

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM TECNOLOGIA DE ALIMENTOS  
MESTRADO EM TECNOLOGIA EM ALIMENTOS

RUTH DOS SANTOS DA VEIGA

**EUGENOL MICROENCAPSULADO EM CARRAGENA COMBINADA  
COM PROTEÍNAS DO LEITE, DO FARELO DE ARROZ E ALBUMINA  
SÉRICA BOVINA POR ATOMIZAÇÃO**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

MEDIANEIRA

2016

RUTH DOS SANTOS DA VEIGA

**EUGENOL MICROENCAPSULADO EM CARRAGENA COMBINADA  
COM PROTEÍNAS DO LEITE, DO FARELO DE ARROZ E ALBUMINA  
SÉRICA BOVINA POR ATOMIZAÇÃO**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Tecnologia de Alimentos.

Orientadora: Profa. Dra. Crisitiane Canan

MEDIANEIRA

2016

### Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

V426e Veiga, Ruth dos Santos da

Eugenol microencapsulado em carragena combinada com proteínas do leite, do farelo de arroz e albumina sérica bovina por atomização /Ruth dos Santos da– 2016.

114 f. : il. ; 30 cm.

Orientadora: Profa. Dra. Crisitiane Canan

Dissertação (Mestrado) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos. Medianeira, 2016.

Inclui bibliografias.

1. Fenóis. 2. Cromatografia líquida. 3. Atomização. 4. Alimentos – Dissertações. I. Canan, Cristiane, orient. II. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos. IV. Título.

CDD: 664

Biblioteca Câmpus Medianeira  
Fernanda Cristina Gazolla Bem dos Santos CRB 9/1735



---

**TERMO DE APROVAÇÃO**

**EUGENOL MICROENCAPSULADO EM CARRAGENA COMBINADA COM PROTEÍNAS DO LEITE, DO  
FARELO DE ARROZ E ALBUMINA SÉRICA BOVINA POR ATOMIZAÇÃO**

Por

**RUTH DOS SANTOS DA VEIGA**

Essa dissertação foi apresentada às dezesseis horas, do dia dez de dezembro de dois mil e quinze, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Tecnologia de Alimentos, Linha de Pesquisa Ciência e Tecnologia de Produtos Alimentícios, no Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos - PPGTA, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná. A candidata foi arguida pela Banca Examinadora composta pelas professoras abaixo assinadas. Após deliberação, a Banca Examinadora considerou o trabalho aprovado.

---

Profa. Dra. Cristiane Canan (Orientadora – PPGTA)

---

Profa. Dra. Margarida Masami Yamaguchi (Membro Externo – UTFPR)

---

Profa. Dra. Marinês Paula Corso (Membro Externo – UTFPR)

A via original com as assinaturas encontra-se na secretaria do programa.

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente agradeço a Deus por esta oportunidade que me concedeu de realizar este sonho, dando-me força e saúde e guiando meus passos todos os dias.

Ao meu querido esposo Alexandre Rosa da Veiga pela paciência e compressão durante minha ausência.

A minha querida filha Ana Laura, minha razão de viver e lutar, que muitas vezes na sua inocência não conseguia compreender minha ausência. Filha a tua presença tornou tudo mais fácil.

Aos meus pais por todo apoio e incentivo e seu amor incondicional, sempre acreditando em mim. Muito obrigada por apoiarem meu sonho.

Aos meus irmãos Elias e Josué, pelo companheirismo, incentivo, ajuda e paciência em todos os momentos da minha vida.

A professora Cristiane Canan, pela oportunidade, confiança e orientação na realização deste trabalho.

A Rosana Aparecida da Silva-Buzanello pelo constante auxílio, sempre disposta a ajudar, tirar dúvidas com tanta generosidade, Muito obrigada.

A minha amiga Tania Aparecida Becker-Algeri, pelo grande tempo dedicado que foi essencial para o sucesso da realização deste trabalho, muito obrigada por tudo.

Aos professores Éder Lizandro de Moraes Flores, Marinês Paula Corso e Ilton Baraldi, pela colaboração neste trabalho.

À Profª Drª Elídia A. Velter Ferri e sua equipe pelo auxílio com as análises de Microscopia Eletrônica de Varredura.

Aos professores componentes da banca examinadora pelas correções e contribuição a este trabalho.

Ao Fernando Reinoldo Scremin pela disposição em realizar as análises de DSC e FTIR.

As colegas do curso, Leidiane, Catiussa, Denise, Crislaine e Fernanda, aprendi muito com vocês nesse período. Obrigada por tudo.

As laboratoristas da UTFPR, Elé, Ruti, Mara, Marci, Patrícia, pelo auxílio quando solicitado.

A todos que de maneira direta ou indireta me auxiliaram neste trabalho, Muito obrigada!

VEIGA, R. S. **Eugenol microencapsulado em carragena combinada com proteínas do leite, do farelo de arroz e albumina sérica bovina por atomização**. Dissertação (Mestrado em Tecnologia em Alimentos) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Medianeira. 2015.

## RESUMO GERAL

O eugenol é um composto fenólico natural que apresenta atividade antioxidante e antimicrobiana e o seu uso como substituto de aditivos sintéticos em alimentos tem sido proposto. Contudo, pela sua instabilidade frente aos agentes externos (luz, oxigênio e calor), seu uso no processamento de alimentos é comprometido. Assim, a microencapsulação é uma alternativa viável para sua aplicação. Os objetivos deste trabalho foram avaliar o efeito da variação das condições operacionais do atomizador (temperatura do ar de entrada e vazão de alimentação) na obtenção de eugenol microencapsulado em carragena, e estudar a influência da combinação de carragena e proteína do farelo de arroz, albumina sérica bovina e proteína do soro de leite com baixo teor de lactose na microencapsulação de eugenol. Em uma primeira etapa, um Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) do tipo  $2^2$  com duas variáveis independentes (temperatura do ar de secagem e vazão de alimentação), três pontos centrais e quatro pontos axiais, foi desenvolvido para avaliar as condições operacionais de atomização. A quantificação do eugenol, recuperação (RE %) e a eficiência de encapsulação (EE %) foi avaliada por espectrofotometria UV-Vis e a morfologia por microscopia ótica. Na segunda etapa, a influência do uso de carragena em combinação com proteína do farelo de arroz, albumina sérica bovina e proteína do soro de leite com baixo teor de lactose foi avaliada por meio de um planejamento de mistura do tipo *simplex-centroid*. A caracterização das microcápsulas foi determinada pela RE % e EE % por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), análise termogravimétrica acoplada à espectrofotometria de infravermelho e, morfologia por microscopia eletrônica de varredura. Para o DCCR, o valor máximo de RE% obtido foi de 12% e as condições operacionais estudadas não influenciaram significativamente ( $p > 0,05$ ). Já a EE% variou de 18,0 a 84,8% e, o termo quadrático para vazão de alimentação apresentou influência significativa ( $p \leq 0,05$ ) na resposta avaliada. Para o planejamento *simplex-centroid*, o valor médio de RE % das microcápsulas variou de 37,9 a 104,5% e o de EE% de 0,0 a 79,4%, sendo que ambas as respostas foram influenciadas ( $p \leq 0,05\%$ ) pelos agentes encapsulantes da formulação. A albumina sérica bovina apresentou boa propriedade de estabilização da suspensão (RE % = 86,5) e em combinação com proteína de farelo do arroz possibilitou maior EE % (79,4). As microcápsulas exibiram diâmetro médio entre 3,4 a 4,6  $\mu\text{m}$  e a morfologia das microcápsulas produzidas com a combinação da albumina sérica bovina e a proteína do farelo de arroz apresentaram superfícies esféricas com ausência de fissuras ou deformações. As análises térmicas e de FTIR, confirmam a eficiência de encapsulação do processo, indicando uma possível interação entre os agentes encapsulantes e o eugenol.

**Palavras-chave:** Micropartículas, Agentes encapsulantes, DCCR, Eficiência de encapsulação, Planejamento de mistura.

VEIGA, R. S. **Eugenol microencapsulated in carrageenan combined with milk protein, rice bran protein and bovine serum albumin by spray drying**. Dissertation (Masters in Food Technology) Federal University of Technology – Paraná, Medianeira. 2015.

## GENERAL ABSTRACT

Eugenol is a natural phenolic compound with antioxidant and antimicrobial activity and its use as substitute the synthetic additives in food has been suggested. However, due eugenol instability to extern agents (light, oxygen and hot), its use in food processing has been hampered. Therefore, microencapsulation is a viable alternative for your application. The aims of this work were evaluate the effect of variation of operating conditions of spray drying (inlet air temperature and feed flow rate) in obtainment eugenol microencapsulated in carrageenan, and study the influence of combination of carrageenan and protein from rice bran protein, bovine serum albumin and, whey protein with low lactose content in the eugenol microencapsulation. Composite Central Desing (CCD) of type  $2^2$  with two independent variables (inlet air temperature, and feed flow rate), three key points and four axial points, were developed to assess the operational conditions of spray dryer. Eugenol quantification, recovery (% ER) and encapsulation efficiency (EE%) of process were evaluated by UV-Vis spectrophotometry and morphology by optical microscopy. In the second stage of the study, the influence of the use of carrageenan in combination with rice bran protein, bovine serum albumin and whey protein with low lactose content was evaluated by simplex-centroid desing. Microcapsules were characterized by Ultra Performance Liquid Chromatography (UPLC) (ER and EE%), thermogravimetric analysis coupled to the infrared spectrophotometry, and morphology by scanning electron microscopy (SEM). In the CCD, the maximum ER% value was 12% and the operating conditions studied did not influence significantly ( $p > 0.05$ ). EE% varied from 18.0 to 84.8% and the quadratic term to feed flow rate presented significant influence ( $p \leq 0.05$ ) in the evaluated answer. In the simplex-centroid mixture desing the ER% average of microcapsules ranged from 37.9 to 104.5% and EE% 0.0 to 79.4%, being that both responses were influenced ( $p \leq 0.05\%$ ) by encapsulating agents of formulation. Bovine serum albumin presented good stabilizing property of suspension (ER% = 86.5) and in combination with rice bran protein resulted greater EE% (79.4). Microcapsules exhibited a average diameter range from 3.4 to 4.6  $\mu\text{m}$  and the microcapsules morphology produced combination with the bovine serum albumin and protein rice bran showed surface with absence no cracks or deformation. Thermal and FTIR analysis confirmed the encapsulation efficiency of the process, observed a possible interaction between the encapsulating agents and eugenol.

**Keywords:** Microparticles, Encapsulating agents, CCD, Encapsulation efficiency, Mixture desing.



## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	10
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	12
2.1 OBJETIVO GERAL .....	12
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	12
<b>3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	13
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	50
4.1 MATERIAIS.....	50
4.2 MÉTODOS.....	50
4.2.1 Microencapsulação de Eugenol em Carragena.....	50
4.2.1 Atomização .....	51
4.2.1.2 Avaliação das microcápsulas .....	51
4.2.2 Microencapsulação do Eugenol em Carragena Combinada com Proteínas do Leite, do Farelo de Arroz e Albumina Sérica Bovina por Atomização .....	53
4.2.2.1 Avaliação das microcápsulas .....	55
4.2.2.1.1 Quantificação de eugenol por cromatografia líquida de ultra eficiência (CLAE).....	56
4.2.2.1.2 Morfologia e tamanho das microcápsulas.....	57
4.2.2.1.3 Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) .....	57
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>59</b>
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>60</b>
5.1 ARTIGO CIENTÍFICO 2: USO DE CARRAGENA NA MICROENCAPSULAÇÃO DE EUGENOL.....	61
5.2 ARTIGO CIENTÍFICO 3: EUGENOL MICROENCAPSULADO EM CARRAGENA COMBINADA COM PROTEÍNAS POR ATOMIZAÇÃO (SPRAY DRYING).....	80
<b>6 CONCLUSÕES GERAIS</b> .....	<b>114</b>

## 1. INTRODUÇÃO

Os óleos essenciais são compostos complexos de odor intenso, formados por plantas aromáticas comestíveis e por ervas medicinais, possuem propriedades antibacterianas e antioxidantes o que leva o crescente interesse por sua aplicação como conservantes naturais em matrizes alimentares. Dentre os óleos essenciais destaca-se o eugenol que é o principal constituinte do óleo de cravo, podendo também ser encontrado em óleos e extrato de outras plantas, tais como, canela, manjerição e noz-moscada, este também possui propriedades antibacterianas e antioxidantes sendo amplamente utilizado como agente aromatizante e como aditivo para as indústrias (ZHANG, KULKARNI, KULKARNI, 2000; OGATA et al., 2000; RAUSCHER; SANDERS; WATKINA, 2001; BURT, 2004; BAKKALI et al., 2008; CHEN; ZHANG; ZHONG, 2015).

Apesar dos benefícios potenciais apresentados pelos óleos essenciais os seus principais compostos, responsáveis principalmente pelas suas propriedades funcionais, são quimicamente instáveis frente aos agentes externos (luz, oxigênio e calor), dificultando sua aplicação em larga escala na indústria de alimentos (ASCHERI, 2003, REINECCIUS, 2004; BORGES, BOTREL, 2014). Assim, uma das alternativas para seu uso no processamento de alimentos é a microencapsulação.

A microencapsulação pode ser definida como um processo onde pequenas partículas são cercadas por um revestimento, obtendo-se pequenas cápsulas. Esse processo resulta numa barreira física entre o composto do núcleo e outros componentes do sistema, podendo proteger o composto ativo contra umidade, oxigênio e luz (SILVA et al., 2003; SANTOS, FAVARO-TRINDADE, GROSSO, 2005; FUCHS et al., 2006; FAVARO-TRINDADE, PINHO, ROCHA, 2008). O processo de microencapsulação tem se tornado atrativo em função de seus benefícios, tais como: a facilidade de manuseio, aumento da estabilidade frente à oxidação, retenção dos compostos voláteis, além da liberação controlada do aditivo por meio de uma cápsula ou membrana que separa fisicamente a substância sensível do ambiente que poderia causar sua decomposição.

Vários métodos podem ser utilizados para a microencapsulação, mas o método de secagem por atomização (*spray drying*) é um dos mais utilizados. Dentre as vantagens

do emprego da encapsulação por atomização, está incluído o fato de o processo ser econômico, flexível e produzir partículas de boa qualidade (REINECCIUS, 1991; GHARSALLAOUI et al., 2007)

A eficiência da microencapsulação e a estabilidade das micropartículas dependem fundamentalmente, do material utilizado como agente encapsulante, as condições do processo (temperatura, pH, pressão, umidade). A seleção dos agentes encapsulantes se dá a partir de uma ampla variedade de polímeros naturais e sintéticos, e entre os materiais de parede comumente utilizados incluem os carboidratos, gomas, lipídios e proteínas, podendo ser usados sozinhos ou em combinação, contudo há preferência por agentes encapsulantes naturais e biocompatíveis (ZBICINSKI et al., 2002; WANG et al., 2009; REINECCIUS, 1991; DUBEY et al., 2009).

Em virtude de suas excelentes propriedades de formação de gel, possibilitando o aprisionamento de compostos, a carragena apresenta-se como uma alternativa viável para a encapsulação. Além disso, sua combinação com diferentes tipos de proteínas para encapsulação ainda não tem sido reportadas na literatura. Os objetivos deste trabalho foram avaliar o efeito da variação das condições operacionais do atomizador (temperatura do ar de entrada e vazão de alimentação) na obtenção de eugenol microencapsulado em carragena, e estudar a influência de sua combinação com as proteínas do soro de leite com baixo teor de lactose, proteínas do farelo de arroz e albumina sérica bovina na microencapsulação de eugenol.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

- Microencapsular eugenol em carragena, isolada e em combinação com proteínas do soro de leite com baixo teor de lactose, proteínas do farelo de arroz e albumina sérica bovina pela técnica de atomização (*spray drying*).

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o efeito da variação das condições operacionais de atomização (temperatura do ar de secagem e vazão de alimentação) na microencapsulação de eugenol em carragena e a sua recuperação percentual e eficiência de encapsulação, por espectroscopia de UV-Vis.
- Verificar a morfologia das microcápsulas de eugenol encapsulado em carragena por microscopia óptica.
- Avaliar a influência da combinação dos encapsulantes: proteínas do soro de leite com baixo teor de lactose, do farelo de arroz e albumina sérica bovina com a carragena, por meio de um planejamento de mistura *simplex-centroid*, na recuperação percentual e eficiência de encapsulação do eugenol, por Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência (CLAE) e, na morfologia por microscopia eletrônica de varredura (MEV).
- Determinar a estabilidade térmica das microcápsulas obtidas de acordo com planejamento *simplex-centroid* mediante Análise Termogravimétrica (TGA) e de Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC), acoplados ao equipamento de Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR).

### 1 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2

3 A revisão bibliográfica é composta por um artigo de revisão (Artigo 1).

4

#### 5 **SPRAY DRYING MICROENCAPSULATION OF ESSENTIAL OILS: A REVIEW**

6

7 Ruth dos Santos da Veiga<sup>a\*</sup>, Cristiane Canan<sup>a</sup>

8

9 *a - Federal University of Technology – Paraná (UTFPR), Post-Graduation Program of*  
10 *Food Technology (PPGTA), Caixa Postal 271, Avenida Brasil 4232, CEP: 85884-000,*  
11 *Medianeira, PR, Brazil.*

12

13 \*corresponding author: ruth.stos@hotmail.com, +55 45 3240 8000.

14

15 **ABSTRACT.** The antibacterial and antioxidant properties of many essential oils and their  
16 components have led to increasing interest in their application as natural preservatives in  
17 food matrices. However, its high volatility and sensitivity at external agents affect their  
18 using as food ingredient. Thus, the microencapsulation is an alternative to use of  
19 essential oils. This process results in a physical barrier between the core compound and  
20 other system components, and may protect the active compound against moisture,  
21 oxygen and light. Spray drying method is widely used in microencapsulation, and  
22 presents advantages to be an economic process, flexible, and produces particles of good  
23 quality. Moreover, has become attractive due to its benefits, such as ease of handling,  
24 increased stability against oxidation, and retention of volatile compounds, in addition to

25 the controlled release of the additive. Therefore, the technique of microencapsulation by  
26 spray drying is shown to be robust for this purpose.

27 **Keywords:** Microcapsules, Encapsulating agents, Antioxidant compounds, Antimicrobial  
28 compounds.

29

## 30 **1. Introduction**

31 The consumption of food contaminated with pathogenic microorganisms can trigger  
32 foodborne illness outbreaks, with negative results, both social and economic. Thus, the  
33 use of efficient antimicrobials preservatives in combination with other intervention  
34 strategies has been used by food industry in order to conserve and extend shelf life of  
35 food, especially the natural compounds (Chen et al. 2015).

36 Among the natural ingredients, essential oils and their components are highlighted, which  
37 are extracted from different parts of various types of edible plants, medicinal herbs and  
38 spices such as sage, rosemary, thyme, oregano, cloves, cinnamon, basil, nutmeg, celery  
39 seed, lemongrass, coriander, garlic, marjoram, and tarragon, among others. They are  
40 highly aromatic due to derivatives of phenol compounds and aliphatic components  
41 present in their structure, also featuring antioxidant, antibacterial and antifungal  
42 properties (Burt 2004; Hersch-Martínez et al. 2005; Toure et al. 2007; Pierozan et al.  
43 2009; Guimarães et al. 2010; Zaouali et al. 2010; Teixeira et al. 2013; Chen et al. 2015).

44 Because of these properties of essential oils, their use is becoming popular for increasing  
45 the shelf life of food products, as they are considered not to have potential adverse  
46 effects and are recognised as safe (GRAS, generally recognised as safe), thus replacing  
47 the various synthetic preservatives that are added to foods, with a positive impact on  
48 consumer health (Burt 2004; Bakkali et al. 2008; Gómez-Estaca et al. 2010; Betoret et al.

49 2011; Chen et al. 2015). However, there are major technological difficulties of essential  
50 oils as an ingredient is preservation during processing and storage as these compounds  
51 are heat sensitive, highly volatile and easily oxidise in the presence of light, air and  
52 moisture (Ascheri et al. 2003; Reineccius 2004; Fernandes et al. 2014). Thus, there is a  
53 need to protect these oils to make them more stable during handling, processing and  
54 storage (Augustin et al. 2006). Thus, the microencapsulation is one strategy employed to  
55 prolong the stability of essential oils and to facilitate its application.

56 Microencapsulation can be defined as a process by which small particles or droplets are  
57 surrounded by a coating; or, when they are incorporated in a matrix, homogeneous or  
58 heterogeneous, obtain small capsules, providing a physical barrier between the  
59 compound core and other system components, which can release the contents in a  
60 controlled manner under specific conditions (Silva et al. 2003; Fuchs et al. 2006; Favaro-  
61 trindade & Pinho 2008).

62 Various methods may be used for microencapsulation, such as spray drying, extrusion,  
63 fluid bed, coacervation, and molecular inclusion, among others. Each microencapsulation  
64 process depends on several aspects; however, the basic principle is common to all, and  
65 the choice of the method for a specific application depends on a number of factors, such  
66 as particle size required, physical and chemical properties of the core and the wall,  
67 application of the final product, controlled release mechanisms, production scale, and  
68 cost (Ré 1998; Anal & Singh 2007).

69 Among the microencapsulation techniques, spray drying is the most used in the food  
70 industry for low cost manufacturing benefits, for presenting varieties of encapsulating  
71 matrices, good retention of volatiles compounds, good stability of the encapsulated  
72 compounds, in addition to large-scale production in a continuous mode. It is one of the

73 oldest methods of encapsulation and has been used since the 1930s to prepare the first  
74 flavour compounds encapsulated (Gharsallaoui et al. 2007).

75 This work aimed to carry out a literature review on the microencapsulation of essential  
76 oils by the spray drying technique for use in food. This work provides information  
77 regarding the principal essential oils reported in the literature, their compositions and  
78 properties, as well as the microencapsulation process parameters.

79

## 80 **2. Essential oils**

81 Essential oils and their constituents are characterised as complex compounds of heavy  
82 odour formed by edible herbs and medicinal herbs such as secondary metabolites.  
83 These compounds have often been studied for their activity against bacteria, viruses,  
84 fungi, parasites and insects, and are applied in foods because many of them are safe  
85 (GRAS) (Burt 2004; Bakkali et al. 2008; Chen et al. 2015).

86 An estimated 3 000 essential oils are known, of which about 300 are commercially  
87 important, used in the pharmaceutical, food, cosmetics and perfume industry. Essential  
88 oils are complex natural mixtures that may contain from 20 to 60 parts in different  
89 concentrations and may be characterised by two or three major components, at relatively  
90 high concentrations (20 to 70%) when compared to other components present in trace  
91 concentrations. Some examples can be cited, such as carvacrol and thymol, major  
92 components of the essential oil of oregano (*Origanum compactum*) representing 30 and  
93 27%, respectively. The essential oil of coriander (*Coriandrum sativum*) has in its  
94 constitution 65% linalool. The essential oil extracted from the plant *Artemisia herba-alba*,  
95 a species of shrub, contains  $\beta$ -turjona and camphor, representing 57 and 24% oil,  
96 respectively. In essential oils extracted dill (*Anethum graveolens*) is 36% of  $\alpha$ -



97 phellandrene, and 31% limonene when the oils are extracted from plant leaves, and 58%  
98 carvone and 37% of d-limonene when they are extracted from the seeds. Menthol (59%)  
99 and menthone (19%) are found in essential oils of peppermint (*Mentha piperita*). The  
100 main group consists of terpenes and terpenoids and other aromatic and aliphatic  
101 components, all characterised by low molecular weight (Bakkali et al. 2008). These  
102 results show that the composition of essential oils is affected and varied by the type and  
103 anatomical location of the plant which are extracted. Furthermore, the wealth of  
104 antioxidants and antimicrobial components of interest enables application in foods,  
105 minimising the use of these compounds for synthetic purposes.

106 Oils obtained from different species of salvia are rich in terpenoids having antioxidant and  
107 antimicrobial activity (Avato et al. 2005; Longaray Delamare et al. 2007; Pierozan et al.  
108 2009; Ben Taârit et al. 2012). Longaray Delamare et al. (2007) studied the composition of  
109 the essential oil of the species *Salvia officinalis* and *Salvia triloba*, cultivated in southern  
110 Brazil, by gas chromatography, and identified as main constituents, respectively, among  
111 the species: 24.8 and 20.1% of  $\alpha$ -tujona, 14.8 and 15.7% of 1,8-cineol, 10.9 and 12.6%  
112 of canphor, responsible mostly for the antioxidant and antimicrobial properties of  
113 essential oils. Pierozan et al. (2009) determined the antimicrobial activity of essential oils  
114 of salvia species (*Salvia officinalis*, *S. sclarea*, *S. lavandulifolia* e *Salvia* spp.) showing  
115 that these can be effective bacteriostatic agents against Gram-positive microorganisms.

116 The antimicrobial and antioxidant activities were also reported for the essential oil of  
117 rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.). Angioni et al. (2004) identified 33 chemical  
118 compounds, by gas chromatography, standing out as major constituents:  $\alpha$ -pinene  
119 (23%), borneol (16%), and bornyl-acetate (10.4%), as mostly responsible for these  
120 properties.

121 Zaouali et al. (2010) studied the chemical composition and antioxidant and antimicrobial  
122 activity of the essential oil *Rosmarinus officinalis* of varieties *typicus* and *trogodytorum*,  
123 identifying the presence of 1,8-cineole (47.2 and 27.5%) and canphor (12.9 and 27.9%),  
124 respectively. The essential oils showed high antioxidant activity by DPPH (1,1-difenil-1-  
125 picrilhidazil), FRAP (reduction of ferrous ion) and a test of  $\beta$ -carotene and antimicrobial  
126 activity, where the essential oils from the variety *trogodytorum* exhibited bactericidal  
127 activity restricted to Gram-negative bacteria *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*,  
128 *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus epidermis* and *Streptococcus feacalis*. These  
129 results show that the chemical composition of essential oils extracted from rosemary  
130 (*Rosmarinus officinalis*) were dependent of their variety and, therefore, their antioxidant  
131 and antimicrobial properties were affected.

