou 33,55 mg EAG.g<sup>-1</sup> de tomilho (Tabela 2).

Zeng e Wang (2001) determinaram a capacidade antioxidante e o teor de compostos fenólicos de 27 ervas culinárias e 12 medicinais. Entre as amostras analisadas estava o tomilho que apresentou 2,13 mg de ácido gálico por grama de amostra, valor este bem abaixo do encontrado pelo presente estudo.

As variações aqui apresentadas podem estar relacionadas ao cultivar, ao efeito do genótipo, a sazonalidade, as condições de crescimento e época de colheita da planta, que influenciam as concentrações de fenólicos numa variedade de plantas (POIROUX-GONORD et al., 2010).

A maneira mais precisa de se identificar e quantificar flavonoides em produtos naturais é a análise por cromatografia líquida de alta eficiência. Entretanto, faz-se necessário a introdução de alternativas mais simples e baratas que permitam análise rápida. Uma das técnicas que se adéquam a esse contexto é a determinação de flavonoides totais por espectrofotometria na região do UV, utilizando nitrato de alumínio. Nesse método, o cátion alumínio forma complexos estáveis com os flavonoides em etanol, ocorrendo na análise espectrofotométrica um desvio para maiores comprimentos de onda e uma intensificação da absorção. Na análise a leitura é feita em espectrofotômetro a 415 nm, utilizando-se nitrato de alumínio em etanol. Assim, o complexo flavonóide-Al absorve em comprimento de onda bem maior do que o flavonoide sem a presença do agente complexante (MARCUCCI et al., 1998).

O teor de flavonoides totais foi calculado através da equação da reta de uma curva de quercetina ( $R^2=0,999$ ) (Figura 16). O resultado encontrado foi de 23,46 mg EQ.g<sup>-1</sup> de tomilho (Tabela 2).

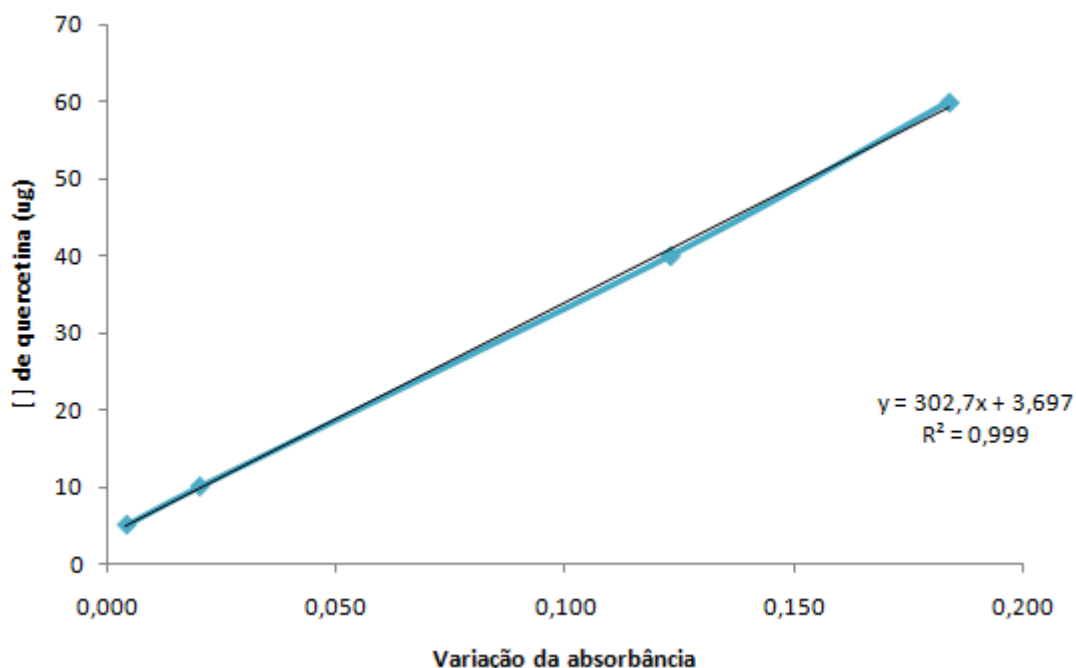


Figura 16 - Curva Padrão de quercetina para análise de compostos flavonoides totais.

Poucos são os resultados encontrados na literatura para análise de compostos flavonoides totais do tomilho, o que caracteriza a importância dessa análise no presente estudo. Porém, o manjeriço membro da família *Lamiaceae* foi estudado por Genovese et al. (2011) quanto ao seu teor de compostos flavonoides totais e foi encontrado valores de 8,65 mg EQ.g<sup>-1</sup>. Assim sendo, o tomilho apresentou melhores valores quando comparado ao manjeriço.

### 5.3 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA

Realizar a caracterização química de uma amostra através dos métodos espectrofotométricos de quantificação de compostos fenólicos totais, flavonoides totais e CLAE traz a perspectiva do quão promissor são as propriedades bioativas da amostra, uma vez que estão relacionadas à atividade antioxidante. Muitos autores encontram uma correlação positiva entre quantidade de fenólicos e a capacidade antioxidante em alimentos (FALLARERO, 2003; KUSKOSKI, 2005).

A utilização da técnica analítica CLAE, visou identificação e quantificação de compostos fenólicos presentes no extrato etanólico de tomilho. A identificação dos compostos da amostra foi realizada utilizando detector de arranjo de diodo, comparando-se o tempo de retenção, o espectro de absorção e cromatografias com os padrões disponíveis. Os resultados da análise quantitativa e qualitativa se encontram na Tabela 3.

**Tabela 3 -Compostos fenólicos identificados na análise cromatográfica do EET.**

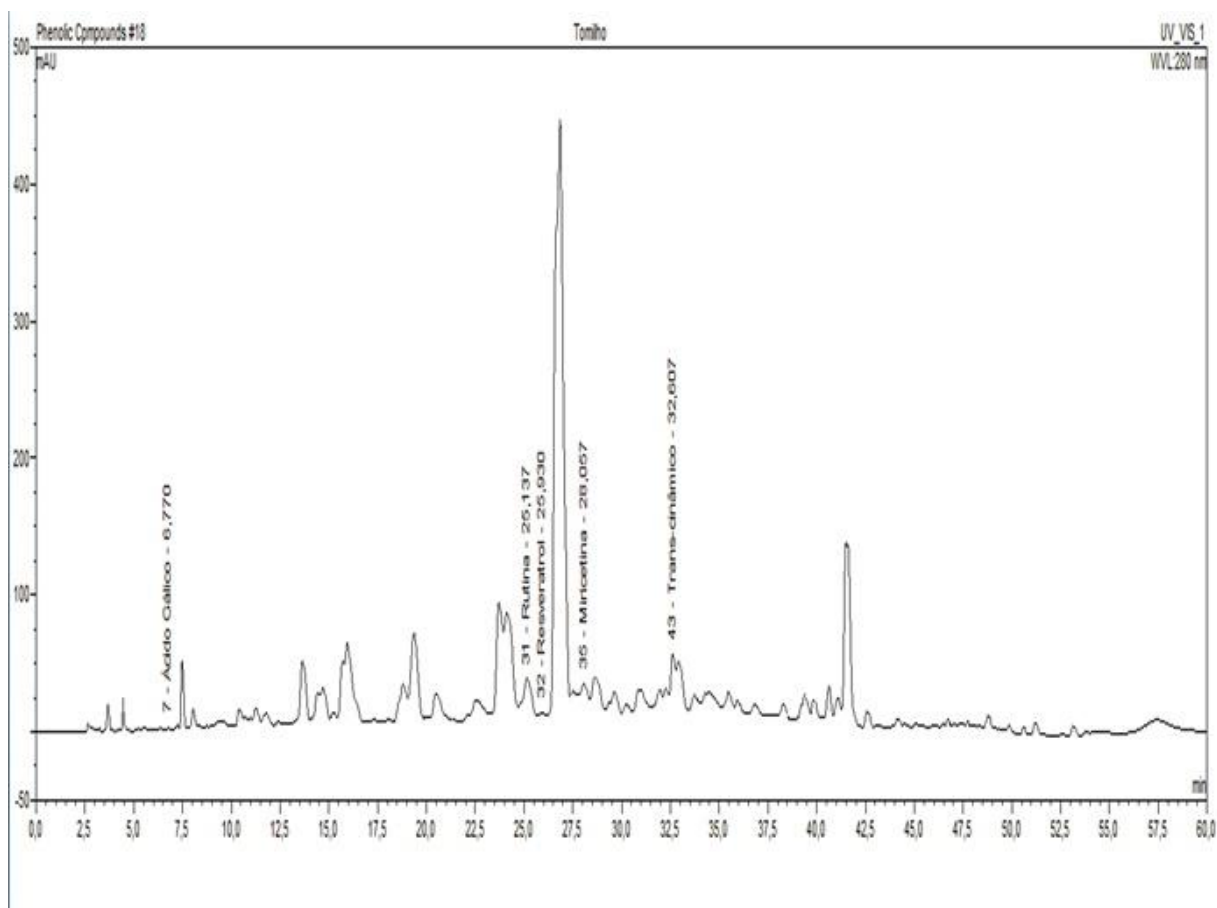
<b>Compostos fenólicos</b>	<b>Comp. De onda (nm)</b>	<b>TR (min)*</b>	<b>Tomilho (mg.100g<sup>-1</sup>)</b>
Ácido gálico	280	6,77	0,489
Rutina	370	25,14	44,113
Resveratrol	320	25,93	0,967
Miricetina	320	28,057	18,067
Ácido trans-cinâmico	320	32,61	4,816

\*TR: Tempo de Retenção em minutos.