132 Among the major components of the essential oils, thymol, eugenol, and carvacrol the  
133 main components of essential oils of thyme, clove and oregano are the most studied  
134 (Liolios et al. 2009; Kollanoor Johny et al. 2010; Castillo et al. 2014; Pan et al. 2014).  
135 Eugenol is a phenolic compound that occurs naturally in various oils or plant extracts  
136 such as cinnamon, basil, nutmeg, and clove oil, as the main constituent. Widely used as  
137 a flavouring agent in foods and as an additive in perfumes, cosmetics and tobacco  
138 (Zhang et al. 2000), eugenol has antioxidant properties (Ogata et al. 2000; Rauscher et  
139 al. 2001) and presents antibacterial activity against different microorganisms (*Listeria*  
140 *monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeuroginosa*).  
141 (García-García et al. 2011; Chen et al. 2015). Devi et al. (2010) demonstrated that  
142 eugenol is an antibacterial effective against *Salmonella typhy*.

143 The combination of certain components of essential oils may result in a synergistic effect  
144 on the antimicrobial activity (Chen et al. 2015). García-García et al. (2011) evaluated the

145 bactericidal action of carvacrol, thymol and eugenol in *Listeria innocua*—studied  
146 separately, in binary or ternary combination. It was found that the minimum concentration  
147 of each compound capable of inhibiting microorganisms was given 150, 250 and 450  
148 ppm, respectively. In the study of the binary combination, the concentrations of 62.5 ppm  
149 thymol and 75 ppm carvacrol or 56.25 ppm thymol and 125 ppm eugenol were the most  
150 efficient combinations capable of inhibiting *L. innocua*. The ternary mixture of carvacrol-  
151 thymol-eugenol at respective concentrations of 75, 31.25 and 56.25 ppm were also  
152 effective in complete inhibition of *L. innocua*. These results demonstrate the importance  
153 of applying essential oils in the control of microorganisms and effectiveness thereof when  
154 used in combination.

155 Teixeira et al. (2013) determined the efficacy of 17 essential oils to inhibit the growth of  
156 seven species of pathogenic bacteria—*Brochothrix thermosphacta*, *Escherichia coli*,  
157 *Listeria innocua*, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas putida*, *Salmonella*  
158 *typhimurium*, and *Shewanella putrefaciens*—and they evaluated the antioxidant activity  
159 and chemical composition of essential oils. The study showed that the essential oils  
160 obtained from basil, celery seed, citronella, clove, coriander, garlic, marjoram, oregano,  
161 rosemary, sage, tarragon and thyme were effective in inhibiting the growth of seven  
162 species of pathogenic bacteria tested, and the essential oils of garlic, citronella and  
163 oregano were more efficient in inhibiting the growth thereof in minor amounts. As for  
164 antioxidant activity, the essential oils of clove, oregano and thyme showed higher  
165 antioxidant activity. Still, according to the authors, the antibacterial and antioxidant  
166 properties of these essential oils can be related to the presence of compounds such as  
167 carvacrol, thymol, eugenol and citronellal in the chemical composition of these oils.

168 Despite the potential benefits presented by the essential oils, their main compounds  
169 responsible for flavour and the functional properties, they are volatile, have hydrophobic  
170 nature, and are chemically unstable in the presence of oxygen, moisture and heat  
171 (Ascheri et al. 2003; Fernandes et al. 2014; Chen et al. 2015). These characteristics  
172 hinder their large-scale application in the food industry, and present difficulties in  
173 preserving them during processing and storage.

174 Encapsulation is an alternative to the industrial use of essential oils to make them more  
175 stable during handling, processing and storage. Several authors have used this  
176 technique; Shah et al. (2012) encapsulated thymol in conjugates of whey protein and  
177 maltodextrin, and Pan et al. (2014) studied the encapsulation thymol by sodium  
178 caseinate. Both studies showed that the encapsulated thymol was more effective than  
179 the non-encapsulated thymol in the inhibition of pathogenic microorganisms such as  
180 *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli*, because of their increased solubility and  
181 distribution. These results show that encapsulation of essential oils can improve the  
182 applications in the food industry.

183

### 184 **3. Microencapsulation**

185 Microencapsulation can be defined as a process by which small particles of solid, liquid  
186 or gas are surrounded by a coating in order to protect them from adverse environmental  
187 conditions, such as moisture, light, oxygen, interactions with other components, among  
188 other factors. The wall material allows protection of the compound of interest by means of  
189 a physical barrier between the core compound and other system components, which may  
190 release the content in a controlled manner under specific conditions (Silva et al. 2003;  
191 Santos et al. 2005; Fuchs et al. 2006; Favaro-trindade & Pinho 2008).

192 The classification of microencapsulated particles can be made due to their size, being  
193 divided into three categories: macro ( $> 5\ 000\ \mu\text{m}$ ), micro ( $0.2\text{--}5\ 000\ \mu\text{m}$ ) and  
194 nanoparticles ( $< 0.2\ \mu\text{m}$ ) (RÉ 1998).

195 The encapsulated material may be called the core material, fill, internal phase or actives.

196 The encapsulating material, i.e., one that covers the material to be encapsulated, may be  
197 termed coating, membrane, shell, capsule, vehicles, external phase or matrix (Fang &  
198 Bhandari 2010; Nedovic et al. 2011).

199 The microparticle core can be composed of one or more ingredients and the wall can be  
200 a single or double layer. The protection efficiency mainly depends on the composition  
201 and formulated wall structure as well as the process conditions (temperature, pH,  
202 pressure, humidity) during the production and application of such particles (Fuchs et al.  
203 2006; Gharsallaoui et al. 2007).

204 The microparticles may be divided into two specific types: the microcapsules and  
205 microparticles (Figure 1). This specification relates to materials and methods involved in  
206 their preparation (Silva et al. 2003; Madene et al. 2006).

207

## 208 **FIGURE 1**

209

210 Microencapsulation is of significant interest to the pharmaceutical industry, and is related,  
211 for example, to the controlled release of drugs and vaccines, but it also has importance  
212 for the food industry. Industrial food production requires the addition of certain functional  
213 ingredients with the objective of controlling flavour, colour, texture, or to preserve the  
214 properties of the food; in addition, it is often necessary to add compounds with potential

215 health benefits, thus, the stability thereof to be ensured (Gouin 2004; Champagne &  
216 Fustier 2007).

217 According to Ré (2000) microencapsulation of essential oils is used to control and  
218 prevent the oxidation and loss of volatile substances, and to control the release of  
219 flavours. In addition, the technique enables protecting the ingredients against nutritional  
220 losses, and preserves or masks the colour and flavours, inhibiting a reaction with other  
221 materials; it also increases shelf life, and allows a mechanism of control and release of  
222 certain components in foods.

223 Chen et al. (2015) studied the co-encapsulation of eugenol and thymol in zein/casein  
224 complex. Properties of the capsules obtained were evaluated by the anti-solvent  
225 precipitation technique after spray drying. The capsules were easily hydrated, and this  
226 resulted in stable dispersions of particles having an average size less than 200 nm.  
227 Encapsulated oils presented controlled release in 24 hours; and eugenol showed a  
228 higher release rate than thymol. With concentrations of  $2.5 \text{ mg.mL}^{-1}$  for both oils, the  
229 capsules showed a bactericidal and bacteriostatic effect, respectively, to *Escherichia coli*  
230 O157:H7 and *Listeria monocytogenes* Scott A. These results show that it is possible to  
231 increase the antibacterial efficiency and enable a release profile for essential oils such as  
232 eugenol and thymol, with the encapsulation.

233 Choi et al. (2009) studied the encapsulation of eugenol by two techniques and two types  
234 of wall material to evaluate oxidative stability of the encapsulated eugenol. In both  
235 techniques studied, the authors found that the microcapsules are stable; however, the  
236 particles resulting of emulsion-diffusion method wherever the polycaprolactone polymer  
237 (PCL) was used had greater oxidative stability due to the storage time compared to the  
238 particles obtained by the molecular inclusion technique using  $\beta$ -cyclodextrin and 2-

239 hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin as wall materials. The analysis of transmission electron  
240 microscopy confirmed the stability due to greater involvement of eugenol by the wall  
241 material (PCL), as can be seen in Figure 2.

242

## 243 **FIGURE 2**

244

245 In order to increase the thermal stability of eugenol, Woranuch & Yoksan (2013)  
246 encapsulated it into chitosan nanoparticles by the ionic emulsion-gel method. The results  
247 demonstrated that the nanoparticles had thermal stability, and that the same could  
248 possibly be applied in various heat treatment conditions, including bioactive plastics for  
249 food packaging.

250

## 251 **4. Materials used in the microencapsulation**

252 The efficiency of the microencapsulation and the stability of the microparticles depend  
253 primarily on the material used as the encapsulating agent (Zbicinski et al. 2002; Wang et  
254 al. 2009).

255 The wall materials used in the microencapsulation can be selected according to their  
256 physical properties, the core material (active agent) of desired application, the method  
257 used for obtaining the microparticles, the release mechanism, and the desired  
258 characteristics of the final product (Gouin 2004; Alvarenga Botrel et al. 2012). The  
259 selection takes place from a wide variety of natural and synthetic polymers (Alvarenga  
260 Botrel et al. 2012).

261 The wall materials commonly used in the encapsulation include natural or synthetic  
262 polymers and co-polymers, carbohydrates (starches, maltodextrins, corn syrup, dextran,

263 sucrose, cyclodextrin, cellulose and chitosan), gums (acacia gum, agar, sodium alginate  
264 and carrageenan), lipids (wax, stearic acid, tristearin, mono- and di-glycerides, oils and  
265 fats), and proteins (gluten, casein, gelatin, albumin, hemoglobin, peptides) (Dubey et al.  
266 2009).

267 The ideal encapsulating should have low viscosity at high concentrations, be easily  
268 handled during the process, and have low hygroscopicity to facilitate handling and avoid  
269 agglomeration (Favaro-trindade & Pinho 2008). In addition, it must have the ability to  
270 package the active material inside the capsule structure, completely release the solvent  
271 or other materials used during the encapsulation process, provide maximum protection to  
272 the active material against adverse conditions (light, pH, oxygen and ingredients  
273 reactive); be soluble in solvents commonly used, has the desired release properties of  
274 the active material and does not present unpleasant taste in the case of oral  
275 consumption, and be economical (Jafari et al. 2008). In practice, mixtures are used often  
276 because the same compound does not encompass all of these properties (Favaro-  
277 trindade & Pinho 2008).

278 Banerjee et al. (2013) used blends of carbohydrates and proteins to encapsulate the oil  
279 *Zanthoxylum limonella* technique for multiple emulsion/solvent evaporation. The influence  
280 of process variables on the properties of the microcapsules was evaluated. It was found  
281 that the volume of the internal aqueous phase of alginate, the volume of the external  
282 aqueous phase of gelatin, the concentration of the surfactant agent in the gelatin outer  
283 aqueous phase had a significant influence on the properties of the microcapsules. The  
284 microcapsules containing essential oil showed smooth and spherical morphology as  
285 revealed by scanning electron micrograph. The results of Fourier Transform Infrared



286 (FTIR) indicated characteristics of stability and the absence of chemical interaction  
287 between the microencapsulated oil and blends.

288 Among the materials used for encapsulating, carbohydrates are the most used due to  
289 their ability to bind to aromatic compounds as well as their diversity and low cost  
290 (Azeredo 2005). They are used alone or in combination with other carbohydrates or  
291 proteins.

292 Almeida et al. (2013) encapsulated essential oils of oregano (*Origanum vulgare*),  
293 sorghum starch and rice with the supercritical carbon dioxide technique, by varying the  
294 pressure conditions of temperature. At 40 °C and 10 Mpa microcapsules with higher  
295 values of antioxidant activity and stability were obtained.

296 Fernandes et al. (2014) studied the effects of the use of gum arabic and its total and  
297 partial replacement by modified starch, maltodextrin and inulin in the encapsulation of  
298 rosemary essential oil spray. For the oil retention results, the authors observed that the  
299 microparticles obtained with gum arabic, with modified starch and modified starch—  
300 maltodextrin (1:1, w/w)—they showed the highest average values of encapsulation  
301 efficiency ( $p < 0.05$ ), 56.83, 56.79 and, 60.22%, respectively, and were statistically  
302 similar. The modified starch combinations: gum arabic and inulin—maltodextrin, both 1:1  
303 w/w—also showed statistically similar mean values equal to 44.45%, and the use of gum  
304 arabic:inulin (1:1, w/w) resulted in the lowest average efficiency (29.53%), differing from  
305 the other ( $p < 0.05$ ). These results suggest that the study of wall material combinations  
306 can result in conditions of greater oil retention capacity in the encapsulating matrix by  
307 increasing the process efficiency. When evaluating the morphology of the microcapsules,  
308 the authors found that those obtained with gum arabic or modified starch, either pure,  
309 resulted in larger particles than in the combined studies.

310 According to Krishnan et al. (2005) and Kanakdande et al. (2007) despite being an  
311 excellent encapsulating material, arabic gum presents some problems for its use in  
312 microencapsulation, such as its high cost and limited supply, which has encouraged its  
313 use in combination with other materials.

314 Cyclodextrins are cyclic oligosaccharides resulting from the degradation of starch and  
315 may be used as viable materials for the microencapsulation technique. They are  
316 biocompatible for humans, and capable of improving physical, chemical and biological  
317 properties of the bioactive compound to be microencapsulated (Pinho et al. 2014).

318 Cyclodextrins have been reported to protect essential oils by the formation of complexes.  
319 Nuchuchua et al. (2009) studied eugenol encapsulated in different types of cyclodextrin  
320 by inclusion complexation. The authors found that the aromatic moiety of eugenol was  
321 partially incorporated by  $\alpha$ -cyclodextrin in its hydrophobic cavity, whereas for the  $\beta$  forms  
322 and hydroxypropyl- $\beta$ , aromatic eugenol portions were completely embedded. The  
323 different types of cyclodextrin resulted in different release profiles.

324 Hill et al. (2013) encapsulated cinnamon bark extract, *trans*-cinnamaldehyde, clove  
325 extract, and a mixture of eugenol *trans*-cinnamaldehyde:eugenol in  $\beta$ -cyclodextrin in the  
326 ratio 2: 1 by lyophilisation. The obtained microparticles had encapsulation efficiency  
327 values that varied from 41.7 to 84.7%, depending on the encapsulated compound, being  
328 higher when pure compounds were used.

329 The proteins extracted from animal products (whey protein, gelatin, casein) and  
330 vegetable proteins (soy protein, pea and cereals sources) are widely used as coating  
331 materials for encapsulating active substances, and have several advantages such as  
332 biocompatibility, biodegradability and functional properties (Nesterenko et al. 2013).

333 In food applications, plant proteins are known to be less allergenic as compared to  
334 animal proteins (Jenkins et al. 2007; Li et al. 2012). For this reason, over the years, the  
335 development of new applications for products rich in vegetable proteins has become an  
336 increasingly area of interest for research (Jiménez-Yan et al. 2006). However, there is a  
337 search for new materials that may be used as coatings that have a low cost, are  
338 nontoxic, and have good physical-chemical and relevant nutritional characteristics  
339 (Nesterenko et al. 2013).

340 Baranauskienė et al. (2006) studied the properties of encapsulation skimmed milk  
341 powder and whey protein concentrate for the encapsulation of essential oils of oregano  
342 (*Origanum vulgare* L.), citronella aromatic extracts (*Cymbopogon nardus* G.) and  
343 marjoram (*Manjorana hortensis* L.) by lyophilisation. Encapsulation efficiency  
344 percentages were obtained ranging from 54.3% (marjoram oil in whey protein  
345 concentrate) to 80.2% (oregano oil in skimmed milk powder), with no significant  
346 difference ( $p > 0.05$ ) for the amount of essential oils retained between the wall materials:  
347 skimmed milk powder and, whey protein concentrate. The morphology of the  
348 microparticles presented spherical form and exhibited as the same for both materials;  
349 however, microparticles using skimmed milk showed a smooth surface compared to  
350 microparticles using whey protein concentrate that had a rougher surface (Figure 3).

351

### 352 **FIGURE 3**

353

354 Charve & Reineccius (2009) studied two traditional wall materials—gum arabic and  
355 modified starch—and three proteins—sodium caseinate, whey and soy protein isolates in  
356 different percentage solids in the encapsulation of limonene and three unsaturated

357 aldehydes (hexanal, cinnamaldehyde and citral). The authors found that the gum arabic  
358 (94%), modified starch (88%) and whey protein (87%), respectively, showed higher  
359 flavour retention during drying. During storage, gum arabic provided higher flavour  
360 retention (37 to 58%), but did not provide good protection against oxidation of the  
361 limonene. In all microcapsules using proteins a non-enzymatic browning reaction was  
362 found, especially when using whey protein; however, when gum arabic and modified  
363 starch were used, the reaction was not observed.

364

### 365 **5. Use of the spray drying technique in microencapsulation**

366 The microencapsulation process of essential oils can be accomplished by various  
367 techniques. Among them, spray drying (Chatterjee & Bhattacharjee 2013), molecular  
368 inclusion (Choi et al. 2009), multiple emulsion/solvent evaporation (Banerjee et al. 2013),  
369 coacervation (Alvim & Grosso 2010), extrusion (Yuliani et al. 2004), co-crystallisation  
370 (Astolfi-filho et al. 2005), and fluidised bed (Fuchs et al. 2006) stand out. Each  
371 microencapsulation process depends on several aspects; however, the basic principle is  
372 common to all, i.e., forming a wall coating a nonpolar-polar filling or vice versa. The  
373 method chosen for a particular application depends on a number of factors, such as  
374 particle size required, physical and chemical properties of the core and the wall,  
375 application of the final product, desired release mechanisms, production scale, and cost  
376 (Ré 1998; Anal & Singh 2007).

377 Spray drying is the most commonly used encapsulation method in the food industry,  
378 which enables the removal of moisture and reduces water activity, ensuring the  
379 microbiological stability of the products, avoiding the risk of chemical and biological

380 degradation, lower costs of storage or transportation, leading to a product with specific  
381 properties such as, for example, instantaneous solubility (Gharsallaoui et al. 2007).

382 In this process, a liquid product is sprayed in a hot gas current to instantaneously obtain  
383 a powder. The gas typically used is air or, more rarely, an inert gas such as nitrogen. The  
384 initial liquid spray feed can be a solution, an emulsion or suspension. Spray drying  
385 produces, depending on the feed material, a very fine powder (10 to 50  $\mu\text{m}$ ) and larger  
386 particles (2 to 3 mm) (Flores-Martínez et al. 2004). When using the technique of  
387 microencapsulation by spray drying, in addition to the properties of the wall material, the  
388 composition of the features used for obtaining microparticles or microcapsules must also  
389 be taken into consideration. According to Barbosa et al. (2005) another factor that must  
390 be taken into consideration, which affects the microencapsulation of oils and flavourings,  
391 is the stability of the emulsions used to produce the microcapsules. Generally, the more  
392 stable the emulsion, the greater the encapsulation efficiency, i.e., the smaller the amount  
393 of material present in the un-encapsulated surface of the particles or capsules.

394 The selection of a suitable wall material is critical for microencapsulation by spray drying,  
395 as it must prevent changes due to oxidation, chemical interactions or volatilisation  
396 (Alvarenga Botrel et al. 2012) and maximise retention of essential oils after the drying  
397 process (Fernandes et al. 2014).

398 Spray drying is a technique where high temperatures are applied, but with the rapid  
399 evaporation, a relatively low temperature of the droplets remains, and thus can be  
400 applied to heat sensitive products without affecting the quality of the final product (RÉ  
401 1998). Figure 4 shows a schematic representation of the steps involved in the technique  
402 of microencapsulation by spray drying.

403

404 **FIGURE 4**

405

406 Spray drying is a technique that has many advantages, including the low production cost,  
407 varieties of encapsulating matrices, good retention of volatiles, good stability of the  
408 encapsulated, large-scale production in a continuous mode; thus it is the most widely  
409 used by the food industry. The disadvantage of spray drying in the microencapsulation  
410 process is the formation of fibers at high intermolecular bonds between the polymer  
411 chains, and the inability of the atomising force to break the liquid into droplets (Silva et al.  
412 2003). Table 1 shows some authors that studied de microencapsulation of essential oils  
413 by spray drying using different types of wall material.

414

415 **TABLE 1**

416

417 Chatterjee & Bhattacharjee (2013) studied the microencapsulation rich clove extract  
418 eugenol matrix of maltodextrin and gum arabic using the spray drying technique, in order  
419 to evaluate its antioxidant effectiveness in soybean oil. Antioxidant activity (DPPH, IC<sup>50</sup>)  
420 of soybean oils added clove extract encapsulated, un-encapsulated and BHT  
421 (commercial antioxidant) was compared 30 days. It was observed that at the beginning of  
422 the test, BHT showed higher antioxidant power compared to the other treatments.  
423 However, on the tenth day, there was a significant reduction antioxidant activity in oil  
424 added BHT, and in oil added un-encapsulated clove extract. These results show an  
425 important application of microencapsulated essential oils in foods, which, in this case,  
426 present a controlled release mechanism, thereby controlling the oxidative process of food  
427 throughout the storage step, and the addition of different essential oils *in natura* or other

428 commercial antioxidants. It was also found that the microparticles had a maximum  
429 encapsulation efficiency of 65% with a ratio of 1:4.8:4 clove extract : maltodextrin : gum  
430 arabic.

431 Soottitantawat et al. (2005) have also made use of spray drying for microencapsulation *l*-  
432 menthol, using gum arabic and two commercial types of modified starch as encapsulating  
433 agents. They evaluated the retained oil content in the different wall materials, internal and  
434 external morphological characteristics of the microparticles, and release of the  
435 encapsulated *l*-menthol. The results showed a higher retention of *l*-menthol with an  
436 increased concentration of modified starch. The rate of release was increased with the  
437 gum arabic. The outer structures of the microparticles were similar for all materials wall  
438 studied; however, a smoother surface was observed in the internal structures of the  
439 microparticles used as the modified starch (Figure 5).

440

#### 441 **FIGURE 5**

442

443 Bae & Lee (2008) studied avocado oil microencapsulation by spray drying into whey  
444 protein in combination with maltodextrin in varying proportions. Encapsulation values  
445 between 45% and 66% were obtained, without a statistically significant difference  
446 between samples ( $p > 0.05$ ). A high degree of agglomeration was also observed for small  
447 particles and surface roughness that was directly proportional to the amount of  
448 maltodextrin used in the sample (Figure 6).

449

#### 450 **FIGURE 6**

451

452 Microencapsulation of black pepper oleoresin was performed by spray drying, using  
453 modified starch or gum arabic as wall material. The microcapsules were tested for  
454 stability and content of the volatiles, non-volatile, complete piperine and piperine  
455 encapsulated for six weeks. Gum arabic offered greater protection for pepper oleoresin of  
456 the modified starch. The obtained particles had a smooth surface, almost spherical  
457 (Shaikh et al. 2006).

458 In some studies, it was observed that the spray drying technique can be used in  
459 combination with another technique, such as complex coacervation, for example.

460 Complex coacervation microencapsulation is widely used when hydrophobic compounds  
461 are based on the interaction between different polymers with opposite charges, and this  
462 interaction in turn allows the formation of insoluble complexes and phase separation.  
463 With this technique, thermal and mechanical properties such as strength, permeability  
464 and release the wall of coacervates microparticles can be achieved through crosslinking,  
465 using chemical or enzymatic agents (De Kruif et al. 2004; Alvim & Grosso 2010).

466 Alvim & Grosso (2010) studied microencapsulation by complex coacervation using a  
467 mixture of oleoresin paprika and soybean oil as the core, cross-linked with  
468 glutaraldehyde or transglutaminase, and dried by lyophilisation or spray drying. There  
469 were effects of cross-linking and drying on the morphological characteristics, size of the  
470 microparticles and the release of the hydrophobic core. The moist samples had  
471 encapsulation efficiency greater than 96%. The mean diameters ranged from 43.7 to 96.4  
472  $\mu\text{M}$  for moist samples, from 38.1 to 65.2  $\mu\text{M}$  for dehydrated samples, and from 62.5 to  
473 106.9  $\mu\text{M}$  for the rehydrated samples. The integrity of the particles without crosslinking  
474 was maintained when lyophilisation was used. After spray drying, only cross-linked  
475 samples maintained the integrity of the wall. The microparticles showed spherical shape



476 and, in the case of rough walls dried samples, no cracks were observed. Moist particles  
477 cross-linked with glutaraldehyde at a concentration of  $1.0 \text{ mM.g}^{-1}$  protein were more  
478 effective in the retention of the oils compared to  $0.1 \text{ mM.g}^{-1}$  protein, or cross-linked with  
479 transglutaminase ( $10 \text{ U.g}^{-1}$  protein). Drying influences the release profile of oils, reducing  
480 the amount released for the dry samples. In this conditions studied, lyophilisation  
481 technique was more efficient than spray drying one, for drying of microparticles  
482 considering its integrity and yield of the process. However, although the most efficient  
483 results were obtained with lyophilisation alternative strategies has been studied to  
484 improve spray drying technique, allowing better results to due advantages already  
485 reported, mainly in terms of costs when compared at lyophilisation.

486 Costa et al. (2013) studied microencapsulation of oregano essential oil by spray drying  
487 varying the mixture of wall materials, arabic gum, modified starch and maltodextrin, by a  
488 simplex-centroid design. Carvacrol quantification was used for to determine retention oil  
489 (%) as it the carvacrol is the major phenolic compound existent in the oregano essential  
490 oil. Maximum concentration of 57.8% was obtained in the microparticle with the use of  
491 62.5% Arabic gum and 37.5% maltodextrin. In the microparticles with 74.5% Arabic gum,  
492 12.7% modified starch and 12.7% maltodextrin was found greater retention oil (77.4%).  
493 When Arabic gum was used alone major efficiency encapsulations was obtained (93%).  
494 These results could be suggesting that combination of wall material reported and the  
495 spray drying technique are a good alternative for stabilisation of oregano essential oil,  
496 was obtained high retention oil values, and encapsulation efficiency. Moreover, the study  
497 of the combination of wall materials used for the spray drying technique may result in an  
498 increased efficiency technique for encapsulation of essential oils.