O perfil cromatográfico do EET indicou a presença de vários compostos com perfis distintos, aproximadamente, 78 compostos, entretanto, só foi possível identificar e quantificar cinco compostos fenólicos, sendo dois ácidos fenólicos (ácido gálico e ácido trans-cinâmico), dois flavonoides (rutina e miricetina) e o polifenol resveratrol (Tabela 3).

Os compostos identificados para o EET variam de 44,113 mg.100g<sup>-1</sup> a 4,816 mg.100g<sup>-1</sup> de planta, sendo o majoritário a rutina e o minoritário o ácido gálico (Tabela 3).

O cromatograma representativo com absorção de 280nm é apresentado na Figura 17, o qual demonstra uma composição complexa com vários picos em diferentes tempos de retenção.



**Figura 17 - Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) do EET.**

As espécies da família *Lamiaceae*, como o tomilho, são conhecidas por conter uma série de metabólitos secundários, assim sendo, Roby et al. (2013) analisaram extratos de manjerona, sálvia e tomilho por CLAE e foram encontrados, com base em comparação por padrões autênticos e tempo de retenção, os compostos ácido cafeico, ácido *p*-cumárico, ácido ferúlico, ácido cinâmico e ácido rosmarínico em ambos os extratos.

Park (2011) analisou os principais compostos fenólicos do manjeriço, tomilho, hortelã, orégano, sálvia e alecrim por CLAE e foi identificado o ácido rosmarínico como sendo o de maior atividade antioxidante. Também foram identificados o ácido gálico, o ácido cafeico e o ferúlico, todos com elevado potencial antioxidante.

Hossain et al. (2010) analisaram quatro ervas da família *Lamiaceae* por CLAE, tomilho, orégano, sálvia e manjeriço. Foram identificados cerca de trinta e oito compostos diferentes por comparação dos tempos de retenção e espectros de absorção. Os compostos encontrados foram ácidos hidroxicinâmicos, derivados de

ácidos hidroxibenzóicos e flavonoides. Para o tomilho foram identificados e quantificados compostos como ácido gálico, ácido cafeico, ácido siríngico, ácido vanílico, ácido *p*-cumárico, ácido ferúlico, rutina, ácido rosmarínico, quercetina e timol.

Wojdylo et al, 2007 em estudo com 32 plantas também encontrou diferença significativa nos resultados obtidos por espectrofotometria e CLAE para compostos fenólicos. Pelos dados obtidos foram identificados e quantificados, para o tomilho, os compostos fenólicos ácido cafeico e ácido ferulico, sendo o cafeico, o majoritário.

#### 5.4 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELOS MÉTODOS ABTS<sup>•+</sup>, DPPH<sup>•</sup>, FRAP E β-CAROTENO/ÁCIDO LINOLEICO

Diversas técnicas têm sido empregadas para avaliar a atividade antioxidante *in vitro*, de forma a permitir uma rápida seleção de substâncias potencialmente interessantes. A realização de mais de um ensaio é recomendado, visto que os princípios dos métodos variam de acordo com a matriz do meio reacional (MELO, 2010).

Para determinação da atividade antioxidante, quatro métodos distintos, com diferentes princípios foram utilizados, visando caracterizar a atividade biológica da amostra. A fim de comparar a amostra com antioxidantes já reconhecidos pela indústria alimentícia, foram utilizados como controles positivos o BHA e o BHT (Tabela 4).

**Tabela 4 - Atividade Antioxidante obtida para o tomilho pelos métodos: ABTS, FRAP, DPPH e β-caroteno.**

	ABTS <sup>•+</sup> ( $\mu\text{mol TEAC}^{\cdot}\cdot\text{g}^{-1}$ )	FRAP ( $\mu\text{mol de Fe}^{2+}\cdot\text{g}^{-1}$ )	DPPH <sup>•</sup> ( $\text{mmol de trolox}\cdot\text{g}^{-1}$ )	β-caroteno (%)
Tomilho	265,79±3,02	314,72±6,04	132,29±1,8	89,62±0,48 <sup>***</sup>
BHA <sup>**</sup>	3173,33,22±98,42	3288,32±240,45	474,04±10,0	68,06±0,22
BHT <sup>**</sup>	2662,22±96,47	2960,75±76,67	427,33±12,67	63,68±0,18

Valores representam a média das triplicatas ± desvio padrão; <sup>•</sup>TEAC: capacidade equivalente em trolox; <sup>\*\*\*</sup>3000ppm; <sup>\*\*</sup>100ppm.



A atividade antioxidante pelo método do DPPH<sup>•</sup> é determinada por uma substância sequestradora do radical DPPH<sup>•</sup>. O composto antioxidante age como doador de átomos de hidrogênio, quando este é adicionado à solução alcoólica de DPPH<sup>•</sup> obtém-se a hidrazina e a coloração da solução é modificada de violeta para amarelo pálido (ALVES et al., 2010).

O resultado para atividade antioxidante pelo método do DPPH<sup>•</sup> foi calculado com base em equação da reta de uma curva padrão ( $R^2=0,998$ ). Os resultados foram expressos em mmol de trolox.g<sup>-1</sup>, sendo 132,29 mmol de trolox.g<sup>-1</sup> de tomilho (Tabela 4).

Gonçalves et al. (2013), em seu estudo da atividade antioxidante de infusões de plantas medicinais do mediterrâneo, analisaram Tomilho (*Thymus lotocephalus*) pelo método do DPPH<sup>•</sup> seguindo metodologia de Brand-Williams et al. (1995), e encontraram valores de 2,56±0,18 mmol trolox.g<sup>-1</sup> de amostra para infusão fria e 19,50±0,02 mmol trolox.g<sup>-1</sup> de amostra para infusão quente. Valores estes inferiores ao que foi encontrado pelo presente estudo.

O método ABTS<sup>•+</sup> baseia-se na avaliação da atividade antioxidante total pela captura do radical livre ABTS<sup>•+</sup>, assim o potencial antioxidante é determinado pela descoloração do ABTS<sup>•+</sup> na presença de agentes antioxidantes, medindo-se tal redução em espectrofotômetro. O resultado foi calculado a partir da equação da reta de uma curva padrão de trolox ( $R^2=0,999$ ), e os resultados expressos em µmol de TEAC.g<sup>-1</sup> de amostra, sendo 265,79 µmol de TEAC.g<sup>-1</sup> de tomilho (Tabela 4).

Os métodos pela captura dos radicais livres ABTS<sup>•+</sup> e DPPH<sup>•</sup> estão entre os mais empregados na avaliação do potencial antioxidante de frutas e vegetais. Ambos são caracterizados por apresentarem excelente reprodutibilidade sob determinadas condições de ensaio, mas eles também apresentam diferenças singulares. O método do DPPH<sup>•</sup> não requer preparo prévio especial, ao passo que o método do ABTS<sup>•+</sup> necessita ser gerado por enzimas ou reações químicas. Outra diferença importante esta no fato de que o ABTS<sup>•+</sup> pode ser solubilizado tanto em meios orgânicos quanto em meios aquosos, onde a atividade antioxidante pode ser medida considerando-se a natureza hidrofílica e lipofílica dos compostos em análise. Ao contrário deste, o método do DPPH<sup>•</sup> só pode ser dissolvido em meios orgânicos limitando assim a interpretação do papel dos antioxidantes hidrofílicos (WOJDYLO et al., 2007)

O ensaio FRAP (Poder Antioxidante de Redução do Ferro), baseia-se na avaliação direta da capacidade de um antioxidante reduzir  $\text{Fe}^{3+}$  em  $\text{Fe}^{2+}$ , redução do complexo ferritripiridiltriazina ( $\text{Fe}^{3+}$  - TPTZ) a ferroso tripiridiltriazina ( $\text{Fe}^{2+}$  TPTZ) que é caracterizada pela formação de um complexo de cor azul intenso com o  $\text{Fe}^{2+}$  (RUFINO et al., 2006).