499

## 500 **6. Conclusion**

501 Microencapsulation technology has been studied to obtain high quality food products.

502 This technology should be able to protect the compound encapsulated throughout the

503 processing period, storage, and transport, to eliminate problems arising from the

504 incorporation of certain compounds in food.

505 The potential benefits of essential oils can be investigated, and their use can be made

506 possible in food for its microencapsulation. Microencapsulation by the spray drying

507 technique is robust and has been presented as an alternative for obtaining

508 microparticles, or microcapsules, widely used in the food industry.

509

## 510 **5. ACKNOWLEDGEMENTS**

511 The authors would like to thank the financial support of CAPES and CNPq.

512

## 513 **6. REFERENCES**

514 Almeida, A.P. et al., 2013. Microencapsulation of oregano essential oil in starch-based materials  
515 using supercritical fluid technology. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 20,  
516 pp.140–145.

517 Alvarenga Botrel, D. et al., 2012. Evaluation of spray drying conditions on properties of  
518 microencapsulated oregano essential oil. *International Journal of Food Science &  
519 Technology*, 47(11), pp.2289–2296.

520 Alvim, I.D. & Grosso, C.R.F., 2010. Microparticles obtained by complex coacervation: influence of  
521 the type of reticulation and the drying process on the release of the core material. *Ciência e  
522 Tecnologia de Alimentos*, 30(4), pp.1069–1076.

523 Anal, A.K. & Singh, H., 2007. Recent advances in microencapsulation of probiotics for industrial  
524 applications and targeted delivery. *Trends in Food Science & Technology*, 18(5), pp.240–  
525 251.

526 Angioni, A. et al., 2004. Chemical Composition, Plant Genetic Differences, Antimicrobial and  
527 Antifungal Activity Investigation of the Essential Oil of *Rosmarinus officinalis* L. *Journal of  
528 Agricultural and Food Chemistry*, 52(11), pp.3530–3535.

- 529 Ascheri, D.P.R., Marquez, M.O.M. & Martucci, E.T., 2003. Microencapsulação de óleo essencial  
530 de laranja: seleção de material de parede. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 23, pp.1–6.
- 531 Astolfi-filho, Z. et al., 2005. Encapsulação de suco de maracujá por co-cristalização com  
532 sacarose : cinética de cristalização e propriedades físicas. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, 25(4),  
533 pp.795–801.
- 534 Augustin, M. A., Sanguansri, L. & Bode, O., 2006. Maillard reaction products as encapsulants for  
535 fish oil powders. *Journal of Food Science*, 71(2), pp. 25–32.
- 536 Avato, P. et al., 2005. Glandular hairs and essential oils in micropropagated plants of *Salvia*  
537 *officinalis* L. *Plant Science*, 169(1), pp.29–36.
- 538 Bae, E.K. & Lee, S.J., 2008. Microencapsulation of avocado oil by spray drying using whey  
539 protein and maltodextrin. *Journal of Microencapsulation*, 25(8), pp.549–560.
- 540 Bakkali, F. et al., 2008. Biological effects of essential oils - A review. *Food and Chemical*  
541 *Toxicology*, 46(2), pp.446–475.
- 542 Banerjee, S. et al., 2013. Influence of process variables on essential oil microcapsule properties  
543 by carbohydrate polymer-protein blends. *Carbohydrate Polymers*, 93(2), pp.691–697.
- 544 Baranauskienė, R. et al., 2006. Properties of oregano (*Origanum vulgare* L.), citronella  
545 (*Cymbopogon nardus* G.) and marjoram (*Majorana hortensis* L.) flavors encapsulated into  
546 milk protein-based matrices. *Food Research International*, 39(4), pp.413–425.
- 547 Barbosa, M.I.M.J., Borsarelli, C.D. & Mercadante, a. Z., 2005. Light stability of spray-dried bixin  
548 encapsulated with different edible polysaccharide preparations. *Food Research*  
549 *International*, 38(8-9), pp.989–994.
- 550 Betoret, E. et al., 2011. Functional foods development: Trends and technologies. *Trends in Food*  
551 *Science and Technology*, 22(9), pp.498–508.
- 552 Burt, S., 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods--a  
553 review. *International journal of food microbiology*, 94(3), pp.223–53.
- 554 Castillo, S. et al., 2014. The essential oils thymol and carvacrol applied in the packing lines avoid  
555 lemon spoilage and maintain quality during storage. *Food Control*, 35(1), pp.132–136.
- 556 Champagne, C.P. & Fustier, P., 2007. Microencapsulation for the improved delivery of bioactive  
557 compounds into foods. *Current Opinion in Biotechnology*, 18(2), pp.184–190.
- 558 Charve, J. & Reineccius, G. a., 2009. Encapsulation performance of proteins and traditional  
559 materials for spray dried flavors. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(6),  
560 pp.2486–2492.
- 561 Chatterjee, D. & Bhattacharjee, P., 2013. Comparative evaluation of the antioxidant efficacy of  
562 encapsulated and un-encapsulated eugenol-rich clove extracts in soybean oil: Shelf-life and  
563 frying stability of soybean oil. *Journal of Food Engineering*, 117(4), pp.545–550.

- 564 Chávarri, M., Marañón, I. & Villarán, M.C., 2012. Encapsulation Technology to Protect Probiotic  
565 Bacteria. *Probiotics*, pp.501–540.
- 566 Chen, H., Zhang, Y. & Zhong, Q., 2015. Physical and antimicrobial properties of spray-dried  
567 zein–casein nanocapsules with co-encapsulated eugenol and thymol. *Journal of Food*  
568 *Engineering*, 144, pp.93–102.
- 569 Choi, M.-J. et al., 2009. Physical and light oxidative properties of eugenol encapsulated by  
570 molecular inclusion and emulsion–diffusion method. *Food Research International*, 42(1),  
571 pp.148–156.
- 572 Costa, J.M.G. da et al., 2013. Matrix structure selection in the microparticles of essential oil  
573 oregano produced by spray dryer. *Journal of Microencapsulation*, 30(8), pp.717–727.
- 574 Devi, K.P. et al., 2010. Eugenol (an essential oil of clove) acts as an antibacterial agent against  
575 *Salmonella typhi* by disrupting the cellular membrane. *Journal of Ethnopharmacology*,  
576 130(1), pp.107–115.
- 577 Dubey, R., Shami, T.C. & Bhasker Rao, K.U., 2009. Microencapsulation technology and  
578 applications. *Defence Science Journal*, 59(1), pp.82–95.
- 579 Fang, Z. & Bhandari, B., 2010. Encapsulation of polyphenols - A review. *Trends in Food Science*  
580 *and Technology*, 21(10), pp.510–523.
- 581 Favaro-trindade, C.S. & Pinho, S.C. De, 2008. Revisão - Microencapsulação de ingredientes  
582 alimentícios.pdf. , pp.103–112.
- 583 Fernandes, R.V.D.B., Borges, S.V. & Botrel, D.A., 2014. Gum arabic/starch/maltodextrin/inulin as  
584 wall materials on the microencapsulation of rosemary essential oil. *Carbohydrate Polymers*,  
585 101, pp.524–532.
- 586 Flores-Martínez, H. F., Osorio-Revilla, G. & Gallardo-Velázquez, T., 2004. Optimal spray-drier  
587 encapsulation process of orange oil. Proceedings of the 14th International Drying  
588 Symposium. São Paulo, A, pp. 621–627.
- 589 Fuchs, M. et al., 2006. Encapsulation of oil in powder using spray drying and fluidised bed  
590 agglomeration. *Journal of Food Engineering*, 75(1), pp.27–35.
- 591 García-García, R., López-Malo, A. & Palou, E., 2011. Bactericidal Action of Binary and Ternary  
592 Mixtures of Carvacrol, Thymol, and Eugenol against *Listeria innocua*. *Journal of Food*  
593 *Science*, 76(2), pp.M95–M100.
- 594 Gharsallaoui, A. et al., 2007. Applications of spray-drying in microencapsulation of food  
595 ingredients: An overview. *Food Research International*, 40(9), pp.1107–1121.
- 596 Gómez-Estaca, J. et al., 2010. Biodegradable gelatin–chitosan films incorporated with essential  
597 oils as antimicrobial agents for fish preservation. *Food Microbiology*, 27(7), pp.889–896.
- 598 Gouin, S., 2004. Microencapsulation. *Trends in Food Science & Technology*, 15(7-8), pp.330–  
599 347.

- 600 Guimarães, R., Sousa, M.J. & Ferreira, I.C.F.R., 2010. Contribution of essential oils and  
601 phenolics to the antioxidant properties of aromatic plants. *Industrial Crops and Products*,  
602 32(2), pp.152–156.
- 603 Hersch-Martínez, P., Leaños-Miranda, B.E. & Solórzano-Santos, F., 2005. Antibacterial effects of  
604 commercial essential oils over locally prevalent pathogenic strains in Mexico. *Fitoterapia*,  
605 76(5), pp.453–457.
- 606 Hill, L.E., Gomes, C. & Taylor, T.M., 2013. Characterization of beta-cyclodextrin inclusion  
607 complexes containing essential oils (trans-cinnamaldehyde, eugenol, cinnamon bark, and  
608 clove bud extracts) for antimicrobial delivery applications. *LWT - Food Science and  
609 Technology*, 51(1), pp.86–93.
- 610 Jafari, S.M. et al., 2008. Encapsulation Efficiency of Food Flavours and Oils during Spray Drying.  
611 *Drying Technology*, 26(7), pp.816–835.
- 612 Jenkins, J. a., Breiteneder, H. & Mills, E.N.C., 2007. Evolutionary distance from human homologs  
613 reflects allergenicity of animal food proteins. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 120(6),  
614 pp.1399–1405.
- 615 Jiménez-Yan, L. et al., 2006. Energy balance of *Litopenaeus vannamei* postlarvae fed on animal  
616 or vegetable protein based compounded feeds. *Aquaculture*, 260(1-4), pp.337–345.
- 617 Kanakdande, D., Bhosale, R. & Singhal, R.S., 2007. Stability of cumin oleoresin  
618 microencapsulated in different combination of gum arabic, maltodextrin and modified starch.  
619 *Carbohydrate Polymers*, 67(4), pp.536–541.
- 620 Kollanoor Johny, a. et al., 2010. Antibacterial effect of trans-cinnamaldehyde, eugenol, carvacrol,  
621 and thymol on *Salmonella Enteritidis* and *Campylobacter jejuni* in chicken cecal contents in  
622 vitro. *The Journal of Applied Poultry Research*, 19(3), pp.237–244.
- 623 Krishnan, S., Kshirsagar, a & Singhal, R., 2005. The use of gum arabic and modified starch in the  
624 microencapsulation of a food flavoring agent. *Carbohydrate Polymers*, 62(4), pp.309–315.
- 625 De Kruif, C.G., Weinbreck, F. & De Vries, R., 2004. Complex coacervation of proteins and anionic  
626 polysaccharides. *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, 9(5), pp.340–349.
- 627 Li, H. et al., 2012. Effects of high hydrostatic pressure treatment on allergenicity and structural  
628 properties of soybean protein isolate for infant formula. *Food Chemistry*, 132(2), pp.808–  
629 814.
- 630 Liolios, C.C. et al., 2009. Liposomal incorporation of carvacrol and thymol isolated from the  
631 essential oil of *Origanum dictamnus* L. and in vitro antimicrobial activity. *Food Chemistry*,  
632 112(1), pp.77–83.
- 633 Longaray Delamare, A.P. et al., 2007. Antibacterial activity of the essential oils of *Salvia officinalis*  
634 L. and *Salvia triloba* L. cultivated in South Brazil. *Food Chemistry*, 100(2), pp.603–608.
- 635 Madene, A. et al., 2006. Flavour encapsulation and controlled release - a review. *International  
636 Journal of Food Science and Technology*, 41(1), pp.1–21.

- 637 Nedovic, V. et al., 2011. An overview of encapsulation technologies for food applications.  
638 *Procedia Food Science*, 1, pp.1806–1815.
- 639 Nesterenko, A. et al., 2013. Vegetable proteins in microencapsulation: A review of recent  
640 interventions and their effectiveness. *Industrial Crops and Products*, 42(1), pp.469–479.
- 641 Ogata, M. et al., 2000. Antioxidant activity of eugenol and related monomeric and dimeric  
642 compounds. *Chem. Pharm. Bull.*, 48(10), pp.1467–1469.
- 643 Pan, K. et al., 2014. Thymol nanoencapsulated by sodium caseinate: physical and antilisterial  
644 properties. *Journal of agricultural and food chemistry*, 62(7), pp.1649–57.
- 645 Pierozan, M.K., Pauletti, G.F. & Rota, L., 2009. Chemical characterization and antimicrobial  
646 activity of essential oils of salvia L. species. *Cienc. Tecnol. Aliment. Campinas*, 29(4),  
647 pp.764–770.
- 648 Pinho, E. et al., 2014. Cyclodextrins as encapsulation agents for plant bioactive compounds.  
649 *Carbohydrate Polymers*, 101, pp.121–135.
- 650 Rauscher, M. F. et al, 2001. Effects of isoeugenol on oxidative stress pathways in normal and  
651 streptozotocin-induced diabetic rats. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*,  
652 15(3), pp.159–164.
- 653 RÉ, M. I., 1998. Microencapsulation by spray drying. *Drying Technology*, 16, pp. 1195–1236.
- 654 RÉ, M. I., 2000. Microencapsulação: em busca de produtos inteligentes. *Ciência Hoje*, 27(162),  
655 pp. 24–29.
- 656 Reineccius, G. a., 2004. The Spray Drying of Food Flavors. *Drying Technology*, 22(6), pp.1289–  
657 1324.
- 658 Santos, A.B. Dos, Fávaro-Trindade, C.S. & Grosso, C.R.F., 2005. Preparo e caracterização de  
659 microcápsulas de oleoresina de páprica obtidas por atomização. *Ciência e Tecnologia de*  
660 *Alimentos*, 25(2), pp.322–326.
- 661 Shah, B., Davidson, P.M. & Zhong, Q., 2012. Nanocapsular Dispersion of Thymol for Enhanced  
662 Dispersibility and Increased Antimicrobial Effectiveness against *Escherichia coli* O157:H7  
663 and *Listeria monocytogenes* in Model Food Systems. *Applied and Environmental*  
664 *Microbiology*, 78(23), pp.8448–8453.
- 665 Shaikh, J., Bhosale, R. & Singhal, R., 2006. Microencapsulation of black pepper oleoresin. *Food*  
666 *Chemistry*, 94(1), pp.105–110.
- 667 Silva, C. et al., 2003. Administração oral de peptídeos e proteínas : II . Aplicação de métodos de  
668 microencapsulação, 39, pp.1–20.
- 669 Soottitantawat, A. et al., 2005. Microencapsulation of l-menthol by spray drying and its release  
670 characteristics. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 6(2), pp.163–170.

- 671 Ben Taârit, M. et al., 2012. Fatty acids, phenolic changes and antioxidant activity of clary sage  
672 (Salvia sclarea L.) rosette leaves grown under saline conditions. *Industrial Crops and*  
673 *Products*, 38, pp.58–63.
- 674 Teixeira, B. et al., 2013. Chemical composition and antibacterial and antioxidant properties of  
675 commercial essential oils. *Industrial Crops and Products*, 43, pp.587–595.
- 676 Toure, A. et al., 2007. Microencapsulation and oxidative stability of ginger essential oil in  
677 maltodextrin/whey protein isolate (MD/WPI). *International Journal of Dairy Science*, 2(4), pp.  
678 29–35.
- 679 Wang, Y. et al., 2009. Study on microencapsulation of curcumin pigments by spray drying.  
680 *European Food Research and Technology*, 229(3), pp.391–396.
- 681 Woranuch, S. & Yoksan, R., 2013. Eugenol-loaded chitosan nanoparticles: I. Thermal stability  
682 improvement of eugenol through encapsulation. *Carbohydrate polymers*, 96(2), pp.578–85.
- 683 Yuliani, S. et al., 2004. Application of Microencapsulated Flavor to Extrusion Product. *Food*  
684 *Reviews International*, 20(2), pp.163–185.
- 685 Zaouali, Y., Bouzaine, T. & Boussaid, M., 2010. Essential oils composition in two *Rosmarinus*  
686 *officinalis* L. varieties and incidence for antimicrobial and antioxidant activities. *Food and*  
687 *chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological*  
688 *Research Association*, 48(11), pp.3144–52.
- 689 Zbicinski, I. et al., 2002. Advanced experimental analysis of drying kinetics in spray drying.  
690 *Chemical Engineering Journal*, 86(1-2), pp.207–216.
- 691 Zhang, R., Kulkarni, K. a & Kulkarni, a P., 2000. Oxidation of eugenol by purified human term  
692 placental peroxidase. *Placenta*, 21(2-3), pp.234–40.
- 693

## **DECLARATION OF INTEREST**

It is worth mentioning that the work is original and it is not being considered in any other journal.

All authors are aware of its submission.

Authors also declare that there is no conflict of interest regarding this work. The manuscript was prepared strictly according to the Journal format as provided in the Instruction for Authors document.



**Table 1** Encapsulation of essential oils in different materials by spray drying.

Essential oils	Wall material	References
<i>L</i> -menthol	Gum arabic and modified starch	(Soottitantawat et al. 2005)
Oregano essential oil ( <i>Origanum vulgare</i> L.), citronella ( <i>Cymbopogon nardus</i> G.) and sweet marjoram ( <i>Majorana hortensis</i> L.) aroma extracts	Powder milk and whey protein concentrate	(Baranauskienė et al. 2006)
Black pepper oleoresin	Gum arabic and modified starch	(Shaikh et al. 2006)
Avocado oil	Whey protein and maltodextrin	(Bae & Lee 2008)
Paprika oleoresin and soybean oil	Glutaraldehyde or transglutaminase	(Alvim & Grosso 2010)
Oregano essential oil	Arabic gum, modified starch and maltodextrin	(Costa et al. 2013)
Eugenol-rich clove extract	Maltodextrin and gum arabic	(Chatterjee & Bhattacharjee 2013)
Rosemary essential oil	Gum arabic/starch/ maltodextrin/inulin	(Fernandes et al. 2014)
Eugenol and thymol	Zein/casein complex	(Chen et al. 2015)

## FIGURE CAPTIONS

**Fig. 1** Schematic representation of the structure of different types of microparticles.

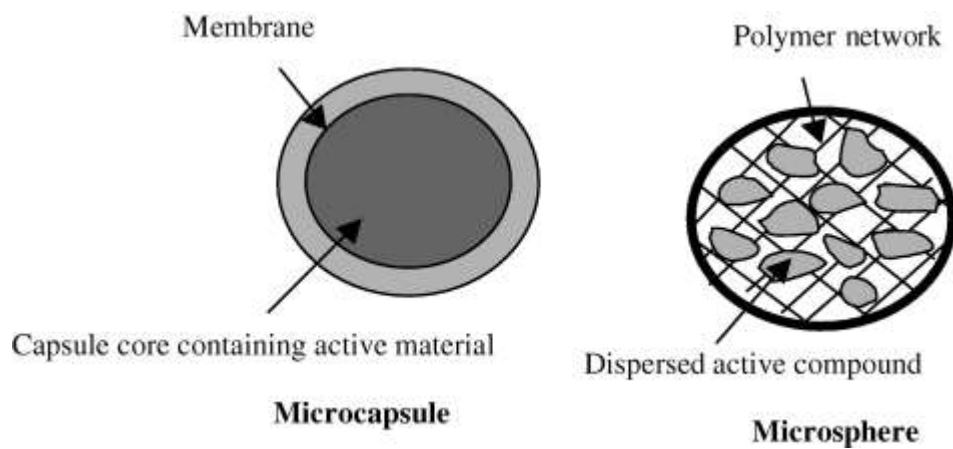
**Fig. 2** Transmission electron microscopy of the microparticles eugenol encapsulated.

**Fig. 3** Morphology obtained by scanning electron microscopy of microcapsules skimmed milk powder and whey containing oregano extracts (a, b), citronella (c, d) and marjoram (e, f).

**Fig. 4** Schematic diagram of a spray drying encapsulation process and image of a Mini spray Dryer B-290 (BÜCHI).

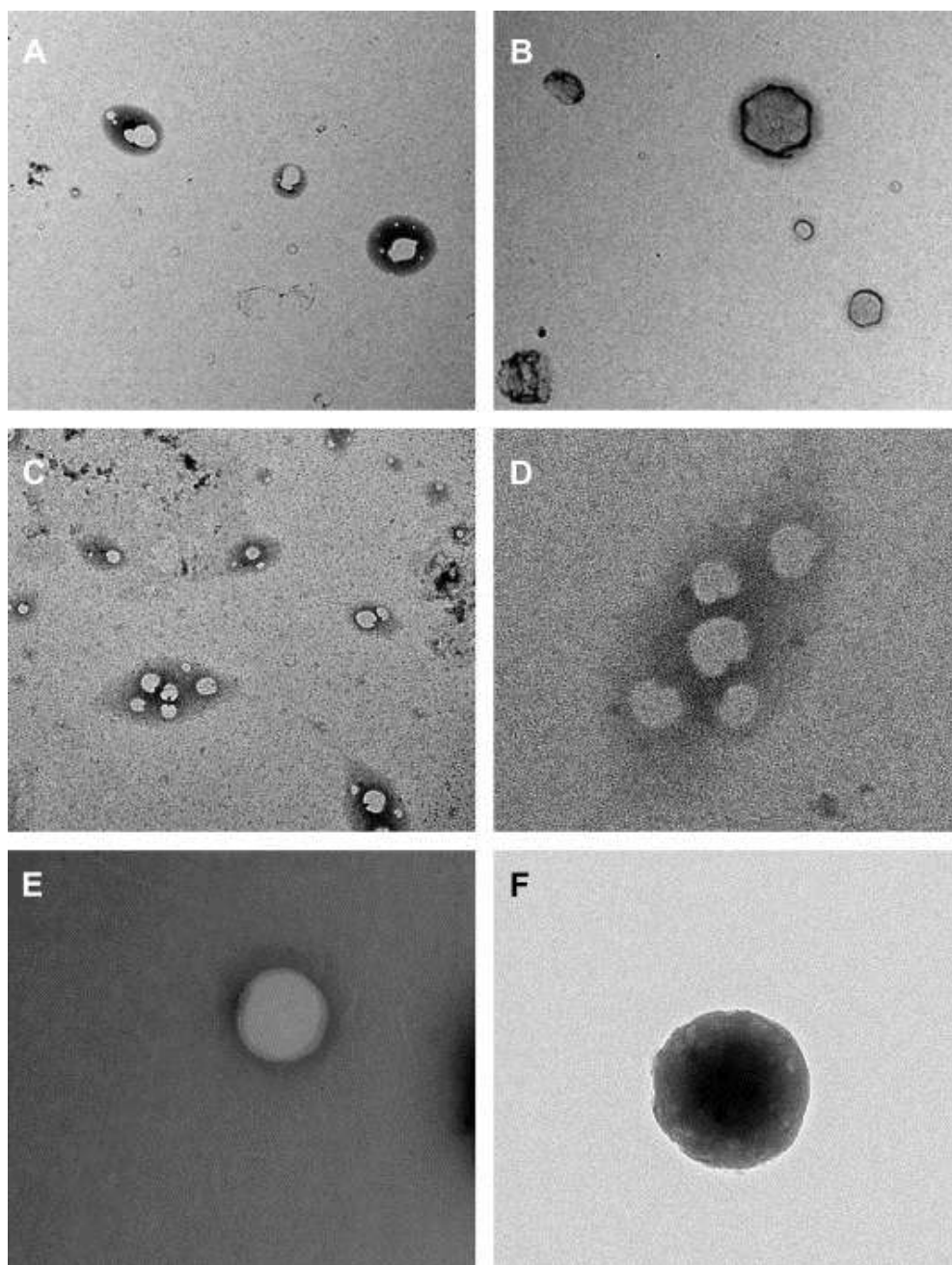
**Fig. 5** Structure of emulsion droplet (a-1, b-1 and c-1), internal (a-2, b-2 and c-2), and external (a-3, b-3 e c-3) structure of encapsulated *l*-mentol powder.