O resultado da atividade antioxidante pela redução do ferro para o extrato de tomilho foi calculado a partir da equação da reta obtida pela curva padrão de sulfato ferroso ( $R^2= 0,998$ ), onde foi possível quantificar a concentração de  $\text{Fe}^{2+}$  presente em solução, sendo  $314,72 \mu\text{mol de Fe}^{2+} \cdot \text{g}^{-1}$  de tomilho (Tabela 4).

Wojdylo et al. (2007), avaliaram a atividade antioxidante de trinta e duas ervas da Polônia pelos métodos DPPH $\cdot$ , ABTS e FRAP. Dentre as ervas analisadas estava o tomilho que apresentou resultados de  $295 \mu\text{mol de trolox} \cdot 100\text{g}^{-1}$  de amostra para DPPH $\cdot$  que, devido à diferença na expressão dos resultados, dificulta uma comparação. O mesmo ocorreu com os resultados apresentados pelos autores para análise de ABTS e FRAP que foram expressos em  $\mu\text{mol de trolox} \cdot 100\text{g}^{-1}$  de amostra, sendo  $35,4 \mu\text{mol de trolox} \cdot 100\text{g}^{-1}$  para ABTS e  $694 \mu\text{mol de trolox} \cdot 100\text{g}^{-1}$  para FRAP. Essas diferenças na forma de expressar os resultados impedem uma comparação mais aprofundada dos mesmos.

Segundo Alves et al. (2010), o método pelo sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico nos permite analisar o potencial de uma determinada substância de inibir, ou retardar, a oxidação do  $\beta$ -caroteno, protegendo-o dos radicais livres produzidos na peroxidação do ácido linoleico. Assim, os resultados são expressos em porcentagem de inibição da oxidação, sendo que o tomilho inibiu 89,61 %, na concentração final de 3000 ppm (Tabela 4).

Segundo Tiveron (2010), um dos fatores de grande influência nesta análise é o meio reacional, que se caracteriza por uma emulsão, apresentando regiões polares e apolares ao mesmo tempo. Assim, dependendo da polaridade da amostra, esta poderá interagir de maneira diferente com a emulsão.

Del Ré et al. (2011) avaliaram amostras de orégano, manjerição e tomilho da cidade de Bebedouro –SP, pelo método da oxidação do  $\beta$ -caroteno induzido por produtos de degradação oxidativa (ácido linoleico). Os resultados obtidos foram semelhantes entre as amostras, sendo o orégano e o tomilho os que apresentaram os melhores resultados, 54,78% e 52,32%, respectivamente. Por critério de

comparação, foi utilizado o padrão comercial BHT (100 mg.Kg<sup>-1</sup>) que apresentou uma atividade superior, 89,33%.

A presença de antioxidante no sistema protege o ácido linoleico prorrogando a formação de radicais livres e, conseqüentemente, a oxidação do  $\beta$ -caroteno.

O extrato de tomilho foi comparado com os antioxidantes sintéticos comerciais BHA e BHT (Tabela 4), que foram utilizados como padrões de referência, sendo estes analisados na concentração final de 100 ppm, para os quatro métodos de avaliação da atividade antioxidante realizados neste estudo. Entre os controles positivos testados, o que apresentou melhor resultado em todos os métodos avaliados foi o BHA.

Quando se compara os valores apresentados pelos antioxidantes sintéticos e pelo extrato de tomilho (Tabela 4), verifica-se que a amostra apresenta valores inferiores em três dos quatro métodos avaliados. Isso pode ser explicado pelo fato de que os antioxidantes sintéticos são analisados na sua forma pura e são reconhecidos por apresentarem alto poder antioxidante.

No método sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico, o extrato de tomilho apresentou percentuais superiores aos padrões sintéticos BHA e BHT (Tabela 4). Entretanto, os compostos sintéticos, mesmo em concentração menor, apresentaram boa capacidade antioxidante indicando, dessa forma, maior atividade antioxidante.

Trabalhos disponíveis na literatura sobre a atividade antioxidante do extrato tomilho (*Thymus vulgaris L.*), envolvendo as matrizes dos métodos aqui analisados, são escassos, o que caracteriza a importância deste trabalho. Devido às diferenças de especificidade entre os métodos não foi possível empregar quantias iguais de extrato em cada ensaio. Dessa forma, em vista do uso de concentrações distintas e das diferentes formas de expressar os resultados, torna-se difícil uma comparação.

Considerando a preocupação atual com os efeitos adversos que os antioxidantes sintéticos podem causar ao organismo, os extratos de especiarias como o tomilho apresentam-se como fontes acessíveis de antioxidantes naturais. Sua adição a dieta pode evitar a deterioração oxidativa em vários sistemas, além de servir como suplemento alimentício e farmacêutico.

Muitas evidências demonstram que novos antioxidantes podem ser incorporados aos alimentos em substituição aos antioxidantes sintéticos. Porém, apesar de toda pesquisa existente em volta dos antioxidantes, poucos são relacionados à atuação destes *in vivo*, o que dificulta sua aplicação. Outro empecilho

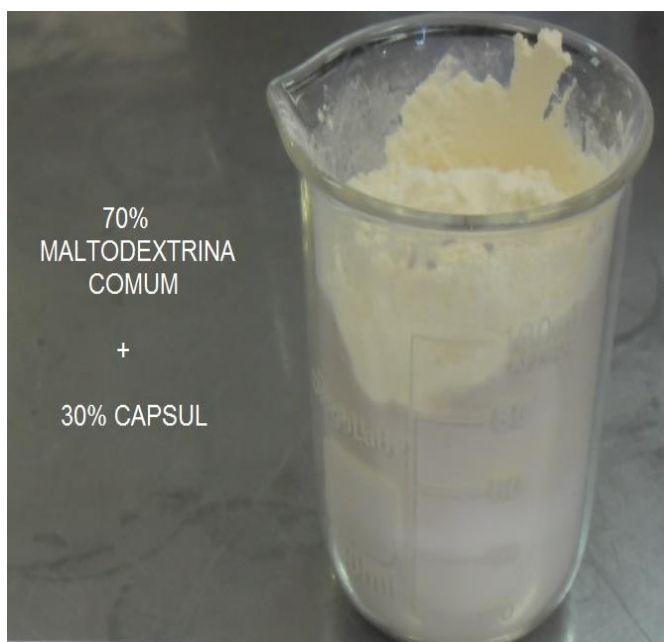
quanto ao uso dos antioxidantes naturais pela indústria de alimentos esta no fato de estes não se encontram em sua forma pura, ao passo que os compostos sintéticos são evidentemente eficazes. Uma alternativa interessante é a utilização dos antioxidantes naturais em sinergismo com os sintéticos, visando diminuir as concentrações desses nos alimentos.

Estudos relacionados à substituição dos antioxidantes sintéticos pelos naturais estão em ascensão, porém o emprego efetivo desses em produtos processados pode ocasionar mudanças nas características organolépticas dos produtos. As ervas aromáticas, por exemplo, apresentam odor e aroma bem característicos e coloração forte que pode acarretar efeito sensorial negativo. Uma alternativa a este problema é apresentada pelos processos de microencapsulação.

## 5.5 MICROENCAPSULAÇÃO

Atualmente, o crescente interesse de algumas indústrias de alimentos para encontrar aditivos naturais, tem aumentado esforços tanto na obtenção de compostos bioativos a partir de matérias-primas naturais, quanto no desenvolvimento estável e funcional de produtos derivados. A microencapsulação se apresenta como um método alternativo que pode reduzir problemas encontrados pela indústria de alimentos na aplicação de matérias-primas naturais. Esta técnica pode ser utilizada para proteger os produtos de condições ambientais adversas, prolongar a vida útil de produtos alimentares e mascarar compostos com sabores desagradáveis (SILVA et al., 2013).