**Fig. 6** Micrographs obtained by scanning electronic microscopy of spray dried avocado oil encapsulated powders.



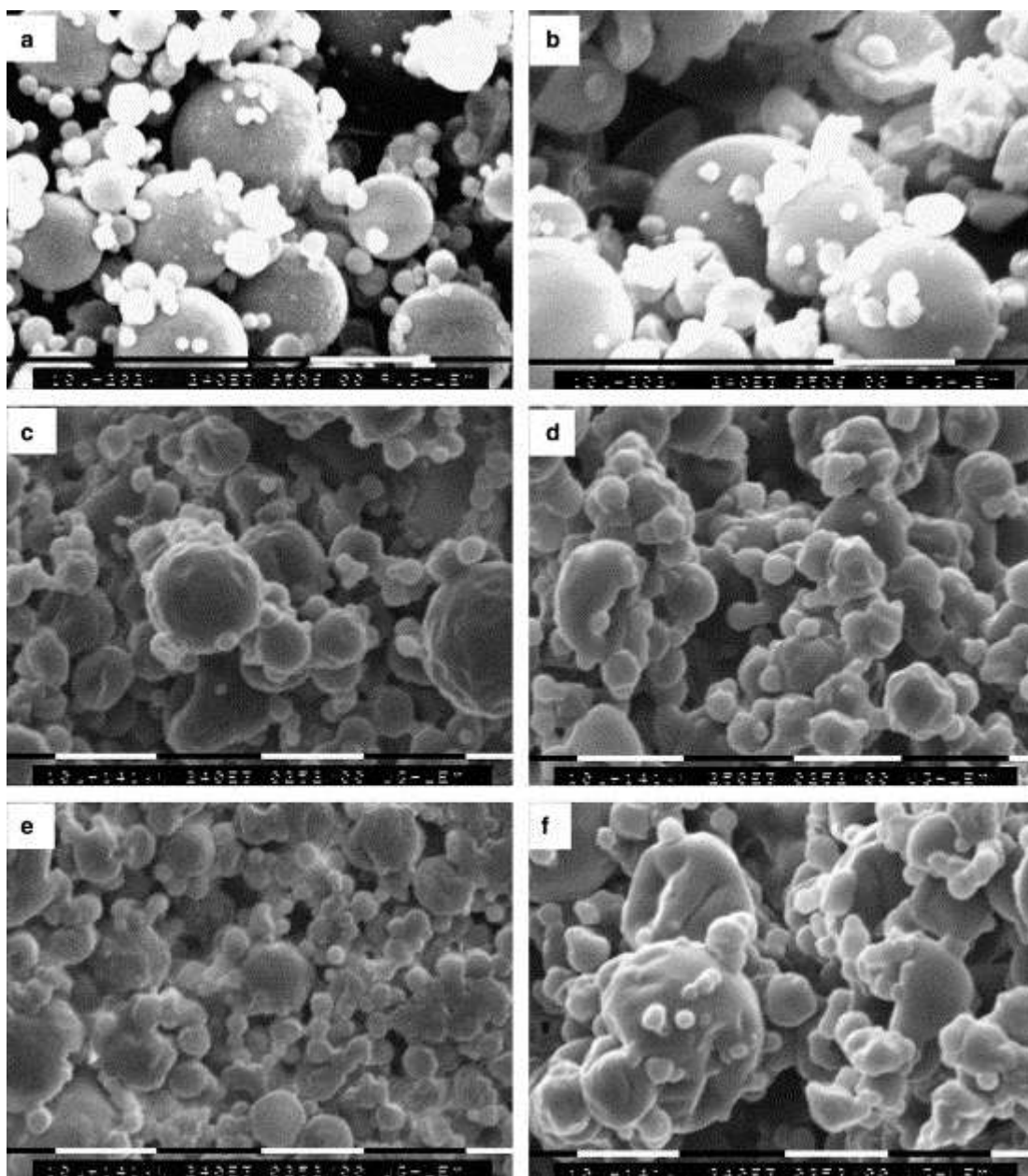
**Figure 1** Schematic representation of the structure of different types of microparticles.

Source: Adapted from Madene et al. (2006).



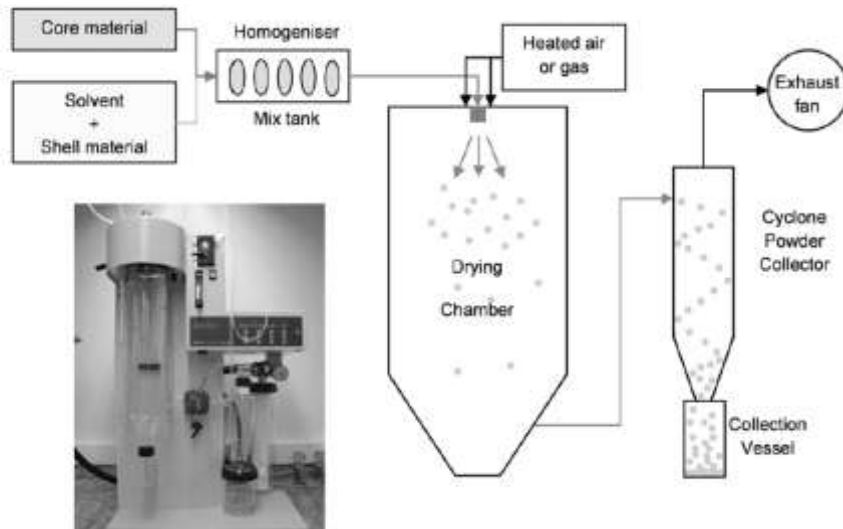
**Figure 2** Transmission electron microscopy of the microparticles eugenol encapsulated, magnification: 1,000 (A) and x3,000 (B) in  $\beta$ -cyclodextrin, 5,000 (C) and x20,000 (D) in 2-hidroxiampil- $\beta$ -ciclodextrina, 25,000 (E) and x20,000 (F) in PCL.

Source: Adapted from Choi et al. (2009).



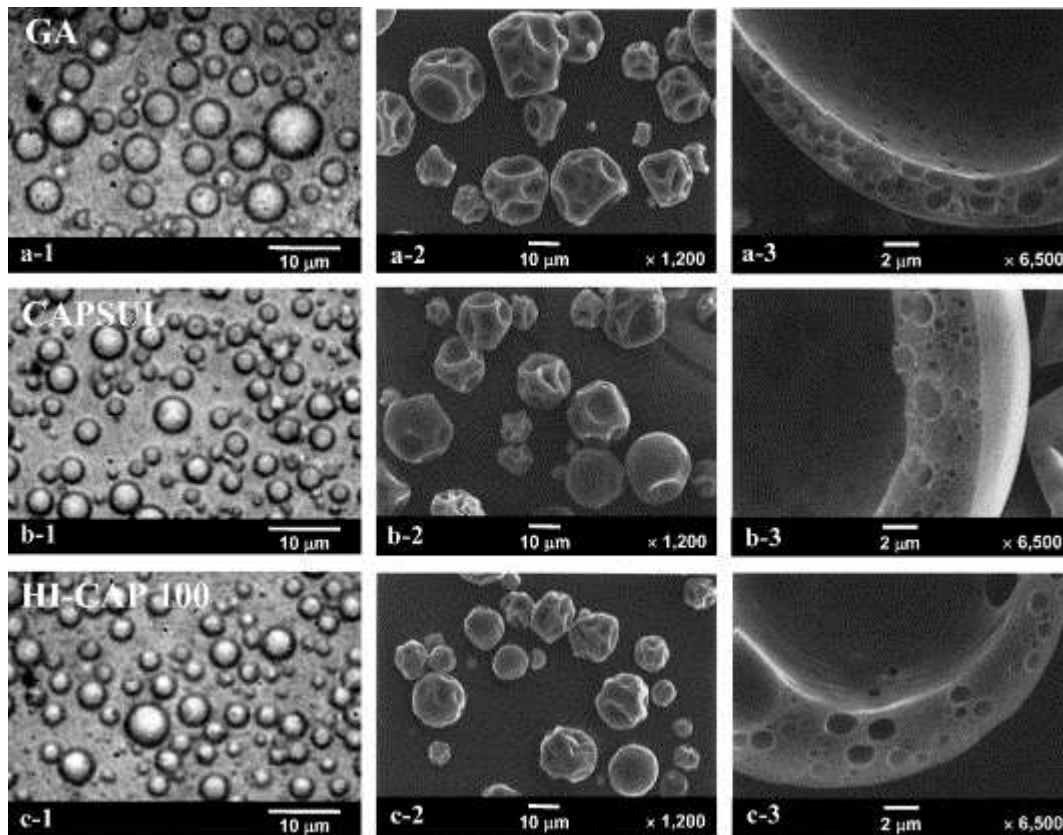
**Figure 3** Morphology obtained by scanning electron microscopy of microcapsules skimmed milk powder and whey containing oregano extracts (a, b), citronella (c, d) and marjoram (e, f), (magnification 2400x, scale bar 10  $\mu$ m).

Source: Adapted from Baranauskienė et al. (2006).



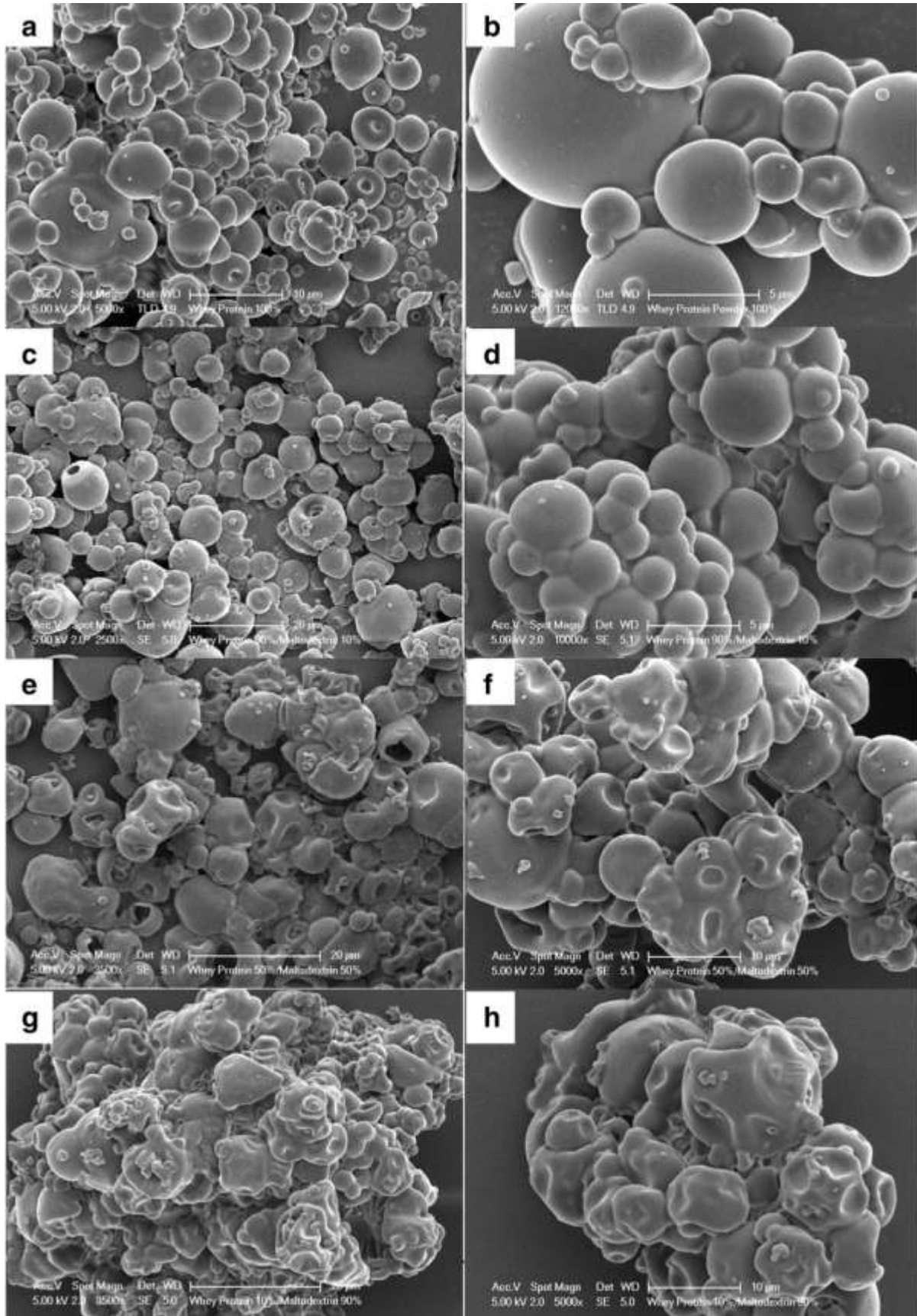
**Figure 4** Schematic diagram of a spray drying encapsulation process and image of a Mini spray Dryer B-290 (BÜCHI).

Source: Adapted from Chávarri et al. (2012).



**Figure 5** Structure of emulsion droplet (a-1, b-1 and c-1), internal (a-2, b-2 and c-2), and external (a-3, b-3 e c-3) structure of encapsulated *l*-mentol powder. The powders were prepared from the 30% w/w total solid content with *l*-mentol:wall materials mass ratio of 2:8. Wall material used: GA (gum arabic); CAPSUL and HI-CAP 100 (trademarks of modified starch).

Source: Adapted from Sootitawat et al. (2005).





**Figure 6** Micrographs obtained by scanning electronic microscopy of spray dried avocado oil encapsulated powders. Wall material systems: (a), (b) W100; (c), (d) W90MD10; (e), (f) W50MD50; (g), (h) W10MD90. Wall materials: W (whey protein milk) and MD (maltodextrin). The figures following letters indicate the percentage of each encapsulating agent.

Source: Adapted from Bae & Lee (2008).

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 MATERIAIS

Foi utilizado o Eugenol com pureza de 97,5% (Vetec™, Sigma-Aldrich, 97,5%) e como agentes encapsulantes: a carragena da Sigma (C1013, Sigma-Aldrich, grau comercial), proteína isolada do soro de leite com baixo teor de lactose (2,89 % de lactose) (obtida conforme procedimento descrito por Giraldi, Rodrigues e Cândido (2014)), proteína do farelo de arroz (produzida conforme metodologia descrita por Han et al. (2009) com modificações) e albumina sérica bovina (A2153, Sigma-Aldrich, grau comercial). Os demais reagentes utilizados foram de pureza analítica de diferentes procedências comerciais.

### 4.2 MÉTODOS

#### 4.2.1 Microencapsulação de Eugenol em Carragena

Foi realizada, inicialmente, pela obtenção de uma suspensão mediante o preparo de uma fase aquosa e uma fase orgânica. A fase aquosa consistiu na dissolução de carragena (2,0 g) em água destilada (400 mL) a temperatura de 60 °C sob agitação mecânica vigorosa por 15 minutos, com auxílio de um agitador magnético. A fase orgânica foi preparada pela solubilização de eugenol (0,2 g) e Tween 80 (0,12 g) em álcool etílico (10 mL) a temperatura ambiente (aproximadamente 25 °C), por 5 minutos. Após a obtenção das duas fases, a fase orgânica foi adicionada lentamente à fase aquosa mantendo a mistura sob agitação vigorosa por mais 5 minutos. Em seguida, a suspensão foi homogeneizada utilizando um agitador mecânico (Modelo 713D, Fisaton, São Paulo, Brasil), operando a 15.000 rpm durante 15 minutos. O teor de sólidos totais foi fixado em 0,55% m/m na suspensão final antes da atomização, onde a proporção de eugenol:sólidos foi fixada em 1:10 (m/m).

#### 4.2.1.1 Atomização

A obtenção das microcápsulas foi realizada pela secagem da suspensão por atomização. O processo foi realizado em um secador laboratorial Mini *Spray Dryer* (Labmarq - MSD 1,0, São Paulo, Brasil) com câmara de secagem de 500 mm x 150 mm, bico atomizador tipo duplo fluido, com orifício de 1,2 mm de diâmetro. Foi realizado um Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) para avaliar as condições operacionais desta etapa. O DCCR consistiu de duas variáveis independentes (temperatura do ar de secagem e vazão de alimentação), três pontos centrais e quatro pontos axiais, totalizando 11 ensaios. Os níveis reais e codificados das variáveis independentes  $X_T$  (Temperatura do ar de secagem, °C) e  $X_V$  (Vazão de alimentação, L.h<sup>-1</sup>) foram selecionados com base em estudos preliminares e estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Níveis reais e codificados das variáveis temperatura e vazão de alimentação.

Fatores	Níveis				
	-1,41	-1	0	+1	+1,41
$X_T$ - Temperatura do ar de secagem (°C)	109	115	130	145	151
$X_V$ - Vazão de alimentação (L.h <sup>-1</sup> )	0,46	0,50	0,60	0,70	0,74

Os ensaios para encapsulação do eugenol foram realizados aleatoriamente e as microcápsulas foram acondicionadas em frascos plásticos hermeticamente fechados, vedados com Parafilm®, e armazenados sob a temperatura de  $5 \pm 1$  °C até o momento da análise. Foram avaliadas a recuperação de eugenol e a eficiência de encapsulação. Para análise de efeitos, regressão, variância e superfície de repostas utilizou-se o *software* Statistica 8.0 ( $p \leq 0,05$ ) (Statsoft Inc., Tulsa, OK, USA).

#### 4.2.1.2 Avaliação das microcápsulas

Com o objetivo de determinar a estabilidade da suspensão obtida e quantificar o conteúdo real de eugenol após a microencapsulação, determinou-se a recuperação

percentual de eugenol (RE %). Para tanto, foram pesados 10 mg da amostra em um béquer, dissolvida em 5 mL de água destilada e aquecida em banho-maria a 60°C por 30 minutos. Posteriormente, adicionou-se 5 mL de álcool etílico e as amostras foram transferidas para tubos de centrifuga com capacidade de 250 mL e centrifugadas (Hettich Zentrifugen, Rotina 420 – Tuttlingen, Germany) a 9.000 rpm por 15 minutos a temperatura de 10 °C. Em seguida, o sobrenadante foi analisado no comprimento de onda de 283 nm, usando um espectrofotômetro UV-Vis (Perkin Elmer, Lambda XLS-Beaconsfield, UK) e a concentração de eugenol determinada mediante uma curva de calibração de eugenol, a qual foi preparada a partir de uma solução estoque de eugenol em álcool etílico com a concentração de 100 µg.mL<sup>-1</sup> e, em seguida, foram preparadas diluições desta solução estoque, obtendo-se as concentrações de 80, 60, 40, 20, 12 e 4 µg.mL<sup>-1</sup>. Posteriormente, determinou-se a absorbância das concentrações do pico de maior absorbância para o eugenol, 283 nm (SHINDE; NAGARSENKER, 2011). O cálculo para recuperação de eugenol está apresentado na Equação 1.

$$RE (\%) = \frac{[eugenol]_{real}}{[eugenol]_{inicial}} \times 100 \quad (1)$$

Em que, RE (%) = recuperação percentual de eugenol; [eugenol]<sub>real</sub> = concentração de eugenol determinada após atomização; [eugenol]<sub>inicial</sub> = concentração de eugenol adicionada no preparo da suspensão.

Para a determinação da eficiência de encapsulação do eugenol (EE %) que permite identificar a quantidade de eugenol retido nas microcápsulas, realizou-se a remoção do eugenol não encapsulado das micropartículas, pesando 10 mg de micropartículas e realizando a lavagem com álcool etílico (5 mL) com o auxílio de papel filtro quantitativo 25 µ e bomba a vácuo em funil de Buchner de 10 cm de diâmetro. Em seguida, as amostras foram secas em estufa a 60 °C por 20 minutos. Após a secagem, as amostras foram removidas do papel filtro, solubilizadas em água e álcool etílico e analisadas no UV-Vis conforme procedimento já descrito no item 3.2.1.2. A Equação 2 apresenta o cálculo utilizado para determinação da EE (%).

$$EE (\%) = \frac{[eugenol]_{retido}}{[eugenol]_{real}} \times 100 \quad (2)$$

Em que: EE (%) = eficiência de encapsulação de eugenol;  $[eugenol]_{real}$  = quantidade de eugenol presente nas microcápsulas após atomização;  $[eugenol]_{retido}$  = quantidade de eugenol presente nas microcápsulas após remoção do eugenol não encapsulado por lavagem com álcool etílico.

A morfologia das micropartículas foi analisada por microscopia ótica utilizando microscópio ótico Olympus (TVO 63XC - Tokyo, Japan) e o programa de captura de imagens DP25 - BSW. As análises foram realizadas pela observação de lâminas contendo micropartículas suspensas em água destilada utilizando lente ocular com aumento de 10 x e objetiva com aumento de 10, 20 e 40 e 100 x.

#### 4.2.2 Microencapsulação do Eugenol em Carragena Combinada com Proteínas do Leite, do Farelo de Arroz e Albumina Sérica Bovina por Atomização

Nesta etapa estudou-se a combinação da carragena com a proteína do soro de leite com baixo teor de lactose ( $X_1$ ), proteína do farelo de arroz ( $X_2$ ) e albumina sérica bovina ( $X_3$ ). Primeiramente para cada ensaio foram preparadas suspensões de carragena com concentração fixa de 0,5 % (m/v) e uma suspensão de proteína na concentração máxima de 3 % (m/v), variando a proporção de proteínas adicionadas segundo planejamento de mistura do tipo *simplex-centroid* (Tabela 2).

Para a obtenção das microcápsulas foi preparada uma suspensão dos reagentes mediante o preparo de uma fase orgânica e de uma fase aquosa. A fase orgânica foi preparada pela solubilização de eugenol (0,80 g) e Tween 80 (0,12 g) em álcool etílico (10 mL) a temperatura ambiente (aproximadamente 25 °C). A fase aquosa foi preparada em duas etapas, na primeira, carragena (1 g) foi solubilizada em 200 mL de água destilada a temperatura de 60 °C sob agitação mecânica vigorosa por 15 minutos.

Tabela 2 – Planejamento de mistura *simplex-centroid*.

Ensaio	Proporções das proteínas utilizadas como agentes encapsulantes*.		
	$x_1$ ( $X_1$ %)	$x_2$ ( $X_2$ %)	$x_3$ ( $X_3$ %)
1	1,00 (3)	0,00 (0)	0,00 (0)
2	0,00 (0)	1,00 (3)	0,00 (0)
3	0,00 (0)	0,00 (0)	1,00 (3)
4	0,50 (1,5)	0,50 (1,5)	0,00 (0)
5	0,50 (1,5)	0,00 (0)	0,50 (1,5)
6	0,00	0,50 (1,5)	0,50 (1,5)
7	0,33 (1)	0,33 (1)	0,33 (1)
8	0,33 (1)	0,33 (1)	0,33 (1)
9	0,33 (1)	0,33 (1)	0,33 (1)

\* A concentração de carragena foi fixada em 0,5 % m/v.

$x_1$ ,  $x_2$ ,  $x_3$ : valores codificados para as proporções de mistura das proteínas do soro de leite com baixo teor de lactose, do farelo de arroz e albumina sérica bovina, respectivamente.

$X_1$  (%),  $X_2$  (%) e  $X_3$  (%): valores reais da concentração (m/v) das respectivas proteínas adicionada na mistura.

Na segunda etapa, preparou-se a suspensão das proteínas onde cada uma foi solubilizada separadamente em água destilada a temperatura ambiente (aproximadamente 25 °C) conforme proporção descrita no planejamento de mistura (Tabela 2) e nas formulações em que mais do que uma proteína foi utilizada, as respectivas suspensões de proteínas foram adicionadas uma a outra e homogeneizadas por 15 minutos, de modo a obter uma suspensão de proteínas com concentração final de 3,0 % (m/v), em um volume total de 200 mL de água destilada. Após, a suspensão de proteínas foi adicionada a suspensão de carragena e homogeneizada por mais 10 minutos, sob agitação mecânica vigorosa.

Após a obtenção das duas fases, a fase orgânica foi adicionada lentamente à fase aquosa mantendo a mistura sob agitação mecânica vigorosa por 5 minutos. Em seguida, a suspensão foi homogeneizada utilizando um homogeneizador Fisaton (Modelo 713D, São Paulo, Brasil), operando a 15.000 rpm durante 15 minutos.

A obtenção das microcápsulas foi realizada pela secagem da suspensão por atomização. O processo foi realizado em um secador laboratorial Mini *Spray Dryer*

(Labmarq - MSD 1,0, São Paulo, Brasil) com câmara de secagem de 500 mm x 150 mm, bico atomizador tipo duplo fluido, com orifício de 1,2 mm de diâmetro. A alimentação foi feita através de uma bomba peristáltica, com vazão de 0,6 (L.h<sup>-1</sup>) e temperatura do ar de entrada 150 °C.

#### 4.2.2.1 Avaliação das microcápsulas

A RE (%) foi realizada para determinar a concentração real de eugenol presente nas microcápsulas após o processo de atomização, bem como, determinar a estabilidade da suspensão obtida. Para tanto, 10 mg de microcápsulas foram pesadas em um béquer, adicionadas de 5 mL de água destilada e solubilizadas em Ultrasson (ELMASONIC, P60H, Alemanha) em frequência 37 KHz e 100 % de amplitude, por 30 minutos a temperatura de 35 ± 2 °C. Posteriormente, 5 mL de álcool etílico foi adicionado na mistura e as amostras foram homogeneizadas e transferidas para tubos de centrífuga com capacidade de 250 mL e centrifugadas (centrífuga Hettich Zentrifugen, Rotina 420 – Tuttleingen, Germany) a 9.000 rpm por 15 minutos a temperatura de 10 °C. Em seguida, o sobrenadante foi filtrado em filtro Millipore como poros de 0,45 µm de diâmetro e 1 mL foi transferido para um vial para quantificação em UPLC conforme procedimento descrito no item 3.2.2.2.

O cálculo RE (%) está apresentado na Equação 1.

$$RE\% = \frac{[eugenol]_{real}}{[eugenol]_{inicial}} \times 100 \quad (1)$$

Em que, RE % = recuperação de eugenol; [eugenol]<sub>real</sub> = concentração de eugenol determinada após atomização; [eugenol]<sub>inicial</sub> = concentração de eugenol adicionada no preparo da suspensão.

A EE (%) foi determinada pela remoção do eugenol não encapsulado 10 mg de micropartículas que foram lavadas com álcool etílico, com o auxílio de papel filtro 25 µ e bomba a vácuo em funil de Buchner de 10 cm de diâmetro. Em seguida, as amostras foram secas em estufa a 50 °C até atingir peso constante. As amostras secas foram removidas do papel filtro, solubilizadas em 10 mL de uma solução de água e álcool

etílico (1:1) e centrifugadas, conforme procedimento já para a análise de RE (%). Em seguida, 1 mL do sobrenadante foi transferido para um vial para quantificação em UPLC (item 3.2.2.2). A Equação 2 apresenta o cálculo utilizado para determinação da EE (%).

$$EE \% = \frac{[eugenol]_{retido}}{[eugenol]_{real}} \times 100 \quad (2)$$

Em que: EE % = eficiência de encapsulação de eugenol;  $[eugenol]_{real}$  = quantidade de eugenol presente nas microcápsulas após atomização;  $[eugenol]_{retido}$  = quantidade de eugenol presente nas microcápsulas após remoção do eugenol não encapsulado por lavagem com álcool etílico.