Na microencapsulação, a formação da emulsão tem papel crucial na obtenção de um bom resultado do processo. A emulsão foi preparada conforme metodologia no item 4.6., a partir da mistura de 70 % de maltodextrina comum (DE 10) e 30 % de Capsul<sup>®</sup> (Figura 18), que foi utilizada como material de parede.



**Figura 18 - Componente da emulsão Maltodextrina e Capsul.**

Numerosos materiais de parede ou agentes encapsulantes estão disponíveis para uso em alimentos, sendo que as maltodextrinas estão entre as mais comuns. Porém para melhorar as características da emulsão são utilizadas misturas de maltodextrinas e biopolímeros, como os amidos modificados.

A emulsão produzida deveria se manter estável durante todo processo de microencapsulação por *spray drying*, que tem um tempo de duração em torno de 50 minutos. Durante o tempo de observação a emulsão se manteve estável e nenhuma separação de fases foi observada (Figura 19). Segundo Barbosa et al. (2005), quanto mais estável for a emulsão mais eficiente será a encapsulação.



**Figura 19 - Emulsão Homogeneizada em Ultraturax (Tomilho - Maltodextrina - Capsul).**

As microcápsulas do presente estudo foram produzidas em *spray dryer* modelo MSD 1.0, da marca LABMAQ do Brasil, com vazão máxima de  $1\text{L}\cdot\text{h}^{-1}$ . O *spray dryer* utilizado para secagem (Figura 20) é constituído principalmente por um sistema de entrada da amostra, câmara de secagem, ciclone e sistema coletor de amostra.



**Figura 20 - Spray Dryer utilizado para microencapsulação da amostra de tomilho.**

Os principais fatores que devem ser cuidados na secagem por aspersão são: temperatura de alimentação, temperatura de entrada de ar, e temperatura de saída de ar. A temperatura de alimentação modifica a viscosidade da emulsão e conseqüentemente a sua capacidade de secar de forma homogênea (RÉ, 1998). As temperaturas utilizadas foram de 150 °C e 100°C do ar de secagem de entrada e saída do secador, respectivamente.

A alimentação deve ser ajustada para assegurar que cada partícula atinja o nível de secagem desejado antes mesmo de entrar em contato com a câmara de secagem (RÉ, 1998). O presente estudo utilizou fluxo de ar de secagem de 3,6 m<sup>3</sup>.min<sup>-1</sup> e vazão de alimentação de 0,60 L.h<sup>-1</sup>.

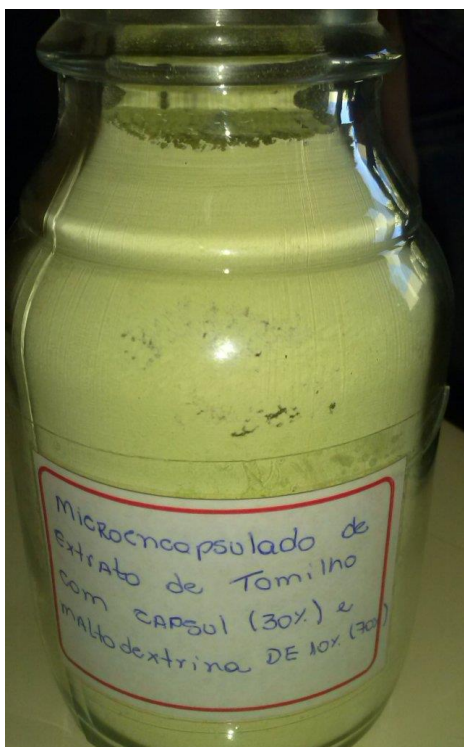
A maior perda de voláteis se dá durante os estágios iniciais da microencapsulação por *spray-dryer*, antes da formação da crosta de secagem na superfície das partículas. Entretanto, o emprego de emulsionantes ou amidos modificados, podem modificar as propriedades de secagem das microesferas, diminuindo perdas (REINECCIUS, 1995).

A microencapsulação por *spray drying* é muito utilizada na encapsulação de ingredientes alimentícios como aromas, lipídios e corantes. Como um processo de secagem é caracterizado por aprisionar o material ativo numa matriz junto ao encapsulante e, durante o processo, a evaporação do solvente é muito rápida e o aprisionamento do material ativo é quase que instantâneo (HORST, 2009).

Segundo Azeredo (2005), a rápida evaporação do solvente se dá devido a alta relação da área de superfície/volume das partículas durante a microencapsulação. Assim, o tempo de exposição das partículas ao calor é relativamente curto (poucos segundos), e a temperatura do núcleo não ultrapassa a temperatura de saída do atomizador, reduzindo assim, alterações indesejáveis em compostos termossensíveis.

O produto final da secagem foi caracterizado como pó verde, leve e de fácil dispersão em água (Figura 21). Uma vez encapsulado, o tomilho em pó pode ser facilmente transportado e armazenado, apresentando assim características interessantes para a indústria.





**Figura 21 - Tomilho, após secagem, produzido por *spray drying*.**

Dormann et al. (2013) produziram microencapsulado de suco de maracujá por *spray drying* e, ao final do processo obtiveram pó também facilmente diluído em água, com leve aroma e sabor de maracujá. O encapsulante utilizado nesse estudo foi o Capsul<sup>®</sup> que, segundo os autores, conseguiu reter de forma excelente a vitamina C presente no suco de maracujá.

#### 5.5.1 Eficiência da Microencapsulação

Através de ensaios realizados conforme metodologia descrita nos item 4.7.1, foi calculada a eficiência da microencapsulação. A eficiência da encapsulação define a quantidade de substância retida no interior das microesferas e depende, entre outros fatores, da afinidade entre o material de parede e a substância microencapsulada. O resultado encontrado para a eficiência da encapsulação foi de 68%, com base em equação descrita no item 4.7.1.

Carneiro et al. (2013), analisaram diferentes materiais de parede quanto a eficiência da microencapsulação de óleo de linhaça por *spray drying*, e obtiveram

valores que variaram de 62,3 a 95,7 % de eficiência, sendo a mistura de maltodextrina/Capsul<sup>®</sup> a segunda melhor.

Resultados semelhantes foram encontrados por Charve e Reineccius (2009) ao estudarem a retenção de voláteis em micropartículas produzidas por *spray drying*, onde as partículas produzidas com amido modificado mostraram maior retenção de óleo, quando comparado partículas produzidas com goma arábica e com proteína de soro de leite.

Materiais derivados de amido como  $\beta$ -cliclodextrina tem sido usado para microencapsular extratos fenólicos de amora preta obtendo-se uma eficiência de 52 % (ROSA, 2012). Nori et al. (2011) avaliaram microencapsulado de própolis com pectina e proteína isolada quanto a eficiência e obtiveram valores superiores ao encontrado pelo presente estudo (72,01 %).

### 5.5.2 Microscopia eletrônica de varredura

A análise estrutural das partículas do pó foi realizada por meio de microscopia eletrônica de varredura. Foram utilizadas quatro ampliações diferentes a fim de uma melhor visualização, sendo elas 1500, 2000, 3000 e 4000 vezes. As Figuras 22 e 23 mostram as fotomicrografias do pó de tomilho obtido por *spray drying*, onde se pode observar as estrutura externa (Figura 22) e interna (Figura 23).

A Figura 22 representa a estrutura externa das partículas preparadas de tomilho com mistura de maltodextrina e Capsul<sup>®</sup>, nas ampliações 2000 (a), 1500 (b), 4000 (c) e 3000 (d) vezes. Pode-se observar que as partículas não apresentaram fissuras ou rachaduras aparentes, o que é um ponto positivo uma vez que essa característica representa menor permeabilidade a gases externos e aumenta a proteção do material ativo. Resultados semelhantes foram encontrados por Muller (2011), na microencapsulação de óleo essencial de laranja com amido modificado e maltodextrina.

Também é possível visualizar a presença de micropartículas com volumes esféricos, porém com tamanhos irregulares, o que segundo Carneiro (2011) e Carneiro et al. (2013), é uma característica típica de partículas produzidas por *spray drying*. Características similares foram encontradas por Tonon et al. (2011) e por Trindade e Grosso (2000), na microencapsulação por *spray drying* de óleo de

linhaça e de ácido ascórbico, respectivamente. Segundo Martínez et al. (2004), dependendo do material utilizado na alimentação e das condições da operação, a produção do pó de secagem pode atingir dimensões que variam desde muito pequenas (10-50  $\mu\text{m}$ ) até partículas de grande dimensão (2-3 mm).