#### 4.2.2.1.1 Quantificação de eugenol por cromatografia líquida de ultra eficiência (CLAE)

A quantificação de eugenol foi realizada de acordo com a metodologia proposta por Dhoot et al. (2009), com algumas modificações. Um cromatógrafo líquido de alta eficiência acoplado de detector UV-Vis (CLAE-UVD 170U) (Dionex Corporation, UltiMate 3000, Sunnyvale, Estados Unidos) foi utilizado e processamento no *software* Chromeleon 7.2. Para a separação simultânea do eugenol foi utilizada fase móvel composta por álcool metílico e água ultra pura, na proporção de 85:15 (v:v), em método isocrático de eluição. A corrida cromatográfica foi realizada em coluna de fase reversa C18 Acclaim PA2, 5 µm Analítica (4,6 x 250 mm), com vazão de fase móvel de 1 mL.min<sup>-1</sup> e temperatura da coluna de 25 °C. A detecção do composto foi feita a 280 nm com volume de injeção da amostra de 20 µL. O tempo da corrida cromatográfica foi de 10 min (tempo de retenção do eugenol aproximadamente 5,7 minutos). O composto foi identificado baseado no tempo de retenção do soluto com relação ao padrão. A quantificação foi realizada com base na curva de calibração de soluções de eugenol em álcool metílico nas concentrações de 1,0; 0,8; 0,6; 0,4; 0,2 e 0,1 mg.mL<sup>-1</sup>.

O modelo canônico de Scheffe' (1963) (Equação 3) foi usado para ajustar aos dados experimentais de recuperação e eficiência de encapsulação de eugenol e os modelos lineares, quadráticos e cúbicos foram testados para obter os respectivos coeficientes de regressão, utilizando para tanto a análise de regressão e análise de variância (ANOVA).



$$y = \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \beta_3 x_3 + \beta_{12} x_1 x_2 + \beta_{13} x_1 x_3 + \beta_{23} x_2 x_3 + \beta_{123} x_1 x_2 x_3 \quad (3)$$

Em que:  $y$  é a função resposta observada;  $\beta_1$ ,  $\beta_2$ ,  $\beta_3$ ,  $\beta_{12}$ ,  $\beta_{13}$ ,  $\beta_{23}$ ,  $\beta_{123}$ , são os coeficientes de regressão estimados,  $x_1$ ,  $x_2$  e  $x_3$  são os níveis codificados das variáveis dependentes.

Após determinação dos modelos matemáticos significativos foram realizadas as análises de superfície de resposta e curva de contorno. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o *software* Statistica 8.0 ( $p \leq 0,05$ ) (Statsoft Inc., Tulsa, OK, USA, 2004).

#### 4.2.2.1.2 Morfologia e tamanho das microcápsulas

A morfologia e o tamanho médio das microcápsulas foram avaliados por microscopia eletrônica de varredura (TM 3000 Tabletop Scanning Electron Microscope, HITACHI, Schaumburg, Estados Unidos). O Cálculo do diâmetro médio das microcápsulas foi realizado medindo 120 partículas de cada amostra (FRITZEN-FREIRE et al., 2012).

#### 4.2.2.1.3 Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

Para identificar a existência de possíveis interações químicas entre os reagentes utilizados para o processo de microencapsulação de eugenol, foram realizadas análises de Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier com modo de refletância atenuada (FTIR-UATR, Frontier PerkinElmer) com resolução de  $4 \text{ cm}^{-1}$ , intervalo de número de onda de  $4000$  a  $650 \text{ cm}^{-1}$ . A análise foi realizada com uma média de quatro acumulações para cada uma das amostras dos materiais puros e das microcápsulas contendo eugenol (ensaio 2, 3 e 6). Adicionalmente, uma mistura física de microcápsula com adição de  $50\%_{m/m}$  de eugenol também foi analisada com o intuito de observar como seria o espectro das amostras com presença de eugenol na parte externa. Os espectros e dados obtidos por infravermelho foram analisados pelo *software* OriginPro 8.5.

#### 4.2.2.1.4 Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC), Análise Termogravimétrica (TGA) e Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) acoplados

O comportamento térmico das microcápsulas foi avaliado por análise de calorimetria diferencial de varredura e análise termogravimétrica, acopladas ao equipamento de FTIR, com o objetivo de confirmar a presença de eugenol nas microcápsulas, sendo este detectado por FTIR durante o aquecimento das amostras, por consequente rompimento das microcápsulas e volatilização de eugenol.

Amostras de 9 a 12 mg dos materiais puros (carragena, proteína do farelo de arroz, albumina sérica bovina e eugenol) e das microcápsulas correspondentes aos ensaios 2, 3 e 6 foram acondicionadas em porta-amostra de platina no equipamento DSC (STA, do inglês *Simultaneous Thermal Analysis*, PerkinElmer modelo STA 6000) e aquecidas de 50 a 750°C com taxa de aquecimento de 100°C/min e fluxo de nitrogênio de 20 mL/min, sendo acompanhadas a perda de massa e fluxo de calor. Durante o aquecimento o FTIR-UATR, acoplado ao DSC, realizou a varredura das amostras durante 15 min.

## REFERÊNCIAS

DHOOT, G.; AURAS, R.; RUBINO, M.; DOLAN, K.; SOTO-VALDEZ, H.; Determination of eugenol diffusion through LLDPE using FTIR – ATR flow cell and HPLC techniques. *Polymer*, v. 50, p. 1470-1482, 2009.

FRITZEN-FREIRE; C. B.; PRUDÊNCIO, E. S.; AMBONI, R. D. M. C. PINTO, S. S.; NEGRÃO-MURAKAMI, A. B.; MURAKAMI, F. S. Microencapsulation of *bifidobacteria* by spray drying in the presence of prebiotics. *Food Research International*, v. 45, n.1, p. 306-312, 2012

GIRALDI, C.; RODRIGUES, A. C.; CÂNDIDO, L. M. B. Hidrólise da lactose e secagem por atomização de concentrado proteico de soro de leite. IV SIMALI - Simpósio de Alimentos e ISQUIM - 1º Semana Acadêmica de Química. UTFPR- Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Medianeira, 2014.

HAN, S.-W.; JEONG, H.-C.; KIM, H.-K.; LEE, D.-Y.; PARK, H.-H.; PARK, H.-J.; SONG, S.-H. A method for preparing protein concentrate from rice bran. KR PAT. EP 2061339 A1, 2009.

SCHEFFE´ H. The simplex-centroide design for experiments with mixtures. *Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological)*, v. 25, p. 235–263, 1963.

SHINDE, U.; NAGARSENKER, M. Microencapsulation of eugenol by gelatinsodium alginate complex coacervation. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 73, p. 311-315, 2011.

## **5 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Os resultados obtidos estão redigidos na forma de dois artigos científicos, conforme segue:

## 5.1 ARTIGO 2

### **USO DE CARRAGENA NA MICROENCAPSULAÇÃO DE EUGENOL**

Ruth dos Santos da VEIGA<sup>1</sup>, Cristiane CANAN<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR), Câmpus Medianeira, Avenida Brasil 4232, Parque Independência, CEP 85884-000, Medianeira, Paraná, Brasil.

#### **RESUMO**

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da variação das condições operacionais do atomizador (temperatura do ar de secagem e vazão de alimentação), na microencapsulação de eugenol e o efeito da carragena como agente encapsulante. As condições operacionais foram variadas por meio de um Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) do tipo 2<sup>2</sup> com triplicata no ponto central. As microcápsulas de eugenol foram obtidas pelo preparo de uma suspensão de carragena como agente encapsulante e Tween 80 como surfatante, tendo o teor de sólidos totais fixado em 0,55% (m/m) na suspensão e proporção de eugenol:sólidos fixada em 1:10 (m/m). Para caracterização das microcápsulas foi determinada a recuperação percentual de eugenol (RE %) e a eficiência de encapsulação (EE %) do processo por espectrofotometria UV-Vis e, a morfologia por microscopia ótica. Valores de RE de no máximo 12% foram obtidos e as condições operacionais estudadas não influenciaram significativamente ( $p > 0,05$ ), demonstrando que ocorreram perdas operacionais de eugenol durante o processo de obtenção das microcápsulas. A EE variou de 18,0 a 84,8% e, o termo quadrático para vazão de alimentação apresentou influência significativa ( $p < 0,05$ ) na resposta avaliada. A análise de superfície de resposta e curva de contorno permitiu determinar regiões ótimas nas condições estudadas para obter maior EE, sendo selecionada a temperatura de 151 °C e a vazão de 0,6 L.h<sup>-1</sup>. As micropartículas apresentaram morfologia esférica/oval. Estudos futuros da combinação da carragena com outros agentes encapsulantes como por exemplo, proteínas, com o intuito de aumentar a recuperação de eugenol e a eficiência de encapsulação são necessários.

Palavras-chave: DCCR, Óleos essenciais, Eficiência de encapsulação, Microcápsulas.

## 1 INTRODUÇÃO

O composto fenólico 4-alil-2-metoxifenol conhecido como eugenol é o principal constituinte do óleo de cravo, podendo ser encontrado em óleos e extratos de outras plantas, tais como, canela, manjeriço e noz-moscada (LIOLIOS et al., 2009; JOHNY et al., 2010; CASTILLO et al., 2014; PAN et al., 2014). É amplamente utilizado como um agente aromatizante de alimentos e como um aditivo para indústrias de perfumaria e cosméticos (BASKARAN et al., 2010; DEVI et al., 2010).

O eugenol apresenta-se como um composto alternativo para a substituição de aditivos artificiais utilizados em alimentos em virtude de suas propriedades antioxidantes (OGATA et al., 2000; JIROVETZ, 2006) e antimicrobianas contra diferentes microrganismos, tais como, *Staphylococcus aureus* (WALSH et al., 2003), *Escherichia coli* (WALSH et al., 2003, TEIXEIRA et al., 2013), *Listeria monocytogenes* (FILGUEIRAS; VANETTI, 2006; TEIXEIRA et al., 2013), *Salmonella typhi* (DEVI et al., 2010), *Listeria innocua* (GARCÍA-GARCÍA et al., 2011; TEIXEIRA et al., 2013), *Brochothrix thermosphacta*, *Pseudomonas putida*, *Salmonella typhimurium* e *Shewanella putrefaciens* (TEIXEIRA et al., 2013). Contudo, sua aplicação é limitada devido a sua volatilidade, instabilidade e sensibilidade frente ao oxigênio, luz e calor durante o processamento, utilização e armazenamento (CHOI et al., 2009; GARG; SINGH, 2011).

O processo de microencapsulação tem possibilitado a aplicação de diversos tipos de compostos, considerados tecnicamente inviáveis, que por meio do seu revestimento tornaram-se possíveis de uso (GHARSALLAOUI et al., 2007; ROCHA et al., 2012). E esta técnica tem sido utilizada em larga escala como alternativa para utilização do eugenol, tanto para indústrias alimentícias quanto para farmacêuticas (CHOI et al., 2009, WORANUCH; YOKSAN, 2013; CHEN; ZHANG; ZHONG, 2015).

Mourtzinou et al. (2008), Choi et al. (2009) e Garg e Singh (2011) demonstraram que o processo de microencapsulação tem se tornado atrativo em função de seus benefícios, tais como: a facilidade de manuseio, aumento da estabilidade frente a oxidação, retenção dos compostos voláteis, além da liberação controlada do aditivo por meio de uma cápsula ou membrana que separa fisicamente a substância sensível do ambiente que poderia causar sua decomposição. A eficiência da microencapsulação e a estabilidade das micropartículas dependem, fundamentalmente, do material utilizado

como agente encapsulante, também chamado, material de parede (LIU et al., 2001; ZBICINSKI et al., 2002; WANG et al., 2009), e podem ser selecionados em função de suas propriedades físicas, do material de núcleo (agente ativo), da aplicação pretendida, do método utilizado para obtenção das micropartículas, do mecanismo de liberação, bem como, das características desejadas no produto final (SANTOS; FERREIRA; GROSSO, 2000; GOUIN, 2004; BOTREL et al., 2012).

Os materiais usados como agentes encapsulantes incluem: carboidratos (amidos, maltodextrinas, xarope de milho, dextrana, sacarose, ciclodextrina e celulose), gomas (goma arábica, ágar, alginato de sódio e carragena), lipídios (cera, parafina, ácido esteárico, triestearina, mono e diglicerídeos, óleos e gorduras) e proteína, as de origem animal (proteínas do soro de leite, gelatina, caseína) e vegetal (de soja, ervilha e de cereais) (DUBEY et al., 2009; NESTERENKO et al., 2013).

A carragena é um hidrocolóide, ou seja, polissacarídeo que contém a capacidade de formar géis ou soluções viscosas com a água, controlando assim a atividade de água e conferindo textura e corpo aos alimentos fabricados. Apresentam também função de agentes emulsificantes, espessantes, geleificantes e estabilizantes de emulsões (TRCKOVÁ et al., 2003).

Apesar de haver diversas técnicas de microencapsulação, o método de secagem por atomização é o mais utilizado na indústria de alimentos (WANG et al., 2009; CHATTERJEE; BHATTACHARJEE, 2013). Dentre as vantagens da microencapsulação por atomização está o fato de o processo ser relativamente simples, econômico, flexível e produzir partículas de boa qualidade. A rápida evaporação da água da matriz polimérica durante a secagem e um menor tempo de resistência da amostra na câmara de secagem, faz com que a amostra permaneça a uma temperatura abaixo de 100 °C, o que permite que o processo possa ser utilizado para substâncias termossensíveis (GHARSALLAOUI et al., 2007; JAFARI et al., 2008).

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da variação das condições operacionais de atomização: temperatura do ar de secagem e vazão de alimentação, na microencapsulação de eugenol em carragena.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 MATERIAIS

Eugenol (Vetec<sup>TM</sup>, Sigma-Aldrich, 97,5%), álcool etílico P.A. (Neon, 99,5%) e Tween 80 (Synth, grau analítico) foram utilizados no preparo da fase orgânica. Água destilada a temperatura de 60 °C e carragena (C1013, Sigma-Aldrich, grau comercial) foram utilizados no preparo da fase aquosa.

### 2.2 PREPARO DA SUSPENSÃO

A microencapsulação de eugenol em carragena foi realizada, inicialmente, pela obtenção de uma suspensão mediante o preparo de uma fase aquosa e uma fase orgânica. A fase aquosa consistiu na dissolução de carragena (2,0 g) em água destilada (400 mL) a temperatura de 60 °C sob agitação mecânica vigorosa por 15 minutos, com auxílio de um agitador magnético. A fase orgânica foi preparada pela solubilização de eugenol (0,2 g) e Tween 80 (0,12 g) em álcool etílico (10 mL) a temperatura ambiente (aproximadamente 25 °C), por 5 minutos. Após a obtenção das duas fases, a fase orgânica foi adicionada lentamente à fase aquosa mantendo a mistura sob agitação vigorosa por mais 5 minutos. Em seguida, a suspensão foi homogeneizada utilizando um agitador mecânico (Modelo 713D, Fisaton, São Paulo, Brasil), operando a 15.000 rpm durante 15 minutos.

O teor de sólidos totais foi fixado em 0,55% m/m na suspensão final antes da atomização, onde a proporção de eugenol:sólidos foi fixada em 1:10 (m/m).

### 2.2 ATOMIZAÇÃO

A obtenção das microcápsulas foi realizada por meio da secagem da suspensão por atomização. O processo foi realizado em um secador laboratorial Mini *Spray Dryer* (Labmarq - MSD 1,0, São Paulo, Brasil) com câmara de secagem de 500 mm x 150 mm, bico atomizador tipo duplo fluido, com orifício de 1,2 mm de diâmetro, variando a vazão



da alimentação da amostra e a temperatura do ar de secagem do equipamento de acordo com o delineamento fatorial descrito no item 2.3.

### 2.3 DELINEAMENTO COMPOSTO CENTRAL ROTACIONAL (DCCR)

As condições operacionais do atomizador, temperatura do ar de secagem e vazão de alimentação variaram com o objetivo de avaliar a influência destes parâmetros na encapsulação do eugenol. Para tanto, foi realizado um Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) com duas variáveis independentes, três pontos centrais e quatro pontos axiais, totalizando 11 ensaios. Os níveis reais e codificados das variáveis independentes  $X_T$  (Temperatura do ar de secagem, °C) e  $X_V$  (Vazão de alimentação, L.h<sup>-1</sup>) foram selecionados com base em estudos preliminares e estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Níveis reais e codificados das variáveis temperatura e vazão de alimentação.

Fatores	Níveis				
	-1,41	-1	0	+1	+1,41
$X_T$ - Temperatura do ar de secagem (°C)	109	115	130	145	151
$X_V$ - Vazão de alimentação (L.h <sup>-1</sup> )	0,46	0,50	0,60	0,70	0,74

Os ensaios para encapsulação do eugenol foram realizados aleatoriamente e as microcápsulas foram acondicionadas em frascos plásticos hermeticamente fechados, vedados com Parafilm®, e armazenados sob a temperatura de  $5 \pm 1$  °C até o momento da análise. Foram avaliadas a recuperação de eugenol e a eficiência de encapsulação.

Para análise de efeitos, regressão, variância e superfície de repostas utilizou-se o *software* Statistica 8.0 ( $p \leq 0,05$ ) (Statsoft Inc., Tulsa, OK, USA).

### 2.4 DETERMINAÇÃO DA RECUPERAÇÃO PERCENTUAL DE EUGENOL

Com o objetivo de determinar a estabilidade da suspensão obtida e quantificar o conteúdo real de eugenol após a microencapsulação, determinou-se a recuperação

percentual de eugenol (RE %). Para tanto, foram pesados 10 mg da amostra em um béquer, dissolvida em 5 mL de água destilada e aquecida em banho-maria a 60°C por 30 minutos. Posteriormente, adicionou-se 5 mL de álcool etílico e as amostras foram transferidas para tubos de centrifuga com capacidade de 250 mL e centrifugadas (Hettich Zentrifugen, Rotina 420 – Tuttleingen, Germany) a 9.000 rpm por 15 minutos a temperatura de 10 °C. Em seguida, o sobrenadante foi analisado no comprimento de onda de 283 nm, usando um espectrofotômetro UV-Vis (Perkin Elmer, Lambda XLS-Beaconsfield, UK) e a concentração de eugenol determinada mediante uma curva de calibração descrita no item 2.6.

O cálculo para RE (%) está apresentado na Equação 1.

$$RE (\%) = \frac{[eugenol]_{real}}{[eugenol]_{inicial}} \times 100 \quad (1)$$

Em que, RE (%) = recuperação de eugenol;  $[eugenol]_{real}$  = concentração de eugenol determinada após atomização;  $[eugenol]_{inicial}$  = concentração de eugenol adicionada no preparo da suspensão.

## 2.5 DETERMINAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO DE EUGENOL

A eficiência de encapsulação de eugenol (EE %) permite identificar a quantidade de eugenol retido nas microcápsulas. Para tanto, inicialmente, realizou-se a remoção do eugenol não encapsulado das micropartículas, pesando 10 mg de micropartículas e realizando a lavagem com álcool etílico (5 mL) com o auxílio de papel filtro quantitativo 25  $\mu$  e bomba a vácuo em funil de Buchner de 10 cm de diâmetro. Em seguida, as amostras foram secas em estufa a 60 °C por 20 minutos. Após a secagem, as amostras foram removidas do papel filtro, solubilizadas em água e álcool etílico e analisadas no UV-Vis conforme procedimento já descrito no item 2.4.

A Equação 2 apresenta o cálculo utilizado para determinação EE (%).

$$EE (\%) = \frac{[eugenol]_{retido}}{[eugenol]_{real}} \times 100 \quad (2)$$

Em que: EE (%) = eficiência de encapsulação de eugenol;  $[eugenol]_{real}$  = quantidade de eugenol presente nas microcápsulas após atomização;  $[eugenol]_{retido}$  = quantidade de eugenol presente nas microcápsulas após remoção do eugenol não encapsulado por lavagem com álcool etílico.

## 2.6 CURVA DE CALIBRAÇÃO DO EUGENOL

Para determinar a concentração de eugenol nas microcápsulas foi realizada uma curva de calibração de eugenol. Preparou-se uma solução estoque de eugenol em álcool etílico com a concentração de  $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$  e, em seguida, foram preparadas diluições desta solução estoque, obtendo-se as concentrações de 80, 60, 40, 20, 12 e  $4 \mu\text{g.mL}^{-1}$ . Posteriormente, determinou-se a absorvância das concentrações do pico de maior absorvância para o eugenol, 283 nm (SHINDE; NAGARSENKER, 2011).

## 2.7 MORFOLOGIA

A morfologia das micropartículas foi analisada por microscopia ótica utilizando microscópio ótico Olympus (TVO 63XC - Tokyo, Japan) e o programa de captura de imagens DP25 - BSW. As análises foram realizadas através da observação de lâminas contendo micropartículas suspensas em água destilada utilizando lente ocular com aumento de 10 x e objetiva com aumento de 10, 20 e 40 e 100 x.

## 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os cálculos de RE (%) e EE (%) das microcápsulas obtidas foram realizados com base na equação da reta obtida a partir da curva de calibração de eugenol ( $y = 0,018x - 0,010$ ;  $R^2 = 0,999$ ).

A determinação da quantidade real de eugenol ao final do processo de microencapsulação foi necessária para se conhecer a quantidade real de eugenol presente nas microcápsulas, uma vez que perdas do composto ativo podem ocorrer durante a formação das mesmas. Desta forma, a determinação da recuperação de eugenol permite avaliar a estabilidade deste processo.

A Tabela 2 apresenta a matriz dos ensaios codificada e os resultados para a RE (%) e EE (%). Observou-se que a recuperação média de eugenol não foi superior a 12,1%, indicando possíveis perdas operacionais durante o processo e sugerindo baixa estabilidade da suspensão obtida. Há poucos relatos na literatura de autores que determinam a recuperação percentual do composto ativo encapsulado. Silva-Buzanello et al. (2014) estudaram a recuperação percentual de curcumina no processo de nanoencapsulação em poli (L – ácido láctico) PLLA e este parâmetro variou entre 97,3% e 77,2%, considerados elevados e indicativos de estabilidade no processo de obtenção de suas nanopartículas.

Tabela 2. Matriz dos ensaios codificada e os valores das respostas obtidas para a recuperação percentual e eficiência de encapsulação de eugenol.

Ensaio	$X_T$	$X_V$	Recuperação (%)	Eficiência (%)
1	-1	-1	8,1 ± 0,6	47,8 <sup>abc</sup> ± 4,3
2	1	-1	9,4 ± 0,0	36,5 <sup>bc</sup> ± 0,9
3	-1	1	8,4 ± 0,3	84,6 <sup>ab</sup> ± 7,3
4	1	1	6,5 ± 0,4	84,7 <sup>ab</sup> ± 0,7
5	-1,41	0	5,1 ± 0,2	85,6 <sup>a</sup> ± 1,7
6	1,41	0	7,4 ± 0,3	82,7 <sup>ab</sup> ± 4,1
7	0	-1,41	8,8 ± 0,0	43,3 <sup>abc</sup> ± 2,6
8	0	1,41	12,1 ± 0,3	20,2 <sup>c</sup> ± 2,2
9	0	0	9,6 ± 0,0	71,9 <sup>ab</sup> ± 0,0
10	0	0	8,8 ± 0,0	64,8 <sup>ab</sup> ± 5,9
11	0	0	6,9 ± 0,2	69,0 <sup>ab</sup> ± 3,1
<i>p</i> (ANOVA)			0,378	0,040

$X_T$ : temperatura de ar de secagem (°C);  $X_V$ : vazão de alimentação (L.h<sup>-1</sup>); Médias de recuperação percentual de eugenol e de eficiência de encapsulação acompanhadas de desvio padrão (n = 3).

Apesar dos resultados de RE (%) reportados no presente trabalho serem baixos, do total de eugenol presente nas microcápsulas foi possível obter uma eficiência média de até 85,6% dentre as condições estudadas. Chatterjee e Bhattacharjee (2013) reportaram valores médios de 62% para eficiência de encapsulação de micropartículas de extrato de cravo rico em eugenol encapsulado em matrizes de maltodextrina e goma arábica, utilizando a técnica de atomização, com uma proporção de 1:4,8:2,4 de extrato de cravo:maltodextrina:goma arábica. Esses resultados foram similares aos obtidos para o ponto central do presente trabalho.

Os efeitos estimados para RE (%) são apresentados na Tabela 3. As variáveis estudadas, vazão de alimentação e temperatura do ar de secagem, não foram significativas ( $p > 0,05$ ). A baixa RE (%) observada também pode ser explicada pelo fato do uso de apenas um agente encapsulante o qual não ocasionou um aprisionamento efetivo do eugenol em sua estrutura, facilitando sua perda por volatilização durante a obtenção das microcápsulas. Alguns autores reportaram a combinação de agentes encapsulantes com o intuito de melhorar as propriedades das microcápsulas obtidas. Cano-Higueta et al. (2015) encapsularam oleorresina de cúrcuma pelo método de secagem por atomização utilizando misturas binárias e ternárias de diferentes agentes encapsulantes (goma arábica, maltodextrina e amido de milho modificado). A eficiência de encapsulação variou de 8 a 46% e foi influenciada significativamente pela formulação do material de parede. O maior valor de eficiência foi encontrado quando se utilizou mistura binária de goma arábica e de amido modificado.

Tabela 3. Efeitos estimados e  $p$ -valor para recuperação de eugenol.

Fatores	Efeitos	Erro padrão	$t_{\text{Calc}} (5)$	$p$ -valor
Média	8,43	0,91	9,26	0,0002*
( $X_T$ ) Temperatura (L)	0,66	1,12	0,59	0,5734
( $X_T$ ) Temperatura (Q)	-2,32	1,33	-1,74	0,1418
( $X_V$ ) Vazão (L)	0,51	1,12	0,46	0,6642
( $X_V$ ) Vazão(Q)	1,90	1,33	1,43	0,2128
( $X_V$ ) x ( $X_V$ )	-1,60	1,58	-1,01	0,3569

$R^2 = 0,64$ ; \* $p < 0,05$ .

Segundo Trindade et al. (2008) o uso de carboidratos como agentes encapsulantes em combinação com proteínas pode ser uma alternativa para o aumento da estabilidade na microencapsulação. Esta combinação pode ser comprovada por Bae e Lee (2008) que utilizaram maltodextrina em combinação com proteína de soro de leite, em proporções variadas, para encapsulação de óleo de abacate utilizando a técnica de atomização, reportando valores de eficiência de encapsulação entre 45 a 66%, não sendo observada diferença significativa entre as amostras.

A análise de efeitos estimados para os resultados de EE (%) foi determinada onde, inicialmente, observou-se que nenhum dos termos apresentou influência significativa na resposta avaliada ( $p > 0,05$ ). Contudo, ao adicionar os termos de menor significância aos resíduos, constatou-se que o termo vazão no modelo quadrático passou a ser significativo ( $p < 0,05$ ), apresentando efeito negativo (Tabela 4).

Tabela 4. Efeitos estimados e  $p$  valores para eficiência de encapsulação de eugenol (%).

Fatores	Efeitos	Erro padrão	$t_{\text{Cal}}(7)$	$p$ -valor
Média	68,54	9,47	7,24	< 0,0002*
( $X_T$ ) Temperatura (Q)	18,47	13,86	1,33	0,2243
( $X_V$ ) Vazão (L)	13,15	11,61	1,13	0,2949
( $X_V$ ) Vazão (Q)	-34,24	13,86	-2,47	0,0428*

$R^2 = 0,63$ ; \*  $p < 0,05$ .

Como o efeito quadrático da vazão ( $X_V$ ) foi significativo ( $p < 0,05$ ), determinou-se a equação do modelo para previsão da EE (%) das microcápsulas produzidas (Equação 3).

$$EE(\%) = 68,5 + 9,2x_T^2 + 6,6x_V - 17,19,2x_V^2 \quad (3)$$

A análise de variância para a eficiência de encapsulação é apresentada na Tabela 5, onde, pode-se observar que o valor de  $F_{\text{calculado}}$  foi superior ao  $F_{\text{tabelado}}$ , indicando que o modelo é válido para predizer a eficiência de encapsulação de eugenol considerando as condições estudadas. Desta forma, foram obtidas a superfície de resposta e a curva de contorno para eficiência de encapsulação de eugenol (Figura 1).

Tabela 5. Análise de variância (ANOVA) para eficiência de encapsulação de eugenol.

Fontes de variação	SQ	GL	QM	F <sub>calc</sub>	F <sub>tab</sub>	p-valor
Tratamentos	3375,6	3	1125,2	4,8	4,3	0,0403*
Resíduos	1642,0	7	234,58			
Total	5017,6	10				R <sup>2</sup> = 63%

SQ: soma dos quadrados, GL: graus de liberdade, QM: quadrados médios, F<sub>calc</sub>: F calculado, F<sub>tab</sub>: F tabelado, \*p < 0,05.

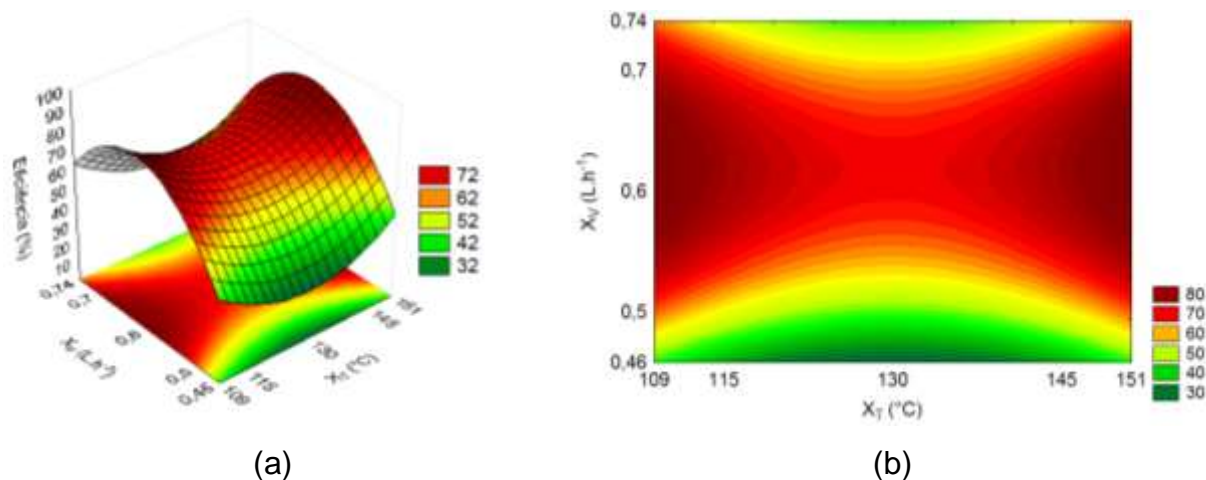


Figura 1. Superfície de resposta (a) e curva de contorno (b) para a eficiência de encapsulação de eugenol.

Considerando que o aumento da vazão do nível inferior para o nível superior causou efeito negativo na EE (%), possibilitando maiores valores de eficiência próximos ao ponto central e, que a faixa de temperatura estudada não apresentou influência significativa, foi considerada como condição adequada para seguir a estudos posteriores a vazão de 0,6 L.h<sup>-1</sup> (região do ponto central) e temperatura de 151 °C (ponto axial superior).

Alguns estudos têm reportado a influência da temperatura do ar de entrada na eficiência de microencapsulação de óleos e aromas obtidos por atomização. Jafari et al. (2008) reportaram que temperaturas do ar de entrada suficientemente altas (160 a 220 °C) permitem a rápida formação de uma membrana semipermeável na

superfície da micropartícula resultando em maior eficiência de retenção do composto encapsulado.

Balasubramani et al. (2015) estudaram o efeito da variação dos parâmetros de concentração do material do núcleo (10, 20 e 30%), do material de parede (40, 50 e 60%) e temperatura do ar de secagem (180, 200 e 220 °C) na obtenção de oleoresina de alho microencapsulada em maltodextrina por atomização. A condição otimizada foi obtida, sendo de 10% de material de núcleo, 60% de material de parede e 200 °C de temperatura do ar de secagem, com base na máxima eficiência de encapsulação obtida (81,9%). Segundo os autores, com o aumento da temperatura do ar de entrada, inicialmente, houve um aumento da eficiência de encapsulação, que diminuiu drasticamente quando a temperatura atingiu 220 °C, o que pode ser explicado pelo desequilíbrio entre a taxa de evaporação de água e formação de película, que provoca a ruptura das microcápsulas e, assim, pode resultar em uma baixa eficiência de encapsulação. No presente estudo, apesar da diferença entre o tipo de óleo estudado e o agente encapsulante, o aumento da temperatura do ar de entrada (109 a 151 °C) não resultou em alterações significativas, variando de 85,6 a 82,7%.

### 3.3 MORFOLOGIA DAS MICROCÁPSULAS

A morfologia das microcápsulas de eugenol que apresentaram maiores valores de EE (%) foi avaliada por microscopia óptica (Figuras 2, 3 e 4). De modo geral, pode-se observar que as microcápsulas apresentaram variabilidade de tamanhos, morfologia esférica/oval, sem rachaduras ou fissuras aparentes, contudo a formação de aglomerados de partículas, comuns na microencapsulação, não foi observada. Resultados similares foram obtidos por Wang et al. (2011) nas amostras de microcápsulas de óleo de peixe encapsulado em proteína de cevada por atomização a temperatura de 150 °C.



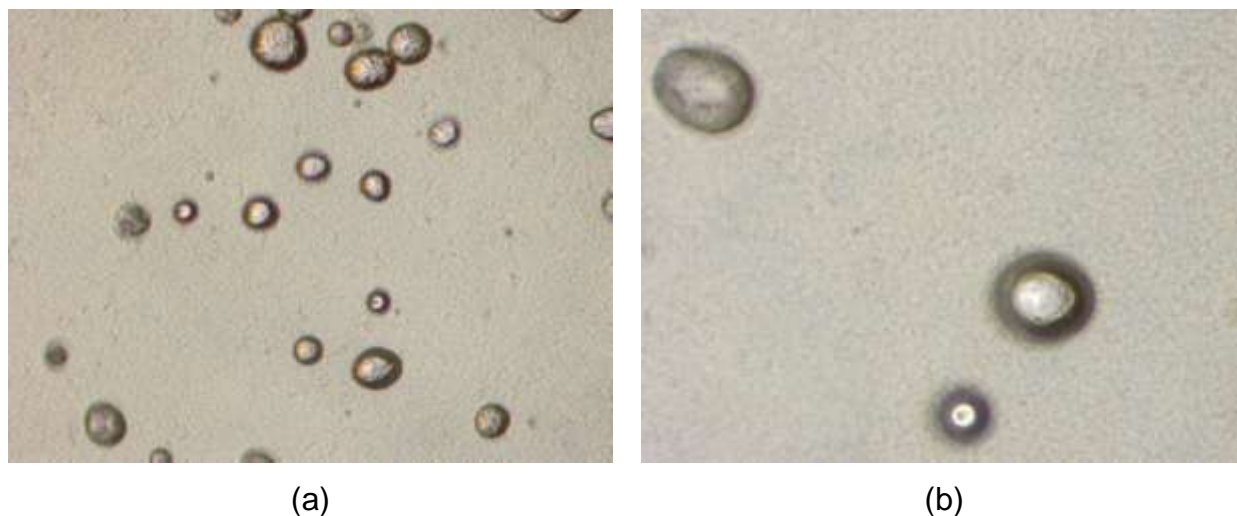


Figura 2. Imagens obtidas por microscopia óptica das microcápsulas atomizadas a temperatura de 115 °C e com vazão de alimentação de 0,70 L.h<sup>-1</sup> (ensaio 3, EE = 84,6%), com aumento de 200 x (a) e 400 x (b).

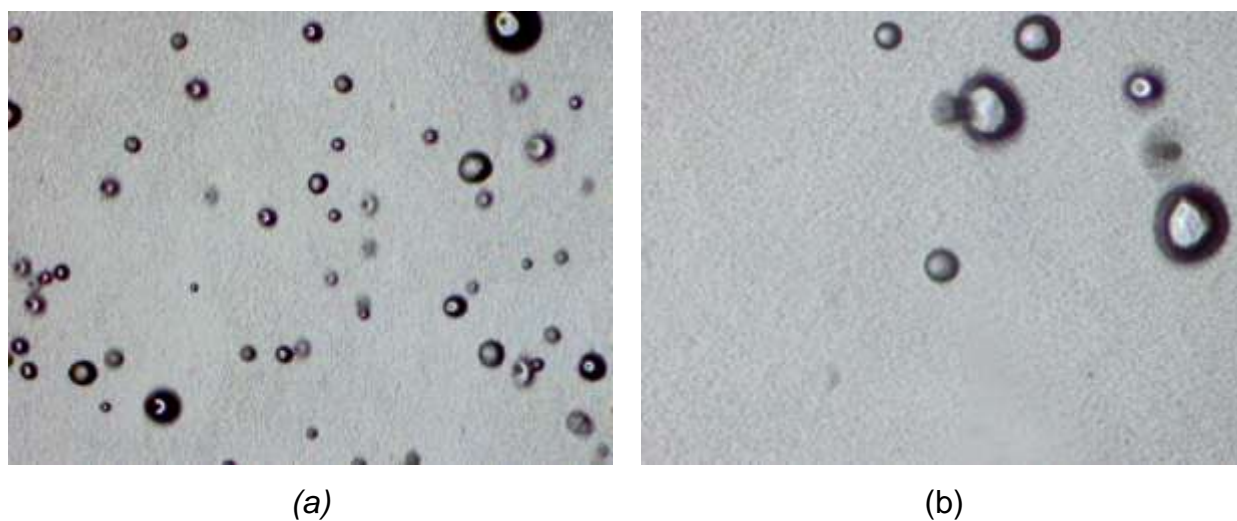


Figura 3. Imagens obtidas por microscopia óptica das microcápsulas atomizadas a temperatura de 109 °C e com vazão de alimentação de 0,60 L.h<sup>-1</sup> (ensaio 5, EE = 85,6%) com aumento de 100 x (a) e 200 x (b).

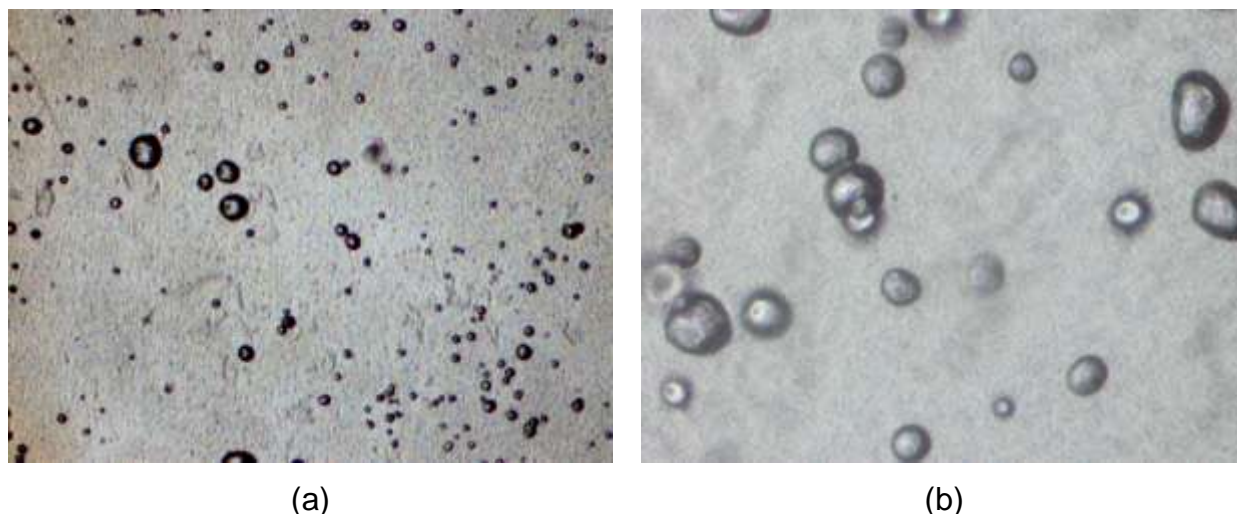


Figura 4. Imagens obtidas por microscopia óptica microcápsulas atomizadas a temperatura de 151 °C e com vazão de alimentação de 0,60 L.h<sup>-1</sup> (ensaio 6, EE = 82,7%), com aumento de 100 x (a) e 200 x (b).

Boa esfericidade e ausência de fissuras nas microcápsulas indicam a formação de um filme contínuo na parede externa e podem justificar uma maior eficiência de encapsulação, devido a uma baixa permeabilidade a gases, obtendo uma maior proteção e retenção das substâncias voláteis (AGHBASHLO et al., 2013; KHA et al., 2014).

#### 4 CONCLUSÃO

Devido a baixa estabilidade da emulsão composta apenas por carragena ocorreu perda de eugenol durante a microencapsulação, comprovado pela recuperação média inferior a 12,1% nas condições estudadas. Entretanto, a eficiência de encapsulação foi elevada, de até 85,6%. As micropartículas visualizadas por microscopia óptica apresentaram morfologia esférica/oval, sem rachaduras ou fissuras aparentes e sem formação de aglomerados de partículas, indicando que a carragena é uma alternativa viável como agente encapsulante de óleos essenciais. Estudos futuros da combinação da carragena com outros agentes encapsulantes como por exemplo, proteínas, com o

intuito de aumentar a recuperação de eugenol e a eficiência de encapsulação são necessários.

## REFERÊNCIAS

AGHBASHLO, M.; MOBLI, H.; MADADLOU, A.; DAFIEE, S. Influence of wall material and inlet drying air temperature on the microencapsulation of fish oil by spray drying. *Food and Bioprocess Technology*, v. 6, p. 1561-1569, 2013.

BAE, E. K.; LEE, S. J. Microencapsulation of avocado oil by spray drying using whey protein and maltodextrin. *Journal of Microencapsulation*, v. 25, p. 549–560, 2008.

BALASUBRAMANI, P.; PALANISWAMY, T. P.; VISVANATHAN, R.; THIRUPATHI, V.; SUBBARAYAN, A.; PRAKASH-MARANE, J. Microencapsulation of garlic oleoresin using maltodextrin as wall material by spray drying technology *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 72, p. 210–217, 2015.

BOTREL, A. D.; BORGES, V. S.; FERNANDES, R. B. V. R.; VIANA, D. A.; COSTA, G. M. J.; MARQUES, R. G. Evaluation of spray drying conditions on properties of microencapsulated oregano essential oil. *International Journal of Food Science and Technology*, v. 47, p. 2289-2296, 2012.

CANO-HIGUITA, D. M.; VELEZ, H. A. V.; TELIS, V. R. N. Microencapsulation of turmeric oleoresin in binary and ternary blends of gum arabic, Maltodextrin and modified starch. *Ciência e Agrotecnologia*, v. 39, n. 2, p. 173-182, 2015 .

CASTILLO, S.; PÉREZ-ALFONSO, C. O.; MARTÍNEZ-ROMERO, D.; GUILLÉN, F.; SERRANO, M.; VALERO, D. The essential oils thymol and carvacrol applied in the packing lines avoid lemon spoilage and maintain quality during storage. *Food Control*, v. 35, p. 132-136, 2014.

CHANDI, G. K.; SOGI, D. S. Functional properties of rice bran protein concentrates. *Journal of Food Engineering*. v. 79, p. 592–597, 2007.

CHATTERJEE, D.; BHATTACHARJEE, P. Comparative evaluation of the antioxidant efficacy of encapsulated and un-encapsulated eugenol-rich clove extracts in soybean oil:

Shelf-life and frying stability of soybean oil. *Journal of Food Engineering*, v. 117, p. 545-550, 2013.

CHEN, H.; ZHANG, Y.; Q. ZHONG. Physical and antimicrobial properties of spray-dried zein–casein nanocapsules with co-encapsulated eugenol and thymol. *Journal of Food Engineering*, v. 144, n. 93-102, 2015.

CHOI, M.-J.; SOOTTITANTAWAT, A.; NUCHUCHUA, O.; MIN, S.-G; RUKTANONCHAI, U. Physical and light oxidative properties of eugenol encapsulated by molecular inclusion and emulsion diffusion method. *Food Research International*, v. 42, p. 148-156, 2009.

DEVI, K. P.; NISHA, A. S.; SAKTHIVEL, R.; PANDIAN, K. S.; Eugenol (an essential oil of clove) acts as an antibacterial agent against *Salmonella typhi* by disrupting the cellular membrane. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 130, p. 107–115, 2010.

DUBEY, R.; SHAMI, T. C.; BASHKER RAO, K. U. Microencapsulation technology and applications. *Defence Science Journal*, v. 59, n. 1, p. 82-95, 2009.

FILGUEIRAS, C. T., VANETTI, M. C. D. Effect of eugenol on growth and Listeriolysin O production by *Listeria monocytogenes*. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v. 49, p. 405–409, 2006.

GARCÍA-GARCÍA, R.; LÓPEZ-MALO, A.; PALOU, E. Bactericidal action of binary and ternary mixtures of carvacrol, thymol, and eugenol against *Listeria innocua*. *Journal of Food Science*, v. 76, n. 2, 2011.

GARG, A; SINGH, S. Enhancement in antifungal activity of eugenol in immunosuppressed rats through lipid nanocarriers. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 87, p. 208-288, 2011.

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

GOUIN, S. Micro-encapsulation: industrial appraisal of existing technologies and trends. *Trends Food Science Technology*, p. 330-347, 2004.

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

JIROVETZ, L., BUCHBAUER, G., STOILOVA, I., STOYANOVA, A., KRASTANOV, A., SCHMIDT, E. Chemical composition and antioxidant properties of clove leaf essential oil. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, v. 54, p. 6303–6307, 2006.

JOHNY, A. K.; DARRE, M. J.; DONOGHUE, A. M.; DONOGHUE, D. J.; VENKITANARAYANAN, K. Antibacterial effect of trans-cinnamaldehyde, eugenol, carvacrol, and thymol on *Salmonella enteritidis* and *Campylobacter jejuni* in chicken cecal contents in vitro. *The Journal of Applied Poultry Research*, v. 19, p. 237-244, 2010.

KHA, T. C.; NGUYEN, M. H.; ROACH, P. D.; STATHOPOULOS, C. E. Microencapsulation of gac oil by spray drying: Optimization of wall material concentration and oil load using response surface methodology. *Drying Technology: An International Journal*, v. 32, p. 385-397, 2014.

LIOLIOS, C. C.; GORTZI, O.; LALAS, S.; TSAKNIS, J.; CHINO, I. Liposomal incorporation of carvacrol and thymol isolated from the essential oil of *Origanum dictamnus* L. and in vitro antimicrobial activity. *Food Chemistry*, v. 112, p. 77-84, 2009.

LIU, X. D. ATARASHI, T.; FURUTA, T.; YOSHII, H.; AISHIMA, S.; OHKAWARA, M.; LINKO, P. Microencapsulation of emulsified hydrophobic flavours by Spray Drying. *Drying Technology*, v. 19, p. 1361-1374, 2001.

MOURTZINOS, I.; KALOGEROPOULOS, S. E.; PAPADAKIS, S. E.; KONSTATINO, K.; KARATHANOS, V. T. Encapsulation of nutraceutical monoterpenes in  $\beta$ -cyclodextrin and modified starch. *Journal of Food Science*, v. 73, p. 89-94, 2008.

NESTERENKO, A.; ALRIC, I.; SILVESTRE, F.; DURRIEU, V. Vegetable proteins in microencapsulation: a review of recent interventions and their effectiveness. *Industrial Crops and Products*, v. 42, p. 469–479, 2013.

OGATA, M.; HOSHI, M.; URANO, S.; ENDO, T.; 2000. Antioxidant activity of eugenol and related monomeric and dimeric compounds. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, v.48, p. 1467–1469, 2000.

PAN, K.; CHEN, H.; DAVIDSON, P. M.; ZHONG, Q. Thymol nanoencapsulated by sodium caseinate: Physical and antilisterial properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 62, p. 1649-1657, 2014.

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

SANTOS, A. B.; FERREIRA, V. P.; GROSSO, C. R. F. Microcápsulas: Uma alternativa viável. Microencapsulação de produtos sensíveis a oxidação: óleo-resina de páprica. *Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento*, v. 3, p. 26-30, 2000.

SILVA-BUZANELLO, R. A.; FERRO, A. C.; BONA, E.; CARDOZO-FILHO, L.; ARAÚJO, P. H. H.; LEIMANN, F. V.; GONÇALVES, O. H.; Validation of a Ultraviolet-visible (UV – Vis) technique for the quantitative determination of curcumin in poly (L – lactic acid) nanoparticles. *Food Chemistry*, v. 172, p. 99-104, 2015.

SHINDE, U.; NAGARSENKER, M. Microencapsulation of eugenol by gelatin-sodium alginate complex coacervation. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 73, p. 311-315, 2011.

TEIXEIRA, B.; MARQUES, A.; RAMOS, R.; NENG, R. N.; NOGUEIRA, M. F. J.; SARAIVA, J. A.; Chemical composition and antibacterial and antioxidant properties of commercial essential oils. *Industrial Crops and Products*, v. 43, p. 587-595, 2013.

TRCKOVÁ, J.; STETINA, J. KÁNSKÚ, J. Influence of protein concentration on rheological properties of carrageenan gels in milk. *International Dairy Journal*; v. 14, n. 6, p. 137-146, 2003.

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

WALSH, S. E., MAILLARD, J. Y., RUSSELL, A. D., CATRENICH, C. E., CHARBONNEAU, D.L., BARTOLO, R.G., Activity and mechanisms of action of selected biocidal agents on Gram positive and Gram negative bacteria. *Journal of Applied Microbiology*, v. 94, p. 240-247, 2003.

WANG, Y.; LU, Z.; LV, F.; BIE, X. Study on microencapsulation of curcumin pigments by spray drying. *European Food Research and Technology*, v. 229, p. 391-396, 2009.

WANG, R.; TIAN, Z.; CHEN, L. A novel process for microencapsulation of fish oil with barley protein. *Food Research International*, v. 33, p. 2735-2741, 2011.

WORANUCH, S; YOKSAN, R. Eugenol-loaded chitosan nanoparticles: I. Thermal stability improvement of eugenol through encapsulation. *Carbohydrate Polymers*, v. 96, n. 2, p. 578-585, 2013.

ZBICINSKI, I; DELAG, A.; STRUMILLO, C.; ADAMIEC, J. Advanced experimental analysis of drying kinetics in spray drying. *Chemical Engineering Journal*, v. 86, p. 207-216, 2002.

## 5.2 ARTIGO 3

**EUGENOL MICROENCAPSULADO EM CARRAGENA COMBINADA COM  
PROTEÍNAS POR ATOMIZAÇÃO (SPRAY DRYING)**Ruth dos Santos da VEIGA<sup>1</sup>, Cristiane CANAN<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR), Câmpus Medianeira, Avenida Brasil 4232, Parque Independência, CEP 85884-000, Medianeira, Paraná, Brasil.

**RESUMO**

O objetivo deste trabalho foi avaliar a eficiência de encapsulação do eugenol em carragena combinada com proteína isolada do soro de leite com baixo teor de lactose, proteína do farelo de arroz e albumina sérica bovina, de acordo com um planejamento de mistura do tipo *simplex-centroid*, o que permitiu que as proteínas fossem estudadas isoladas, bem como, suas interações binárias e ternárias. As micropartículas foram obtidas pela atomização de uma suspensão dos agentes encapsulantes e Tween 80 como surfactante. A variação da mistura de proteínas teve influência significativa ( $p \leq 0,05$ ) nos valores de recuperação de eugenol (RE %) e eficiência de encapsulação (EE %). Formulações com proteína do farelo de arroz e albumina sérica bovina apresentaram maiores valores de RE % (104,5 e 86,5 %, respectivamente), demonstrando a maior estabilidade das dispersões nestas condições. A interação de proteína do farelo de arroz e albumina sérica bovina resultou em uma maior EE % (86,5 %), contudo a interação ternária resultou em valores menores do que 18 %. As microcápsulas exibiram diâmetros médios entre 3,4 a 4,6  $\mu\text{m}$  e a morfologia variou de superfícies irregulares com fissuras e achatamentos a superfícies esféricas com ausência de fissuras ou deformações. As análises térmicas e de FTIR indicaram a eficiência de encapsulação do processo e uma possível interação entre os agentes encapsulantes (proteína de farelo de arroz e da albumina sérica bovina). O eugenol pode ser eficientemente encapsulado, nas condições estudadas, pelo processo de atomização quando albumina sérica bovina e proteína do farelo de arroz são combinadas com carragena.