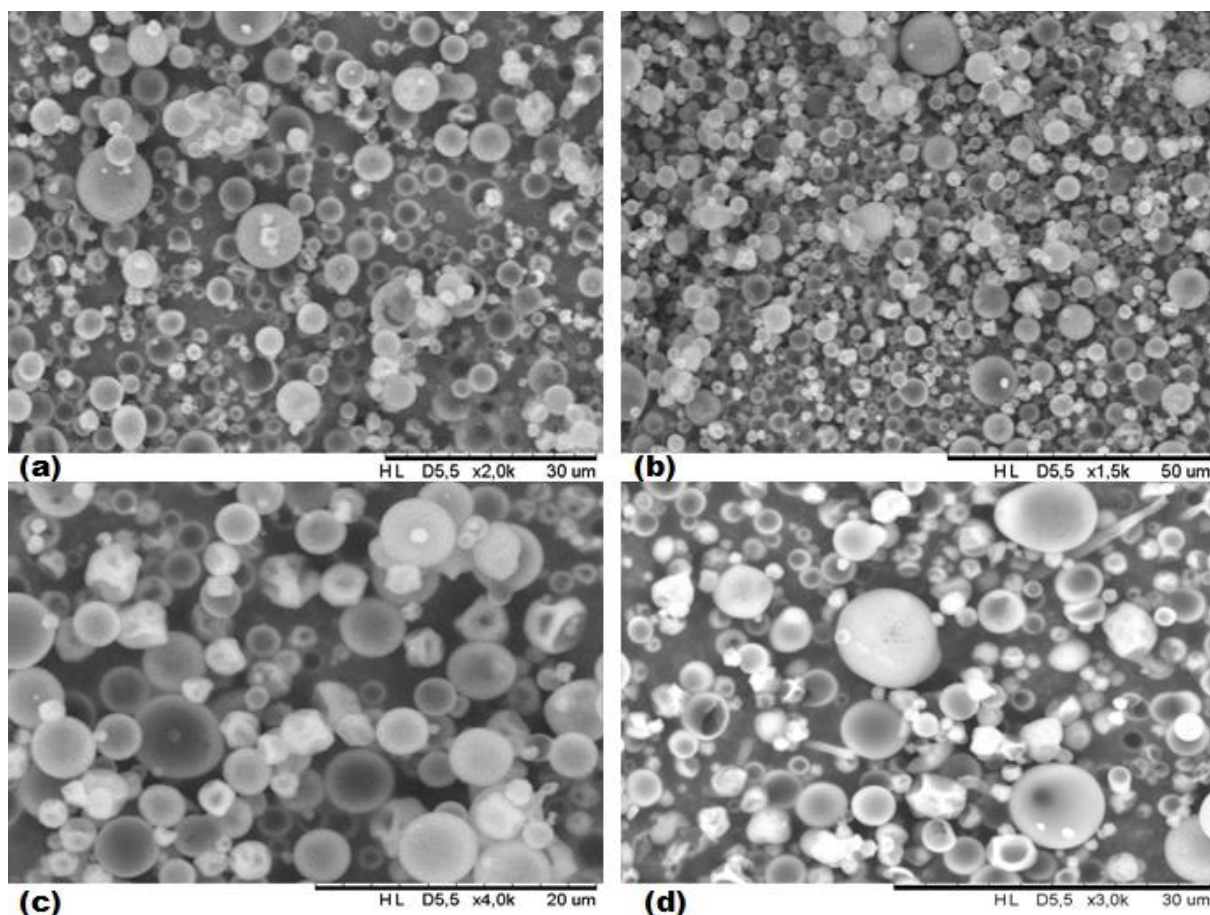
Percebe-se também, mais nitidamente na Figura 22.c, leve aderência das partículas menores à superfície das maiores, fato também observado por Silva (2011) e Silva et al. (2013), na microencapsulação de polifenóis e antocianinas de jabuticaba, e na microencapsulação de extratos de casca de jabuticaba, respectivamente.

Pode-se observar uma superfície lisa por parte das micropartículas produzidas de tomilho (Figura 22), com poucas rugosidades. Segundo Rosenberg et al. (1990), micropartículas com superfícies rugosas interferem nas condições de escoamento do material, sendo desejável superfícies lisas. Além disso, partículas com superfícies rugosas apresentam maior superfície de contato que partículas de superfície lisa e, conseqüentemente, pode torná-las mais suscetíveis a reações de degradação como a oxidação.

Segundo Ré (1998) e Kalab (1979), as rugosidades e depressões formadas durante os processos de *spray drying* são formadas quando há um lento processo de formação de filme durante a secagem das gotículas atomizadas, associando à presença de depressões superficiais ao colapso sofrido pelas gotas durante os estágios iniciais da secagem.

As imagens (Figura 22 e 23) também sugerem a escala “micro”, caracterizando o pó produzido como microencapsulado. Segundo Barros e Stringheta (2006), o processo de encapsulamento é classificado como micro quando o diâmetro das partículas varia de 0,2 a 5000  $\mu\text{m}$ .

Resultados semelhantes ao presente estudo também foram encontrados por Dorrman et al. (2013) na análise de MEV de microencapsulado de suco de maracujá produzido por *spray drying*. Os autores relatam ter observado partículas esféricas, sem fissuras aparentes e, em sua maioria, lisas.

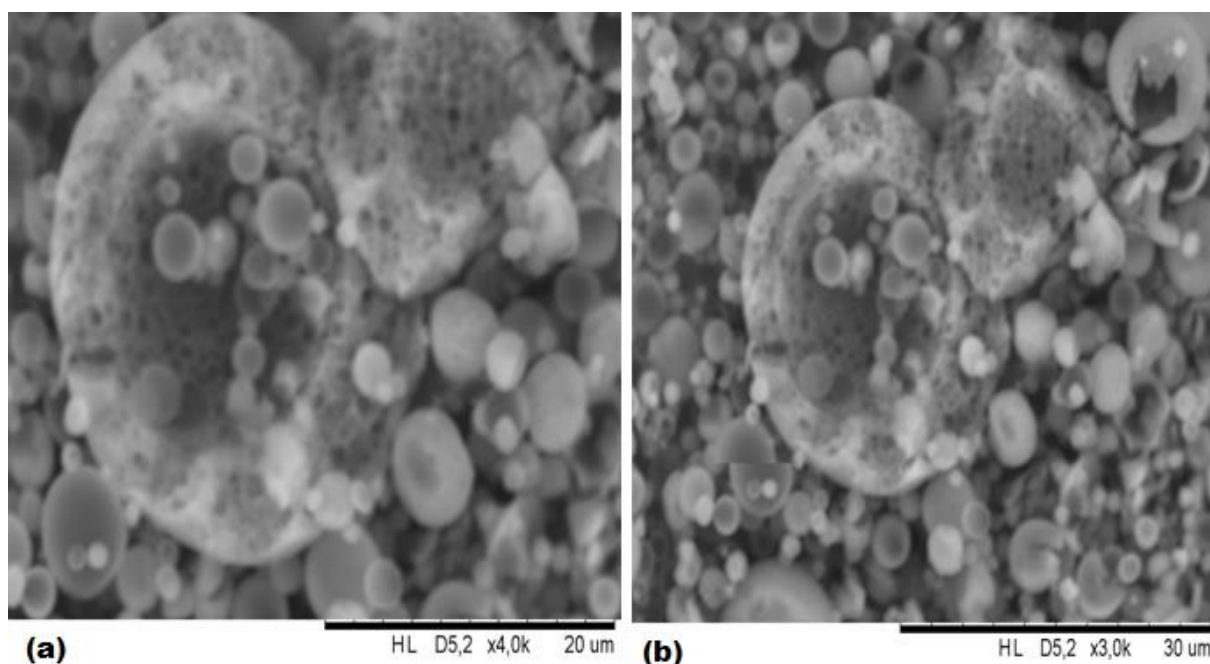


**Figura 22 - Micrografias das partículas de pó proveniente de extrato de Tomilho, submetidos à secagem em *spray drying*.**

A Figura 23 representa a estrutura interna das partículas preparadas de tomilho com mistura de maltodextrina e Capsul<sup>®</sup>, nas ampliações 4.000 vezes (a) e 3.000 vezes (b). Observa-se o vazio no interior da micropartícula e a presença de uma quantidade relativamente grande de aberturas dentro da matriz polimérica, formando uma matriz porosa com indícios de que o material microencapsulado ficou aderido às paredes do encapsulante.