Palavras-chave: Eficiência de Encapsulação, Farelo de Arroz, BSA, Proteína do Soro de Leite, Baixo Teor de Lactose, Simplex-centroid.



## 1. INTRODUÇÃO

Os óleos essenciais são obtidos de diferentes espécies de plantas comestíveis, ervas e especiarias. Apresentam uma composição bastante complexa, sendo uma mistura natural que pode conter de 20 a 60 componentes em diferentes concentrações, em geral caracterizados por dois ou três componentes majoritários, em concentrações relativamente elevadas (BAKKALI et al., 2008). Dentre os principais componentes dos óleos essenciais, o timol, o carvacrol e o eugenol são os mais estudados (LIOLIOS et al., 2009; JOHNY et al., 2010; CASTILLO et al., 2014; PAN et al., 2014).

O eugenol é um composto fenólico encontrado em óleos essenciais de especiarias ou extratos de planta como canela, manjeriço, noz-moscada e folha de louro, sendo o principal constituinte do óleo de cravo. Amplamente utilizado como agente aromatizante de alimentos e como aditivo em produtos de perfumaria, cosméticos e tabaco (ABAUL, BOURGEOIS, BESSIERE, 1995; ZHANG, KULKARNI, KULKARNI, 2000; BHUIYAN 2012). A presença de compostos fenólicos no eugenol confere ao mesmo propriedades antioxidantes (OGATA et al., 2000; RAUSCHER; SANDERS; WATKINA, 2001) e propriedade antibacteriana contra diferentes microrganismos (*Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*) ( GARCÍA-GARCÍA et al., 2011; CHEN, ZHANG, ZHONG, 2015) e *Salmonella typhi* (DEVI et al. 2010) e atividade antifúngica (CHAMI et al., 2005, GAYOSO et al. 2005).

Segundo Bauer et al. (2001) o uso de antioxidantes sintéticos tem sido alvo de questionamentos quanto a inocuidade, tendo a possibilidade desses antioxidantes apresentarem alguma toxidez. Assim, o uso do eugenol como substituto de aditivos sintéticos tem sido sugerido. Porém, a utilização dos óleos essenciais tem algumas limitações tecnológicas devido à alta volatilidade dos compostos, apresentam natureza hidrofóbica e são quimicamente instáveis na presença de oxigênio, umidade e calor. Portanto, uma das alternativas para prolongar sua estabilidade e facilitar o seu uso no processamento de alimentos é a microencapsulação (FERNANDES, BORGES, BOTREL, 2014; CHEN, ZHANG, ZHONG, 2015).

A microencapsulação é uma tecnologia que permite revestir partículas sólidas ou líquidas de interesse por meio de uma barreira física, protegendo compostos

quimicamente instáveis da ação de agentes externos, tais como ar, umidade, luz e outros componentes do sistema (SANTOS, FAVARO-TRINDADE, GROSSO, 2005; FUCHS et al., 2006; AHN et al., 2008; LIU et al., 2012). Dentre as técnicas utilizadas, a secagem por atomização é a mais utilizada na indústria de alimentos pelas vantagens de baixo custo de produção, por apresentar variedades de matrizes encapsulantes, boa retenção de compostos voláteis, boa estabilidade dos encapsulados, além de produção em larga escala em modo contínuo (REINECCIUS, 1991).

A eficiência da microencapsulação e a estabilidade das micropartículas dependem, fundamentalmente, do material utilizado como agente encapsulante (ZBICINSKI et al., 2002; WANG et al., 2009). A seleção se dá a partir de uma ampla variedade de polímeros naturais e sintéticos (BOTREL et al., 2012). Entre os agentes encapsulantes comumente utilizados incluem os carboidratos, gomas, lipídios e proteínas e algumas fontes alternativas como quitosana (REINECCIUS, 1991; DUBEY et al., 2009).

Polissacarídeo com excelente propriedade de formação de gel e suspensões viscosas com a água (TRCKOVÁ et al., 2003), a carragena apresenta-se como material biocompatível alternativo para microencapsulação com propriedade de aprisionamento de compostos de interesse. A albumina sérica bovina, que representa 42 % das proteínas do sangue bovino, tem aplicações específicas em função das suas características funcionais tecnológicas (PRATA; SGARBIERI, 2005), desta forma sendo uma das fontes de proteína animal que poderia ser utilizada como material de parede na microencapsulação.

As proteínas do soro do leite são extraídas durante o processo de fabricação do queijo, apresentando um conteúdo aproximado de 95 % de proteínas. Podem ser produzidas por diversas técnicas, dentre as quais, filtração por gel, troca iônica, ultrafiltração, adsorção, precipitação por polifosfato e atomização (SHIMADA, CHEFTEL, 1988; HARAGUCHI, ABREU, PAULA, 2006; GIRALDI, RODRIGUES, CÂNDIDO, 2014). São as proteínas mais comumente utilizadas para a microencapsulação de ingredientes alimentícios por atomização, demonstrando excelente propriedade de encapsulação tanto para compostos voláteis, quanto não voláteis (LEE; ROSENBERG, 1999).

As proteínas do arroz, em especial as proteínas extraídas do farelo de arroz apresentam propriedades funcionais como excelente capacidade de formação de espuma com estabilidade durante dias, além de alta capacidade emulsificante, apresentando propriedades semelhantes a da caseína (CHANDI, SOGI, 2007). Obtidas a partir do farelo de arroz, um subproduto que pode ser considerado como uma fonte potencial de proteínas de baixo custo e de alta qualidade, estas proteínas contêm 75 % glutenina, 15 % de globulina, 6 % albumina e 3 % de prolaminas (HAMADA, 2000; AGBOOLA et al., 2005). As proteínas do farelo de arroz devido a estas características, apresentam-se como uma alternativa fonte de proteína vegetal a ser utilizada na microencapsulação e ainda não explorada como agente encapsulante.

Segundo Fernandes et al. (2012) os agentes de encapsulação podem ser usados sozinhos ou em combinação e a composição ideal é definida para cada situação em especial. O planejamento de mistura é uma metodologia eficiente quando requer determinar os níveis ótimos dos componentes e dos principais ingredientes para o desenvolvimento de uma formulação. Uma vez que as proporções dos ingredientes na mistura, e os seus níveis, são dependentes uns dos outros e a soma de todos os componentes é sempre um ou 100 % (HARE, 1974, CASTRO et al. 2003). O estudo da mistura da carragena com as proteínas do farelo de arroz, do soro de leite com baixo teor de lactose e albumina sérica bovina na encapsulação ainda não tem sido reportado.

Desta forma, este estudo teve como objetivo avaliar os efeitos da combinação de proteínas do farelo de arroz, do soro de leite com baixo teor de lactose e albumina sérica bovina com a carragena, como agentes encapsulantes, na eficiência de encapsulação do eugenol.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 MATERIAIS

Eugenol (V900001, Vetec<sup>TM</sup>, Sigma-Aldrich, 98,0 %), álcool etílico P.A. (Neon, 99,5 %) e Tween 80 (Synth, grau analítico) foram utilizados no preparo da fase orgânica. Para o preparo da fase aquosa foram utilizadas carragena (C1013, Sigma-Aldrich, grau comercial), proteína isolada do soro de leite com baixo teor de lactose (2,89 % de lactose) obtida conforme procedimento descrito por Giraldi, Rodrigues e Cândido (2014), proteína do farelo de arroz (produzida conforme metodologia descrita por Han et al. (2009) com modificações) e albumina sérica bovina (A2153, Sigma-Aldrich, grau comercial). Os demais reagentes utilizados foram de pureza analítica de diferentes procedências comerciais.

### 2.2 OBTENÇÃO DO CONCENTRADO PROTEICO DO FARELO DE ARROZ (CPFA)

O CPFA foi obtido tendo por base a metodologia de Han et al. (2009) com modificações, onde 30 g de farelo de arroz desengordurado (FAD) foram suspensos em 170 mL de água ultra pura (MS 2000, Gehaka, Brasil) e o pH ajustado para 10 com solução NaOH 2 mol.L<sup>-1</sup>. A dispersão foi submetida a sonicação em banho de ultrassom. Após, foi centrifugada a 11.979 g por 15 minutos (25 °C) (Rotina 420 R, Hettich Zentrifugen, Alemanha), o precipitado (P<sub>1</sub>) descartado e o sobrenadante (S<sub>1</sub>) coletado, sendo seu pH ajustado para 4,5 com HCl 3 mol.L<sup>-1</sup>, considerado o ponto isoelétrico das proteínas do arroz (GUPTA; CHANDI; SOGI, 2008). A solução foi deixada em *over night* para precipitação a frio (10 °C), seguida de centrifugação a 11.979 g por 15 minutos (25 °C). O sobrenadante (S<sub>2</sub>) foi descartado e o precipitado (P<sub>2</sub>) contendo a proteína foi lavado 3 vezes com água ultra pura e armazenado nos próprios tubos da centrífuga, para nova centrifugação a 11.979 g por 15 minutos (25 °C). Para neutralização, ajustou-se o pH para 7 com NaOH 2 mol.L<sup>-1</sup>. Posteriormente, as amostras foram congeladas a -

18 °C, liofilizadas (Labconco, FreeZone 6, EUA) em pressão absoluta menor que 0,5 mBar temperatura de aquecimento de 40 °C por 24 horas.

### 2.3 PLANEJAMENTO DE MISTURA *SIMPLEX-CENTROID*

Para obtenção da microencapsulalação de eugenol a carragena foi utilizada como encapsulante e estudou-se a combinação desta com a proteína do soro de leite com baixo teor de lactose ( $X_1$ ), proteína do farelo de arroz ( $X_2$ ) e albumina sérica bovina ( $X_3$ ), com o intuito de avaliar a influência da mistura destes agentes encapsulantes na microencapsulação de eugenol. As formulações foram preparadas, inicialmente, pela obtenção de uma suspensão de carragena com concentração fixa de 0,5 % (m/v) e uma suspensão de proteína na concentração máxima de 3 % (m/v) conforme descrito no item 2.4, variando a proporção de proteínas adicionadas segundo planejamento de mistura do tipo *simplex-centroid* (Tabela 1).

Tabela 1 – Planejamento de mistura *simplex-centroid*.

Ensaio	Proporções das proteínas utilizadas como agentes encapsulantes*.		
	$x_1$ ( $X_1$ %)	$x_2$ ( $X_2$ %)	$x_3$ ( $X_3$ %)
1	1,00 (3)	0,00 (0)	0,00 (0)
2	0,00 (0)	1,00 (3)	0,00 (0)
3	0,00 (0)	0,00 (0)	1,00 (3)
4	0,50 (1,5)	0,50 (1,5)	0,00 (0)
5	0,50 (1,5)	0,00 (0)	0,50 (1,5)
6	0,00	0,50 (1,5)	0,50 (1,5)
7	0,33 (1)	0,33 (1)	0,33 (1)
8	0,33 (1)	0,33 (1)	0,33 (1)
9	0,33 (1)	0,33 (1)	0,33 (1)

\* A concentração de carragena foi fixada em 0,5 % m/v.

$x_1$ ,  $x_2$ ,  $x_3$ : valores codificados para as proporções de mistura das proteínas do soro de leite com baixo teor de lactose, do farelo de arroz e albumina sérica bovina, respectivamente.

$X_1$  (%),  $X_2$  (%) e  $X_3$  (%): valores reais da concentração (m/v) das respectivas proteínas adicionada na mistura.

## 2.4 PREPARO DA SUSPENSÃO

Para a obtenção das microcápsulas foi preparada uma suspensão dos reagentes mediante o preparo de uma fase orgânica e de uma fase aquosa. A fase orgânica foi preparada pela solubilização de eugenol (0,80 g) e Tween 80 (0,12 g) em álcool etílico (10 mL) a temperatura ambiente (aproximadamente 25 °C). A fase aquosa foi preparada em duas etapas, na primeira, carragena (1 g) foi solubilizada em 200 mL de água destilada a temperatura de 60 °C sob agitação mecânica vigorosa por 15 minutos. Na segunda etapa, preparou-se a suspensão das proteínas onde cada uma foi solubilizada separadamente em água destilada a temperatura ambiente (aproximadamente 25 °C) conforme proporção descrita no planejamento de mistura (Tabela 1) e nas formulações em que mais do que uma proteína foi utilizada, as respectivas suspensões de proteínas foram adicionadas uma a outra e homogeneizadas por 15 minutos, de modo a obter uma suspensão de proteínas com concentração final de 3,0 % (m/v), em um volume total de 200 mL de água destilada. Após, a suspensão de proteínas foi adicionada a suspensão de carragena e homogeneizada por mais 10 minutos, sob agitação mecânica vigorosa.

Posteriormente, a fase orgânica foi adicionada lentamente à fase aquosa mantendo a mistura sob agitação mecânica vigorosa por 5 minutos. Em seguida, a suspensão foi homogeneizada utilizando um homogeneizador Fisaton (Modelo 713D, São Paulo, Brasil), operando a 15.000 rpm durante 15 minutos.

## 2.5 PRODUÇÃO DAS MICROCÁPSULAS POR SECAGEM EM ATOMIZADOR

A obtenção das microcápsulas foi realizada através da secagem da suspensão por atomização. O processo foi realizado em um secador laboratorial Mini *Spray Dryer* (Labmarq - MSD 1,0, São Paulo, Brasil) com câmara de secagem de 500 mm × 150 mm, bico atomizador tipo duplo fluido, com orifício de 1,2 mm de diâmetro. A alimentação foi feita através de uma bomba peristáltica, com vazão de 0,6 (L.h<sup>-1</sup>) e temperatura do ar de entrada 150 °C.

## 2.6 DETERMINAÇÃO DA RECUPERAÇÃO PERCENTUAL DE EUGENOL

A recuperação percentual de eugenol (RE %) permite determinar a concentração real de eugenol presente nas microcápsulas após o processo de atomização, bem como, determinar a estabilidade da suspensão obtida. Para tanto, 10 mg de microcápsulas foram pesadas em um béquer, adicionadas de 5 mL de água destilada e solubilizadas em Ultrasson (ELMASONIC, P60H, Alemanha) em frequência 37 KHz e 100 % de amplitude, por 30 minutos a temperatura de  $35 \pm 2$  °C. Posteriormente, 5 mL de álcool etílico foi adicionado na mistura e as amostras foram homogeneizadas e transferidas para tubos de centrífuga com capacidade de 250 mL e centrifugadas (centrífuga Hettich Zentrifugen, Rotina 420 – Tuttlingen, Germany) a 9.000 rpm por 15 minutos a temperatura de 10 °C. Em seguida, o sobrenadante foi filtrado em filtro Millipore com poros de 0,45 µm de diâmetro e 1 mL foi transferido para um vial para quantificação em UPLC conforme procedimento descrito no item 2.8.

O cálculo para RE (%) está apresentado na Equação 1.

$$RE \% = \frac{[eugenol]_{real}}{[eugenol]_{inicial}} \times 100 \quad (1)$$

Em que, RE % = recuperação de eugenol;  $[eugenol]_{real}$  = concentração de eugenol determinada após atomização;  $[eugenol]_{inicial}$  = concentração de eugenol adicionada no preparo da suspensão.

## 2.7 DETERMINAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO

A eficiência de encapsulação (EE %) permite identificar a quantidade de eugenol retido nas microcápsulas. Para remoção do eugenol não encapsulado 10 mg de micropartículas foram lavadas com álcool etílico, com o auxílio de papel filtro 25 µ e bomba a vácuo em funil de Buchner de 10 cm de diâmetro. Em seguida, as amostras foram secas em estufa a 50 °C até atingir peso constante. As amostras secas foram removidas do papel filtro, solubilizadas em 10 mL de uma solução de água e álcool

etílico (1:1) e centrifugadas, conforme procedimento já descrito no item 2.6. Em seguida, 1 mL do sobrenadante foi transferido para um vial para quantificação em UPLC.

A Equação 2 apresenta o cálculo utilizado para determinação da EE (%).

$$EE \% = \frac{[eugenol]_{retido}}{[eugenol]_{real}} \times 100 \quad (2)$$

Em que: EE % = eficiência de encapsulação de eugenol;  $[eugenol]_{real}$  = quantidade de eugenol presente nas microcápsulas após atomização;  $[eugenol]_{retido}$  = quantidade de eugenol presente nas microcápsulas após remoção do eugenol não encapsulado por lavagem com álcool etílico.

## 2.8 QUANTIFICAÇÃO DE EUGENOL POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ULTRA EFICIÊNCIA (CLAE)

A quantificação de eugenol foi realizada de acordo com a metodologia proposta por Dhoot et al. (2009), com algumas modificações. Um cromatógrafo líquido de alta eficiência acoplado de detector UV-Vis (CLAE-UVD 170U) (Dionex Corporation, UltiMate 3000, Sunnyvale, Estados Unidos) foi utilizado e processamento no *software* Chromeleon 7.2. Para a separação simultânea do eugenol foi utilizada fase móvel composta por álcool metílico e água ultra pura, na proporção de 85:15 (v:v), em método isocrático de eluição. A corrida cromatográfica foi realizada em coluna de fase reversa C18 Acclain PA2, 5  $\mu$ m Analítica (4,6 x 250 mm), com vazão de fase móvel de 1 mL.min<sup>-1</sup> e temperatura da coluna de 25 °C. A detecção do composto foi feita a 280 nm com volume de injeção da amostra de 20  $\mu$ L. O tempo da corrida cromatográfica foi de 10 min (tempo de retenção do eugenol aproximadamente 5,7 minutos). O composto foi identificado baseado no tempo de retenção do soluto com relação ao padrão. A quantificação foi realizada com base na curva de calibração de soluções de eugenol em álcool metílico nas concentrações de 1,0; 0,8; 0,6; 0,4; 0,2 e 0,1 mg.mL<sup>-1</sup>.



## 2.9 ANÁLISE DE DADOS

O modelo canônico de Scheffe' (1963) (Equação 3) foi usado para ajustar aos dados experimentais de recuperação e eficiência de encapsulação de eugenol e os modelos lineares, quadráticos e cúbicos foram testados para obter os respectivos coeficientes de regressão, utilizando para tanto a análise de regressão e análise de variância (ANOVA).

$$y = \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \beta_3 x_3 + \beta_{12} x_1 x_2 + \beta_{13} x_1 x_3 + \beta_{23} x_2 x_3 + \beta_{123} x_1 x_2 x_3 \quad (3)$$

Em que:  $y$  é a função resposta observada;  $\beta_1$ ,  $\beta_2$ ,  $\beta_3$ ,  $\beta_{12}$ ,  $\beta_{13}$ ,  $\beta_{23}$ ,  $\beta_{123}$ , são os coeficientes de regressão estimados,  $x_1$ ,  $x_2$  e  $x_3$  são os níveis codificados das variáveis dependentes.

Após determinação dos modelos matemáticos significativos foram realizadas as análises de superfície de resposta e curva de contorno. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o *software* Statística 8.0 ( $p \leq 0,05$ ) (Statsoft Inc., Tulsa, OK, USA, 2004).

## 2.10 PROPRIEDADES FÍSICAS DAS MICROPARTÍCULAS

### 2.10.1 Morfologia e Tamanho das Microcápsulas

A morfologia e o tamanho médio das microcápsulas foram avaliados por microscopia eletrônica de varredura (TM 3000 Tabletop Scanning Electron Microscope, HITACHI, Schaumburg, Estados Unidos). O Cálculo do diâmetro médio das microcápsulas foi realizado medindo 120 partículas de cada amostra (FRITZEN-FREIRE et al., 2012).

### 2.10.2 Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

Para identificar a existência de possíveis interações químicas entre os reagentes utilizados para o processo de microencapsulação de eugenol, foram realizadas análises de Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier com modo de refletância atenuada (FTIR-UATR, Frontier PerkinElmer) com resolução de  $4\text{ cm}^{-1}$ , intervalo de número de onda de  $4000\text{ a }650\text{ cm}^{-1}$ . A análise foi realizada com uma média de quatro acumulações para cada uma das amostras dos materiais puros e das microcápsulas contendo eugenol (ensaio 2, 3 e 6). Adicionalmente, uma mistura física de microcápsula com adição de  $50\%_{\text{m/m}}$  de eugenol também foi analisada com o intuito de observar como seria o espectro das amostras com presença de eugenol na parte externa. Os espectros e dados obtidos por infravermelho foram analisados pelo *software* OriginPro 8.5.

### 2.10.3 Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC), Análise Termogravimétrica (TGA) e Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) Acoplados

O comportamento térmico das microcápsulas foi avaliado por análise de calorimetria diferencial de varredura e análise termogravimétrica, acopladas ao equipamento de FTIR, com o objetivo de confirmar a presença de eugenol nas microcápsulas, sendo este detectado por FTIR durante o aquecimento das amostras, por conseqüente rompimento das microcápsulas e volatilização de eugenol.

Amostras de 9 a 12 mg dos materiais puros (carragena, proteína do farelo de arroz, albumina sérica bovina e eugenol) e das microcápsulas correspondentes aos ensaios 2, 3 e 6 foram acondicionadas em porta-amostra de platina no equipamento DSC (STA, do inglês *Simultaneous Thermal Analysis*, PerkinElmer modelo STA 6000) e aquecidas de  $50\text{ a }750^{\circ}\text{C}$  com taxa de aquecimento de  $100^{\circ}\text{C}/\text{min}$  e fluxo de nitrogênio de  $20\text{ mL}/\text{min}$ , sendo acompanhadas a perda de massa e fluxo de calor. Durante o aquecimento o FTIR-UATR, acoplado ao DSC, realizou a varredura das amostras durante 15 minutos.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Tabela 2 apresenta os valores de RE (%), EE (%), as concentrações de eugenol total e retido nas microcápsulas, bem como, o diâmetro médio das microcápsulas obtidas, em função das diferentes combinações de agente encapsulante.

Tabela 2 – Valores de recuperação e eficiência de encapsulação de eugenol e concentração de eugenol total e retido.

Ensaio	RE % <sup>1</sup>	EE % <sup>2</sup>	Eugenol total <sup>3</sup> (mg.mL <sup>-1</sup> )	Eugenol retido <sup>4</sup> (mg.mL <sup>-1</sup> )	Diâmetro médio (µm)
1	58,1	0,0	0,0944	0,0000	3,4 ± 2,3
2	104,5	23,7	0,1702	0,0403	3,5 ± 1,9
3	86,5	45,1	0,1415	0,0638	4,6 ± 2,1
4	37,9	47,8	0,0616	0,0294	4,4 ± 2,5
5	40,2	47,6	0,0656	0,0312	3,8 ± 1,7
6	53,2	79,4	0,0869	0,0690	3,7 ± 2,0
7	68,3	11,7	0,1109	0,0129	3,8 ± 2,1
8	66,9	18,3	0,1088	0,0199	4,2 ± 1,9
9	62,4	17,5	0,1013	0,0169	*

<sup>1</sup>: recuperação percentual de eugenol; <sup>2</sup>: eficiência de encapsulação de eugenol; <sup>3</sup>: concentração de eugenol determinada após atomização; <sup>4</sup>: concentração de eugenol determinada após remoção do eugenol não encapsulado. \* medida não determinada.

A RE (%) variou de 37,9 a 104,5 % e a EE (%) variou de 0,0 a 79,4 %, sendo influenciadas pelos agentes encapsulantes empregados. Estudos utilizando planejamentos de mistura para avaliar o efeito da variação dos agentes encapsulantes têm sido reportados na literatura, mas o uso de proteínas tem sido pouco relatado. Cano-Higueta et al. (2015) estudaram a microencapsulação de oleorresina de cúrcuma por atomização, variando as proporções dos agentes encapsulantes (goma arábica, maltodextrina e amido modificado) segundo planejamento de mistura *simplex-centroid*. Foram reportados valores de RE (%) e EE (%) entre 24,87 a 68,43 % e entre 7,96 a 45,23 %, respectivamente. A variabilidade dos resultados neste estudo foi relacionada à propriedade de formação de filme e os resultados mais elevados foram obtidos nas combinações dos encapsulantes com a goma arábica.

Costa et al. (2013) também utilizaram um planejamento de mistura *simplex-centroid* para avaliar o efeito da variação da proporção de agentes encapsulantes. Neste

estudo, o óleo essencial de orégano foi microencapsulado por atomização em uma mistura de goma arábica, amido modificado e maltodextrina. Os autores obtiveram valores de RE % do óleo essencial entre 33,10 a 77,39 % e de EE % entre 85,3 e 93,0 %, resultados que variaram em função da proporção de agente encapsulante utilizado.

Os valores de diâmetro médio das microcápsulas foram determinados com base em uma média de 120 determinações por ensaio e variaram de 3,4 a 4,6  $\mu\text{m}$ , em função das condições experimentais para obtenção das microcápsulas de eugenol. Diâmetros médios de 1 - 15  $\mu\text{m}$  foram obtidos por Chatterjee e Bhattacharjee (2013), que estudaram a microencapsulação de extrato de cravo rico em eugenol em matrizes de maltodextrina e goma arábica. Fernandes et al. (2014) também verificaram diâmetro médio de 12,1 a 13,5  $\mu\text{m}$  em microcápsulas produzidas com goma arábica e de sua substituição total ou parcial por amido modificado, maltodextrina ou inulina na encapsulação de óleo essencial de alecrim.

### 3.1 MODELO MATEMÁTICO DE RECUPERAÇÃO PERCENTUAL DE EUGENOL

O modelo matemático da equação  $y_1$  (RE %) foi obtido pelos seus respectivos coeficientes de regressão (Equação 4) e submetido a análise de variância (ANOVA). O modelo foi considerado significativo ( $p = 0,0074$ ) e não apresentou falta de ajuste ( $p < 0,05$ ). O coeficiente de determinação ajustado ( $R^2_{\text{adj}}$ ) foi igual a 97,84 %, assim, a equação pode ser considerada válida predizer a RE (%), permitindo avaliar a estabilidade do processo de obtenção das microcápsulas. Como o modelo foi significativo, a análise de superfície de resposta da RE (%) foi determinada (Figura 1).