Carneiro (2011) encontrou resultados semelhantes ao microencapsular óleo de linhaça com diferentes proporções de Maltodextrina/Capsul<sup>®</sup>. Obteve, pela análise de MEV, imagens de micropartículas ocas em seu interior revestidas por uma matriz polimérica repleta de microporos, indicando também que o microencapsulado produzido estava disperso na parede do material encapsulante. Silva et al. (2013) avaliaram micropartículas de própolis produzidas por *spray drying* em MEV, e identificaram imagens semelhantes ao do presente estudo, onde a estrutura interna das micropartículas produzidas eram ocas, e os autores as caracterizaram como sendo microesferas.

Segundo Azeredo 2005, as cápsulas produzidas pelos processos de microencapsulação podem ser divididas em microcápsulas ou microesferas. As primeiras são caracterizadas por um núcleo nitidamente concentrado na região central envolvido por um filme do material de parede, já as microesferas são caracterizadas por um núcleo vazio uniformemente disperso em uma matriz porosa. Sendo assim, pela Figura 23, podem-se classificar as micropartículas produzidas neste estudo como sendo microesferas.



**Figura 23 - Micrografias das partículas de pó proveniente de extrato de Tomilho, submetidos à secagem em *spray drying*.**

A formação de microesferas também foi observada por Rocha et al. 2012, na microencapsulação por *spray drying* de licopeno com amido (Capsul<sup>®</sup>) e por Rocha et al. (2009), na microencapsulação de hidrolisados de caseína por *spray drying* com maltotodextrinas DE 10 e 20 como transportadores.

Assim, pode-se concluir que a microencapsulação foi bem sucedida e agregou valor ao extrato de tomilho, visto que este agora apresenta características importantes do ponto de vista industrial, além de ser um efetivo antioxidante.

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A partir dos resultados obtidos foi possível concluir que a erva aromática analisada (*Thymus vulgaris* L.), apresenta elevados teores de compostos fenólicos e flavonoides totais, podendo ser utilizada pela indústria alimentícia em sinergismo com os antioxidantes sintéticos, visando diminuir a concentração destes nos alimentos. A análise de CLAE identificou cinco compostos fenólicos aumentando a perspectiva quanto a bioatividade do tomilho.

Na análise da atividade antioxidante, a mesma tendência citada anteriormente foi verificada, o que sugere uma relação positiva entre compostos fenólicos e atividade antioxidante. O tomilho apresentou excelente atividade antioxidante pelos quatro métodos analisados, demonstrando capacidade de capturar radicais livres, reduzir o ferro, evitando assim a catálise deste nas reações em cadeia da produção de radicais livres, e inibindo a oxidação lipídica.

Visando aplicar tomilho como ingrediente alimentício, a microencapsulação foi realizada com sucesso. Foram produzidas microesferas pequenas, sem fissuras e rachaduras, homogêneas quanto a forma e estrutura, mais nem tanto quanto ao tamanho, características próprias apresentadas pelas micropartículas produzidas por *spray drying*. O presente trabalho também pode ser considerado de extrema importância, visto que poucos são os estudos relacionados a microencapsulação de extratos de ervas aromáticas, podendo este contribuir de forma positiva com a literatura existente.

O tomilho, com elevada capacidade antioxidante e microencapsulado, pode ser considerado um produto de alto valor agregado, visto que o pó produzido apresenta características interessantes do ponto de vista industrial.

## REFERÊNCIAS

ABURTO, L.C.;TAVARES, D.Q.;MARTUCCI, E.T. Microencapsulação de óleo essencial de laranja. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 18, p.45-48, 1998.

AHN, M. R.; KUMAZAWA, S.; HAMASAKA, T.; BANG, K. S.; NAKAYAMA, T. *Antioxidant Activity and constituents of propolis collected in various areas of Korea*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 24, p. 7286-7292, nov. 2004.

ALVES, C. Q.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P.; BAHIA, M. V. AGUIAR, R. M. Métodos para determinação de atividade antioxidante *in vitro* em substratos orgânicos. **Química Nova**, São Paulo, v. 33, n.10, p. 2202-2210, 2010.

ANDRADE, L. P.; COSTA, J. M. G.; MARQUES, A. P.; PEREIRA, J.; BORGES, S. V.; BATISTA, L. R; PICCOLI, R. H.; MENDONÇA, K. S. Avaliação da concentração mínima inibitória do óleo essencial de orégano microencapsulado. In: **XIII Congresso CYTAL – AATA**. Buenos Aires, Argentina, 19 a 21 de outubro, 2011.

APAK, R.; GUÇLU, K.; OZYUREK, M.; KARADEMIR, S.E. *Novel Total Antioxidant Capacity Index for Dietary Polyphenols and Vitamins C and e, Using Their Cupric Ion Reducing Capability in the Presence of Neocuproine: CUPRAC Method*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.52, n. 26, p. 7970-7981, 2004.

ARAÚJO, J. M. A. **Química de Alimentos - Teoria e Prática**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2008.

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

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

BARROS FARD & STRINGHETA PC. Microencapsulamento de antiocianinas – uma alternativa para o aumento de sua aplicabilidade como ingrediente alimentício. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, n. 36, 18-24d, 2006.

BERGAMASCHI, K. B. **Capacidade antioxidante e composição química de resíduos vegetais visando seu aproveitamento**. 2010. 97 f. Dissertação (Mestrado em ciências) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.

BORRMANN, D.; PIERUCCI, A. P. T. R.; LEITE, S. G. F.; LEÃO, M. H. M. R. Microencapsulation of passion fruit (*Passiflora*) juice with n-octenylsuccinate-derivatised starch using spray drying. **Food and Bioproducts Processing**, v. 91, p. 23-27, 2013.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. *Use of free radical method to evaluate antioxidant activity*. **Lebensmittel – Wissenschaft und –Technologie**. v.22, p. 25-30, 1995.

BRASILEIRO, J. S. F. **Microencapsulação de compostos bioativos: inovação em diferentes áreas**. 2011. 71f. Tese (Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Fernando Pessoa – Porto, 2011.

BRAVO, L. *Polyphenols: Chemistry, Dietary Sources, Metabolism, and Nutritional Significance*. **Nutrition Reviews**, New York, v. 56, n.11, p. 317-333, 1998.

CAI, Y. Z., & CORKE, H. Production and properties of spray-dried *Amaranthus* betacyanin pigments. **Journal of Food Science**, v. 65, n. 6, p. 1248-1252, 2000.

CARNEIRO, H. C. F. **Microencapsulação de óleo de linhaça por spray drying: influência da utilização de diferentes combinações de materiais de parede**. 2011. 113f. Tese (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Estadual de Campinas – Unicamp. Campinas, 2011.

CARNEIRO, H. C.F.; TONON, R. V.; GROSSO, C. R. F.; HUBINGER, M. D. Encapsulation efficiency and oxidative stability of flaxseed oil microencapsulated by spray drying using different combinations of wall materials. **Journal of Food Engineering**, v. 115, p. 443-451, 2013

CARPES, S. T. **Estudo das características físico-químicas e biológicas do pólen apícola de *Apis mellifera* L. da região Sul do Brasil**. 2008. 255 f. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos), UFPR, Curitiba, 2008.

CASTRO, L. O.; CHEMALE, V. M. **Plantas medicinais: condimentares e aromáticas**. Guairá: Agropecuária, p. 194, 1995.

CHARVE, J.; REINECCIUS, G. A. Encapsulation Performance of Proteins and Traditional Materials for Spray Dried Flavors. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v.57, n.6, p.2486-2492. 2009.

DAMODARAN, S; PARKIN K. L.; FENNEMA, O. R. **Química dos Alimentos de Fennema**. 4ª Ed., p. 165-169, 2010.

DEL RÉ, P. V.; JORGE, N. *Antioxidant potential of oregano (*Origanum vulgare* L.), basil (*Ocimum basilicum* L.) and thyme (*Thymus vulgaris* L.): application of oleoresins in vegetable oil*. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, 31(4), 955-959, out.-dez., 2011

DORMAN, H.J.D.; PELTOKETO, A.; HILTUNEN, R.; TIKKANEN, M. J. *Characterization of the antioxidant properties of de-odourised aqueous extracts from selected Lamiaceae herbs*. **Food Chemistry, Barking**, v. 83, n. 2, p. 255-262, 2003.

DORMAN, H. J. D.; BACHMAYER, O; KOSAR, M.; HILTUNEN. *Antioxidant properties of aqueous extracts from selected Lamiaceae species grown in Turkey*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.52, n. 4, p. 762-770, 2004.

DORMANA, H. J. D.; PELTOKETO, A.; HILTUNEN, R.; TIKKANEN, M.J. *Characterization of the antioxidant properties of de -odourised aqueous extracts from selected Labiaceae herbs*. **Food Chemistry, Barking**, v.83, p.255-262, 2003.



DZIEZAK, J.D. *Microencapsulation and encapsulated ingredients*. **Food Technology**, v.42, n.4, p.136-148. 1988.

FALLARERO, A. et al. Efeitos de extratos aquosos de *Halimeda incrassata* (Ellis) Lamouroux e *Bryothamnion trquetrum* (SG Gmelim) Howe em peróxido de hidrogênio e metil estresse oxidativo induzido por mercúrio em GT1-7 rato hipotálamo células imortalizadas. **Fitoterápico**, v 10, n. 1, p. 39-47, 2003

FAVARO-TRINDADE, C. S.; PINHO, S. C.; ROCHA, G. A. Revisão: Microencapsulação de ingredientes alimentícios. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 11, n. 2, p. 103-112, abr./jun. 2008.

GALLICE, W. C. **Caracterização do potencial antioxidante e vinhos e quantificação de fenóis totais e trans-resveratrol utilizando técnicas cromatográficas e espectroscópicas multivariadas**. 2010. 87f. Tese (Mestrado em Química) – Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2010.

GENOVESE, M. I.; LAJOLO, F. M.; ALEZANDRO, M. R.; YORN LUI, M. C. Condimentos comerciais e ingredientes industriais: avaliação da capacidade antioxidante e do conteúdo de flavonóides para o desenvolvimento de alimentos funcionais. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, vol. 31, n. 2, 2011.

GONÇALVES, S.; GOMES, D.; COSTA, P.; ROMANO, A. *The phenolic content and antioxidant activity of infusions from Mediterranean medicinal plants*. **Industrial Crops and Products**, v. 43, p. 465-471, 2013).

GOUIN, S. *Microencapsulation: industrial appraisal of existing technologies and trends*. **Trends Food Science Technology** v.15, n.7-8, p.330-347, 2004.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free radicals in biology and medicine**. Oxford: Clarendon Press, p.543, 1990.

HAMINIUK, C. W. I.; PLATA-OVIEDO, M. S. V.; GUEDES, A. R.; STAFUSSA, A.P.; BONA, E.; CARPES, S. T. *Chemical, antioxidant and antibacterial study of Brazilian fruits*. **International Journal of Food Science and Technology**, v.46, p. 1529-1537, 2011.

HORST, B. L. **Microencapsulação do corante natural antocianina em matriz polimérica de quitosana e quitosana/alginato através das técnicas de impregnação, coacervação e spray drying**. Dissertação de Mestrado, UFSC, Florianópolis, 2009.

HOSSAIN, M. B.; RAI, D. K.; BRUNTON, N. P.; MARTIN-DIANA, A. B. BARRY-RYAN, C. Characterization of Phenolic Composition in Lamiaceae Spices by LC-ESI-MS/MS. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, p. 10576-10581, 2010

HUDAIB, M., SPERONI, E., PIETRA, A.M.D., CAVRINI, V. CG/EM *Evaluation of thyme (Thymus Vulgaris L.) oil composition and variations during the vegetative cycle*. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 29 p. 691–700, 2002.

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

JAKIEMIU, E. A. R. **Uma contribuição ao estudo do óleo essencial e do extrato de tomilho (*Thymus vulgaris* L.)**. 2008. 90 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.

KALAB, M. *Microstructure of dairy foods. 1. Milk products based on protein. Journal of Dairy Science*, v. 62, n. 8, p. 1352-1364, 1979. KIM, Y.D.; MORR, C.V.; SCHENZ, T.W. *Microencapsulation properties of gum Arabic and several food proteins: liquid orange oil emulsion particles. Journal of Agricultural and Food Chemistry*. v.44, p.1308-1313. 1996.

KATALINIC, V.; MILOS, M.; KULISIC, T.; JUKIC, M. *Screening of 70 medicinal plant extracts for antioxidant capacity and total phenols. Food Chemistry, Barking*, v.94, p.550-557, 2006.

KUSKOSKI, E. M.; ASUERO, A. G.; TRONCOSO, A. M.; MANCINI-FILHO, J.; FETT, R. *Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, v. 25, n. 4, p.726-732, 2005.

LOPES, R. M.; OLIVEIRA, T. T.; NAGEM, T. J.; PINTO, A. S. Flavonóides: farmacologia de flavonóides no controle hiperlipidêmico em animais experimentais. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, Brasília, p. 18-22, 2003.

MARCUCCI, M. C.; WOISKY, R. G.; SALATINO, A. Uso de cloreto de alumínio na quantificação de flavonóides em amostras de própolis. **Mensagem Doce**, v. 46, p. 3-8, 1998.

MARIUTTI, L. R. B.; BRAGAGNOLO, N. *Antioxidantes Naturais da Família Lamiaceae: Aplicação em Produtos Alimentícios. Brazilian Journal of food Technology*, v.10, p.96-103, 2007.

MARTÍNEZ, H. F. ; REVILLA, G. O.; VELÁZQUEZ, T. G. *Optimal Spray-Drier Encapsulation Process of Orange Oil. Proceedings of the 14th International Drying Symposium*. vol. A, p.621-627, 2004.

MATA, A. T.; PROENÇA, T.; FERREIRA, A. R.; SERRALHEIRO, M. L.; NOGUEIRA, J. M. F.; ARAÚJO, M. E. M. *Antioxidant and antiacetylcholinesterase activities of Five plants used as Portuguese food spices. Food Chemistry, Barking*, v. 102, n. 3, p. 778-786, 2007.

MELO, P. S. **Composição química e atividade biológica de resíduos agroindustriais**. 2010. 100f. Dissertação (Mestrado em Ciências e Tecnologia de Alimentos) – Universidade de São Paulo - Escola Superior de Agricultura “Luiz Queiroz”, Piracicaba, 2010.

MENEZES, C. R.; BARIN, J. S.; CHICOSKI, A. J.; ZEPKA, L. Q.; LOPES, E. J.; FRIES, L. L. M.; TERRA, N. N. Microencapsulação de probióticos: avanços e perspectivas. **Ciência Rural**, Santa Maria, 2012.

MESSIAS, K. L. S. Os antioxidantes. **Foods ingredients Brazil**, n. 6, p. 16, 2009.

MOON, J.; SHIBAMOTO, T. *Antioxidant assays for plant and food components. Journal of Agricultural and Food Chemistry, Easton*, v. 57, p. 1655–1666, 2009.

MÜLLER, P. S. **Microencapsulação do Óleo Essencial de Laranja**. 2011. 99 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos, Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2011.

NORI, M. P.; FAVARO-TRINDADE, C. S.; ALENCAR, S. M.; THOMAZINI, M.; BALIEIRO, J. C. C.; CASTILLO, C. J. C. *Microencapsulation of propolis extract by complex coacervation*. **Food Science and Technology: LWT**; v. 44, n. 2, p. 429-435, 2011.

OBÓN J.M., CASTELLAR M.R. ALACID M & FERNÁNDEZ-LÓPEZ J.A. *Production of a red-purple food colorant from Opuntia Stricta fruits by spray drying and its application in food model systems*. **Journal of Food Engineering**, n.90, 471-479, 2009.

OETTERER, M.; REGITANO-D'ARCE, M. A. B.; SPOTO, M. H. F. **Fundamentos de Ciência e Tecnologia de Alimentos**. São Paulo, 2006.

OLDONI, T. L. C. **Prospecção e identificação de compostos bioativos de subprodutos agroindustriais**. 2010. 163f. Tese (Doutorado em Ciências) – Universidade de São Paulo – Centro de Energia Nuclear na Agricultura. Piracicaba, 2010.

OLIVEIRA, O.W., PETROVICK, P. R. Secagem por aspersão (*spray drying*) de extratos vegetais: bases e aplicações. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n.4, p. 641-650, 2010.

PARK, J.B. *Identification and qualification of a major anti-oxidant and anti-inflammatory phenolic compound found in basil, lemon thyme, mint, oregano, rosemary, sage and thyme*. **Internacional Journal of Food Science and Nutrition**, v. 62, p. 577-584, 2011.

PARK, Y. K., KOO, M. H., SATO, H. H., CONTADO, J. L. *Survey of some components of propolis which were collected by Apis mellifera in Brazil*. **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, v. 38, p. 1253-1259, 1995.

POIROUX-GONORD, F.; BIDEL, L. P.; FANCIULLINO, A. L.; GAUTIER, H.; LAURILÓPEZ, F.; URBAN, L. *Health benefits of vitamins and secondary metabolites of fruits and vegetables and prospects to increase their concentrations by agronomic approaches*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, p. 12065–12082, 2010.

PORTE, A.; GODOY, R. L. O. Alecrim (*Rosmarinus Officinalis L.*): propriedades antimicrobiana e química do óleo essencial. **Boletim CEPPA**, Curitiba, v. 19, n. 2, p. 193-210, jul./dez. 2001.

PORTE, A.; GODOY, R. L. O. *Chemical composition of Thymus vulgaris L. (thyme) essential oil from the Rio de Janeiro State (Brazil)*. **Journal of the Serbian Chemical Society**, 2007.

PULIDO, R.; BRAVO, L.; SAURA-CALIXTO, F. *Antioxidant activity of dietary as determined by a modified ferric reducing/antioxidant power assay*. **Journal Agriculture and Food Chemistry**, v. 48, p. 3396-3402, 2000.

RAMALHO, V. C.; JORGE, N. Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos. **Química Nova**. São Paulo, v. 29, n. 4, p. 755-760, 2006.

RE, M. J. *Microencapsulation by spray drying*. **Drying Technology**, v. 16, p. 1195-1236, 1998.

RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICE EVANS, C. *Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay*. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 26, n. 9, p. 1231-1237, 1999.

REINECCIUS, G. A. *Controlled release techniques in food industry*. In: RISH, S. J.; REINECCIUS, G. A. **Encapsulation and controlled release of food ingredients**. Washington, DC: ACS, p. 8-25, 1995.

RICE-EVANS, C.; MILLER, N.; PAGANGA, G. *Antioxidant properties of phenolic compounds*. **Trends in Plant Science**, v. 2, n. 4, p. 304-309, 1997.

ROBY, M. H. H.; SARHAN, M. A.; SELIM, K. A. H.; KHALEL, K. I. *Evaluation of antioxidant activity, total phenols and phenolic compounds in thyme (*Thymus vulgaris* L.), sage (*Salvia officinalis* L.), and marjoram (*Origanum majorana* L.) extracts*. **Industrial Crops and Products**, v. 43, p. 827-831, 2013.

ROCHA, G.A., FAVERO-TRINDADE, C.S.; GROSSO, C.R.F. *Microencapsulation of lycopene by spray drying: Characterization, stability and application of microcapsules*. **Food and Bioproducts Processing**, v. 90, p. 37-42, 2012.

ROCHA, G.A., TRINDADE, M.A., NETO, F.M.; FAVARO-TRINDADE, C.S. *Microencapsules of casein hydrolysate: production, characterization, and application in protein bar*. **Food Science and Technology**, p. 407-413, 2009.

ROSA, Cleonice Gonçalves. **Microencapsulação de extratos metanólicos de amora-preta (*Rubus Fruticosus*) e ácido gálico**. 2012. 112f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Agroindustrial) – Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Agroindustrial. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2012.

ROSENBERG, M.; KOPELMAN, I. J.; TALMON, Y. *Factors affecting retention in spray-drying microencapsulation of volatile materials*. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v. 38, pp. 1288-1294, 1990.

RUFINO, Maria S. M.; ALVES, Ricardo E.; BRITO, Edy S.; MORAIS, Selene M.; SAMPAIO, Caroline G.; PÉREZ-JIMÉNEZ, Jara; SAURA-CALIXTO, Fulgencio D. **Metodologia científica: determinação da atividade antioxidante total em frutas pelo método de redução do ferro (FRAP)**. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2006.

SANTOS, A.B., FÁVARO-TRINDADE, C.S., GROSSO, C.R.F.. *Preparo e caracterização de microcápsulas de oleoresina de páprica obtidas por atomização*. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.25, n.2, p. 322–326, 2005.

SELAMAT, S. N.; MUHAMAD, I. I.; SARMIDI, M. R. **Encapsulation of Tocopherol and Tocotrienol in Vitamin-E Using Spray Drying Technique**. *The 3rd South East 33 Asian Technical University Consortium (SEATUC) Symposium, Institute Ibnu Sina, UTM Skudai, Johor*, 2009.

SHAHIDI, F.; HAN, X. *Encapsulation of food ingredients. Critical Review*. **Food Science and Nutrition**, v. 33, n. 6, p. 501-547, 1993.

SHAN, B.; CAI, Y.Z.; CORKE, H. *Antioxidant capacity of 26 spice extracts and characterization of their phenolic constituents*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 53, n. 20, p. 7749 – 7759, 2005

SILVA, F.C.; FAVARO-TRINDADE, C.S.; ALENCAR, S. M.; THOMAZINI, M; BALIEIRO, J. C. C. *Physicochemical properties, antioxidant activity and stability of spray-dried propolis*. **Journal of ApiProduct and ApiMedical Science**, v. 3, n.2, p. 94 – 100, 2011.

SILVA, F. C.; FONSECA, C. R.; ALENCAR, S. M.; THOMAZINI, M.; BALIEIRO, J. C. C.; PITTIA, P.; FÁVERO-TRINDADE, C. S. *Assessment of production efficiency, physicochemical properties and storage stability of spray-dried própolis, a natural food additive, using gum Arabic and OSA starch-based Carrier systems*. **Food and Bioproducts Processing**, v. 91, p. 28-36, 2013.

SILVA, M. L. C.; SANTANA, A. S.; COSTA, R. S.; KOBLITZ, M. G. B. *Compostos fenólicos, carotenóides e atividade antioxidante em produtos vegetais*. **Ciências Agrárias**, Londrina, v. 31, n. 3, p. 669-682, 2010.

SILVA, P. I.; STRINGHETA, P. C.; TEÓFILO, R. F. *Parameter optimization for spray-drying microencapsulation of jaboticaba (*Myrciaria jaboticaba*) peel extrats using simultaneous analysis of responses*. **Journal of Food Engineering**, v. 117, p. 538-544, 2013.

SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA, R. M. *Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteau reagent*. **Methods in Enzymology**, v. 299, p. 152–178, 1999.

SOARES, S. E. *Ácidos fenólicos como antioxidantes*. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 15, n. 1, p. 71-81, 2002.

STALIKAS, *Constantine D. Extraction, separation e detection methods for phenolic acid and flavonoids*. **Journal of Separation Science**. v. 30, n. 18, p. 3268 - 3295, december, 2007.

SUAVE, J.; DALL'AGNOL, E. C.; PEZZIN, A. P. T.; SILVA, D. A. K.; MEIER, M. M.; SOLDI, V. *Microencapsulação: Inovação em diferentes áreas*. **Health na Environment Journal**, v.7, n.2, p. 12-20, 2006.

TIVERON, A. P. **Atividade antioxidante e composição fenólica de legumes e verduras consumidos no Brasil**. 2010. 102p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, SP, 2010.

TONON, R. V.; GROSSO, A. R. F.; HUBINGER, M. D. *Influence of emulsion composition and inlet air temperature on the microencapsulation of flaxseed oil by spray drying*. **Food Research International**, v.44, p.282-289. 2011.

TRINDADE, M. A., GROSSO, C. R. F. *The stability of ascorbic acid microencapsulated in granules of rice starch and in gum arabic*. **Journal of Microencapsulation**, v.17, p.169-176. 2000.

WANG, X.; LI, X.; CHEN L.; XIE, F.; YU, L.; LI, B. *Preparation and Characterization of Octenyl Succinate Starch as A Delivery Carrier for Bioactive Food Components*. **Food Chemistry**, 2010.

WOJDYLO, A.; OSZMIANSKI, J.; CZEMERYYS, R. Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs. **Food Chemistry**, v. 105, p. 940-949, 2007.

ZÁCARI, C.R. **Estabilidade oxidativa de óleo extra-virgem de castanhas do Pará com ervas aromáticas antioxidantes**. 2008.112f. Tese (Mestrado em Ciências) – Universidade de São Paulo – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”. Piracicaba, 2008.

ZHENG, W.; WANG, S.Y. *Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs*. **Journal Agricultura Food Chemistry**, Chicago, v.49,p. 5165-5170, 2001.