A combinação de carragena com a proteína do farelo de arroz ou com a albumina sérica bovina (interações primárias) como materiais encapsulantes de eugenol, possibilitou a obtenção dos maiores valores de RE (%) (104,5 e 86,5 %). Esses resultados sugerem que estas proteínas tiveram maior capacidade de estabilização na suspensão minimizando eventuais perdas operacionais de eugenol.

$$y_1 = 58,14x_1 + 104,54x_2 + 86,56x_3 - 173,56x_1x_2 - 128,50x_1x_3 - 169,57x_2x_3 + 949,57x_1x_2x_3 \quad (4)$$

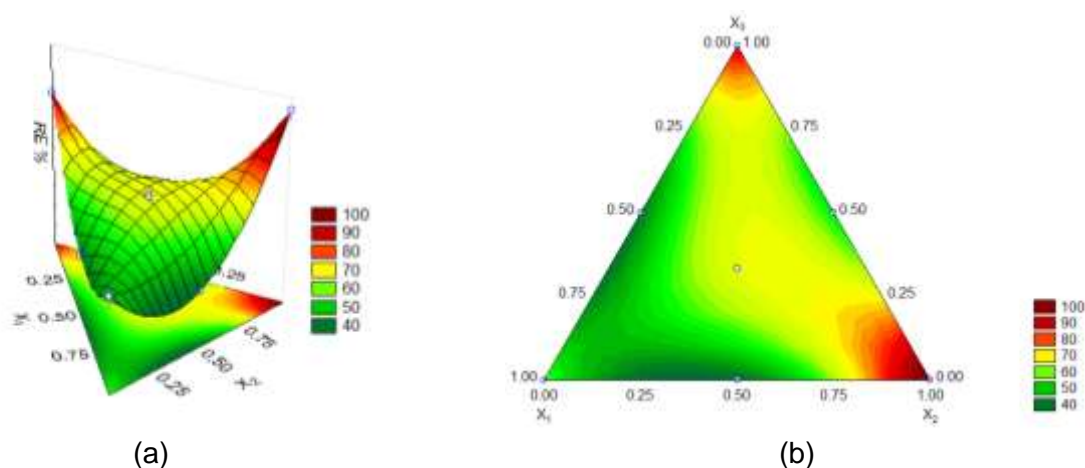


Figura 1 – Superfície de resposta (a) e curva de contorno (b) para a recuperação de eugenol (RE %).

$X_1$ : proteína do soro de leite com baixo teor de lactose;  $X_2$ : proteína do farelo de arroz;  $X_3$ : albumina sérica bovina.

### 3.2 MODELO MATEMÁTICO PARA EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO

A análise de regressão determinou os coeficientes de regressão para o modelo matemático da equação  $y_2$  (EE %) (Equação 5). Com exceção do termo linear para proteína do soro de leite com baixo teor de lactose ( $X_1$ ) os demais termos lineares, quadráticos e o cúbico foram significativos ( $p \leq 0,05$ ). O modelo mostrou-se significativo ( $p = 0,0043$ ) e não apresentou falta de ajuste ( $p < 0,05$ ), com um coeficiente de determinação ajustado ( $R^2_{adj}$ ) igual a 99,45 %. Desta forma, o modelo pode ser considerado válido para prever a EE %, permitindo avaliar a eficiência do processo de obtenção das micropartículas. A análise de superfície de resposta e curva de contorno é apresentada na Figura 2.

$$y_2 = 23,70x_2 + 45,08x_3 + 143,60x_1x_2 + 100,36x_1x_3 + 180,15x_2x_3 - 1464,34x_1x_2x_3 \quad (5)$$

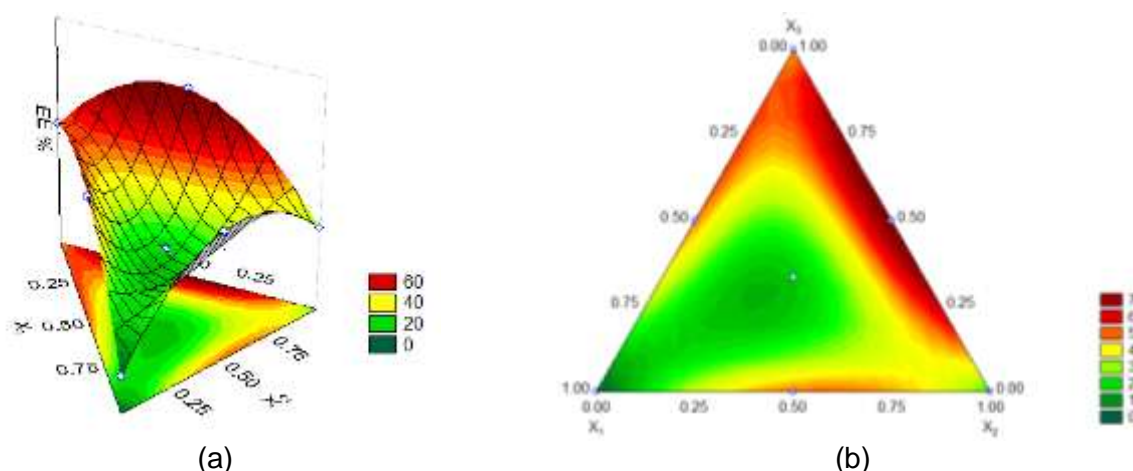


Figura 2 – Superfície de resposta (a) e curva de contorno (b) para os resultados de eficiência de encapsulação (EE %).

$X_1$ : proteína do soro de leite com baixo teor de lactose;  $X_2$ : proteína do farelo de arroz;  $X_3$ : albumina sérica bovina.

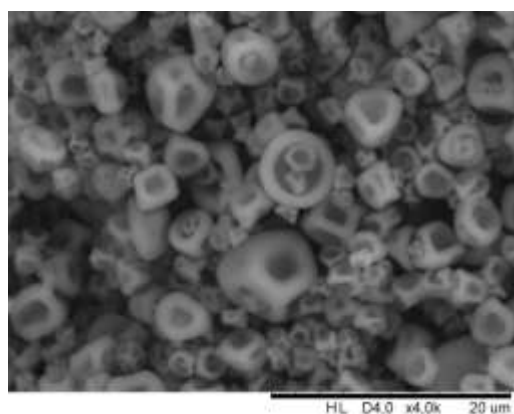
Apesar de os valores de RE (%) terem sido superiores quando a proteína de farelo de arroz ( $X_2$ ) e a albumina sérica bovina ( $X_3$ ) foram utilizadas isoladamente, o seu uso em combinação (interação binária) possibilitou o maior valor de EE (%) (79,4 %). Contudo, observando-se a concentração de eugenol retido (Tabela 2) nas formulações, os ensaios 3 (100 % de  $X_3$ ) e 6 ( $X_2 \times X_3$ ) as mesmas apresentam valores similares. Portanto, pode-se dizer que o uso da proteína de farelo de arroz apresentou propriedade de estabilização da suspensão, auxiliando na retenção de eugenol nas microcápsulas e, ao mesmo tempo, favoreceu o processo de encapsulação quando combinada com a albumina sérica bovina. Esta propriedade de estabilização foi verificada também por Wang et al. (1999) que investigaram as propriedades funcionais das proteínas do farelo de arroz desengordurado e reportaram capacidade emulsionante considerada similar a da clara do ovo, relacionado ao teor de aminoácidos das proteínas do arroz que é semelhante a da proteína de caseína e de soja; porém inferior a capacidade emulsionante da albumina sérica bovina, que são significativamente elevadas. Fabian et al. (2010) estudaram a interação das proteínas do farelo de arroz com polissacarídeos (alginate e carragena) para formar precipitados complexos. Os resultados demonstraram que as proteínas do farelo de arroz podem associar-se bem com os polissacarídeos,

uma vez o precipitado obtido teve capacidade de formação de espuma e emulsão, indicando desta forma que as propriedades funcionais da proteína do farelo de arroz podem fornecer características favoráveis para materiais de parede em microencapsulação.

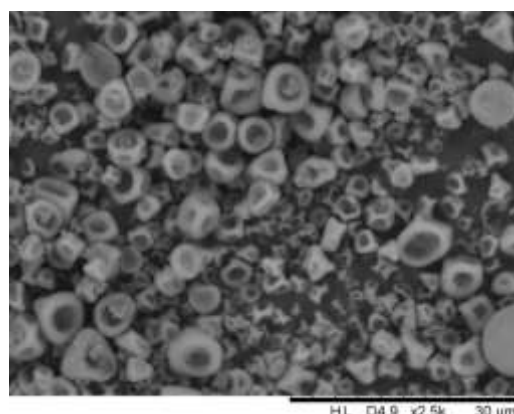
Apesar da combinação ternária entre as proteínas resultar em valores médios de RE (%) entre 62,4 e 68,3 %, as mesmas não permitiram a eficiente encapsulação do eugenol durante a secagem por atomização. Os resultados sugerem que pode ter ocorrido algum tipo de interação entre as proteínas que não permitiu o aprisionamento efetivo do eugenol.

### 3.1 MORFOLOGIA DAS MICROCÁPSULAS DE EUGENOL

As microcápsulas exibiram tamanhos variados, com médias que variaram de 3,4 a 4,6  $\mu\text{m}$ , uma característica típica de pós, secos por atomização. Apresentaram características superficiais semelhantes entre as amostras, morfologia ligeiramente esférica/oval, com poucas rachaduras ou fissuras aparentes, porém apresentaram grandes deformações e contração (Figura 3 a, b e c).



(a-1)



(a-2)

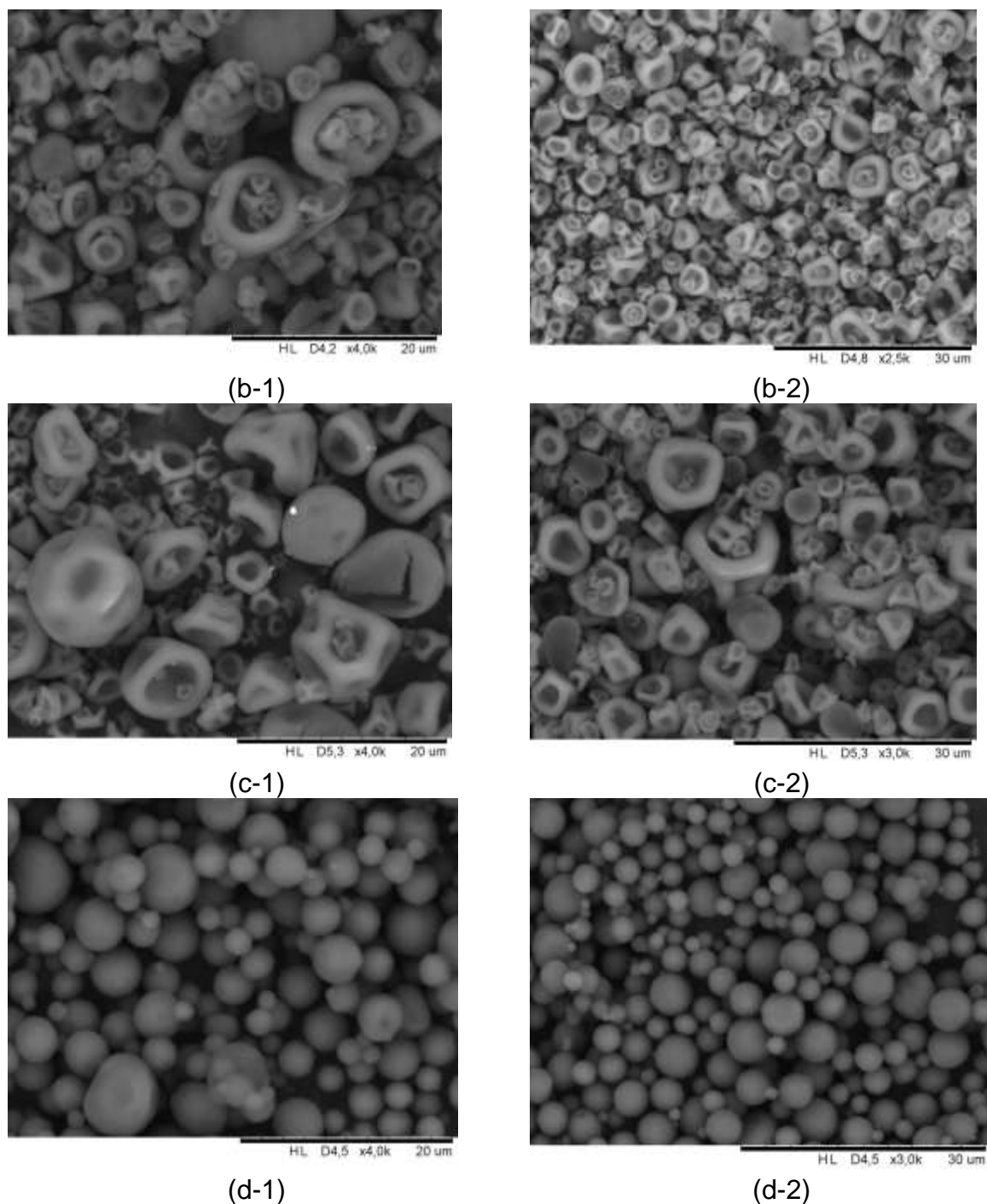


Figura 3. Imagens obtidas por MEV para eugenol microencapsulado em (a-1, a-2) carragena e proteína do soro do leite (interação primária); (b-1, b-2) carragena e proteína do farelo de arroz (interação primária); (c-1, c-2) carragena e albumina sérica bovina (interação primária); (d-1, d-2) carragena, proteína do farelo de arroz e albumina sérica bovina (interação binária).



As microcápsulas apresentadas na Figura 3 (a, b, c) indicam que os materiais utilizados para o revestimento não apresentaram boa elasticidade durante o processo de secagem, comprovado pelas grandes deformações, rugosidades e colapsos apresentados. Aspectos morfológicos semelhantes foram obtidos por Baranauskiene et al. (2005) quando utilizaram concentrado proteico de soro de leite para o revestimento de óleos essenciais de orégano (*Origanum vulgare* L.) e de extratos aromáticos de citronela (*Cymbopogon nardus* G.) e manjerona, as micropartículas apresentaram superfície rugosas e amassados profundos. Já na Figura 3 (d), as microcápsulas preparadas com carragena, proteína do farelo de arroz e albumina sérica bovina apresentaram superfície esférica, sem rachaduras ou deformações, características de um material de parede que fornece boa elasticidade durante o processo de secagem.

A proteína do farelo de arroz apresenta propriedade de estabilização de suspensão, previamente investigada e comprovada por Wang et al. (1999) e por Chandi e Sogi (2007). A albumina sérica bovina também tem sido relatada quanto a sua capacidade emulsificante, principalmente, quando associada com polissacarídeos como a carragena (FABIAN et al., 2010). Estas propriedades justificam a morfologia das microcápsulas obtidas (Figura 3 (d)) e corroboram com os resultados obtidos na eficiência de encapsulação, onde, microcápsulas produzidas pela combinação da proteína do farelo de arroz e albumina sérica bovina com carragena (Ensaio 6, Tabela 2) apresentaram o maior valor de EE% obtido (79,4%) dentre todos os ensaios do planejamento de mistura.

### 3.6 DIÂMETRO MÉDIO DAS MICROCÁPSULAS

A análise de regressão também foi determinada para os valores de diâmetro médio das microcápsulas de eugenol. Os coeficientes de regressão para o modelo matemático são apresentados na equação  $y_3$  (Equação 6). Contudo, apenas os termos lineares e de interação entre as proteínas de soro de leite com baixo teor de lactose e de farelo de arroz ( $X_1 * X_2$ ) foram significativos ( $p \leq 0,05$ ). O modelo quadrático mostrou-

se significativo ( $p = 0,0318$ ), contudo apresentou falta de ajuste ( $p > 0,05$ ), o que não possibilitou a análise de superfície de resposta.

$$y_3 = 3,56x_1 + 3,40x_2 + 4,37x_3 + 3,70x_1x_2 \quad (6)$$

### 3.7 ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)

A análise de espectroscopia de infravermelho pode sugerir se o processo de encapsulação foi eficiente, de modo que, bandas de absorção características do composto encapsulado podem não ser identificadas caso o composto de interesse esteja efetivamente incorporado na microcápsula. Caso o composto esteja na parte externa das microcápsulas, bandas características podem ser visualizadas. As microcápsulas de eugenol em carragena, proteínas do farelo de arroz e albumina sérica bovina (ensaio 6) foram analisadas e constatou-se a ausência de bandas de absorção de eugenol, sugerindo a eficiência do processo de encapsulação (Figura 4). Para comprovar como seria a presença de eugenol na parte externa foi adicionada a amostra a quantidade de 50%<sub>m/m</sub> de eugenol para visualizar sua presença na parte externa e consequente aparecimento de bandas de absorção.

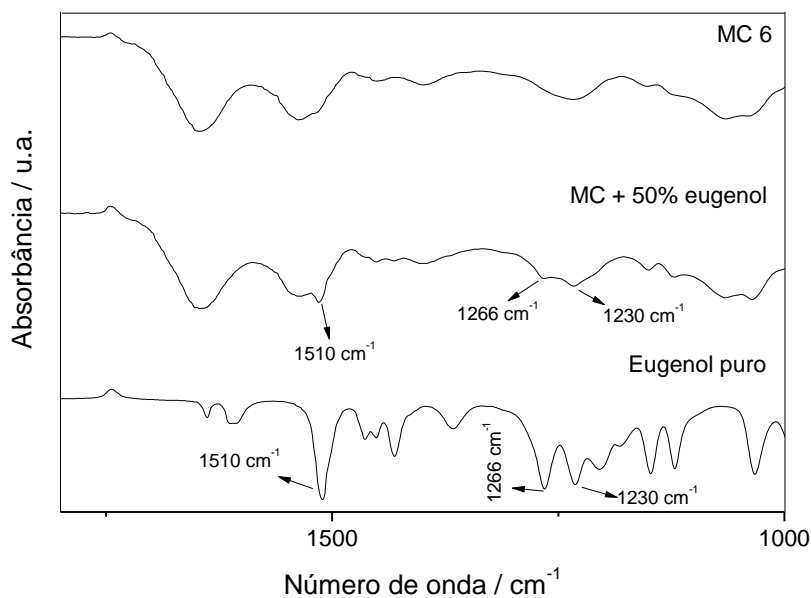


Figura 4. Espectros FTIR do eugenol puro, microcápsulas do ensaio 6 com adição de 50%<sub>m/m</sub> de eugenol (MC + 50%<sub>m/m</sub>) e microcápsulas do ensaio 6 sem adição de eugenol (MC 6).

Conforme pode ser observado na Figura 4, os espectros do eugenol puro apresentaram bandas de absorção na região entre 1510 cm<sup>-1</sup>, 1266 cm<sup>-1</sup> e 1230 cm<sup>-1</sup> correspondentes, respectivamente, a deformação axial de C=C do anel aromático, deformação angular no plano de O-H e deformação axial de C-O (SILVERSTEIN; WBESTER, 2012). Dhoot et al. (2009) e Woranuch e Yoksan (2013) também analisaram eugenol por espectroscopia de infravermelho, sendo reportadas bandas de absorção similares às identificadas no presente estudo. Estas mesmas bandas podem ser visualizadas na amostra de microcápsulas com adição de eugenol (MC6 +50%<sub>m/m</sub>) e não são visualizadas na amostra de microcápsulas de eugenol (ensaio 6), sugerindo a eficiência de encapsulação.

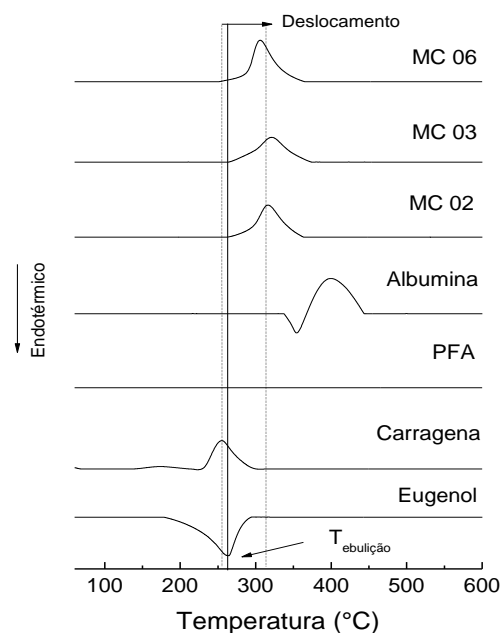
### 3.7 CALORIMETRIA DIFERENCIAL DE VARREDURA (DSC), ANÁLISE TERMOGRAVIMÉTRICA (TGA) E ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR) ACOPLADOS

Quando o conteúdo total de eugenol não é completamente encapsulado, parte deste conteúdo fica no exterior das microcápsulas ou aderido à superfície. Assim, devido à instabilidade do eugenol e sua alta volatilidade, este conteúdo de eugenol não encapsulado pode ser degradado e não ser visualizado por espectroscopia de infravermelho após determinado tempo de armazenamento das microcápsulas. Portanto, com o intuito de comprovar que o eugenol presente nas microcápsulas encontrava-se realmente microencapsulado e presente na parte interna das microcápsulas foi realizada a análise de espectroscopia de infravermelho (FTIR) acoplada ao DSC, sendo registrados os espectros de FTIR, termogramas e as análises termogravimétricas durante o aquecimento.

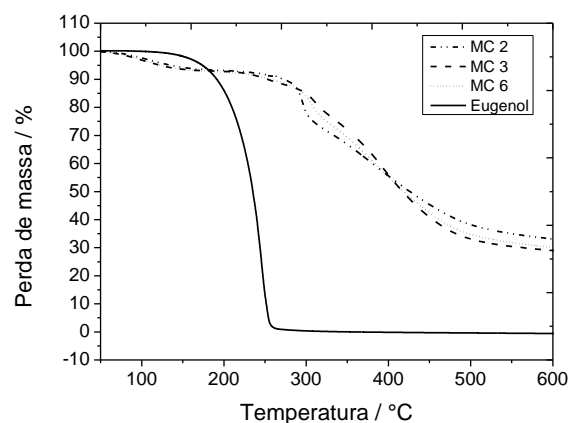
Para determinar os espectros de infravermelho as amostras foram submetidas ao aquecimento em DSC a uma taxa de  $100\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ . Essa taxa de aquecimento, considerada elevada, foi aplicada com o intuito de registrar a saída do eugenol das microcápsulas. Devido a sua volatilidade, o aumento da temperatura e consequente rompimento das microcápsulas possibilitou o registro do aparecimento de bandas de absorção características do eugenol, comprovando a sua presença nas microcápsulas. Taxas de aquecimento inferiores foram testadas contudo, houve dificuldade de detectar as bandas de absorção características do eugenol.

Os termogramas das microcápsulas de eugenol e os materiais puros são apresentados na Figura 5 (a) e a perda de massa das microcápsulas e de eugenol puro são apresentadas na Figura 5 (b). Um pico endotérmico pode ser observado no termograma do eugenol à temperatura de  $262\text{ }^{\circ}\text{C}$ , sugerindo corresponder ao seu ponto de ebulição. Este comportamento foi similar ao reportado por Hill et al. (2013), onde o eugenol apresentou pico endotérmico a temperatura de  $260\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Seo et al. (2010) reportaram a presença de um pico endotérmico para o eugenol na temperatura de  $249\text{ }^{\circ}\text{C}$ , enquanto que Choi et al. (2009) observaram o mesmo à temperatura de  $282\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

A carragena apresentou um pico exotérmico na temperatura de 254 °C, similar ao observado por Tanaka et al. (2001), na temperatura de 250 °C. Assim como observado para a carragena, as microcápsulas contendo eugenol exibiram um pico exotérmico, contudo nas temperaturas de 306 °C, 317 °C e 322 °C, respectivamente, para os ensaios 6, 3 e 2. Este deslocamento do pico exotérmico, característico da carragena, sugere a interação entre o material de parede, bem como com o eugenol. Além disso, não foi observada nos termogramas das microcápsulas a presença de pico endotérmico característico do eugenol, sugerindo que o mesmo encontra-se eficientemente encapsulado nas microcápsulas. Em um estudo desenvolvido por Nuchuchua et al. (2009) em que eugenol foi microencapsulado em diferentes tipos de ciclodextrina a ausência do aparecimento do pico endotérmico de ebulição de eugenol também foi reportado como indicativo de encapsulação.



(a)



(b)

Figura 5 - Termograma (a) das amostras das microcápsulas (MC) dos ensaios 06, 03 e 02 e dos materiais puros albumina sérica bovina, proteína do farelo de arroz (PFA), carragena e eugenol e análise termogravimétrica (b) das micropartículas (MC) dos ensaios 2, 3 e 6 e do eugenol puro.

A perda de massa do eugenol iniciou em aproximadamente 120 °C e com término em 262 °C (Figura 5 (b)). As microcápsulas de eugenol apresentaram temperaturas de degradação superiores às observadas para o eugenol puro, onde para as microcápsulas com carragena e proteína do farelo de arroz (MC 2) observou-se uma perda de massa de 10 % a 284 °C, enquanto que as demais (MC 3 e MC 6) essa mesma perda de massa ocorreu a 322 °C. Isso sugere uma maior estabilidade térmica para as microcápsulas produzidas com a combinação de proteína de farelo de arroz e albumina sérica bovina com carragena (MC 6) e de albumina sérica bovina com carragena (MC 3).

Os espectros FTIR das microcápsulas de eugenol (ensaio 2, 3 e 6) e do eugenol puro são apresentados, respectivamente, nas Figuras 6, 7, 8 e 9. Nos espectros dos ensaios 2, 3 e 6 podem ser visualizadas bandas de absorção acentuadas, características do eugenol, nas regiões de 1513, 1269 e 1231  $\text{cm}^{-1}$  conforme relatado anteriormente, além da banda em 3566  $\text{cm}^{-1}$  que correspondente à vibração de deformação axial de OH (Silverstein, Webster, 2012), apresentando intensidade aumentada com o aumento da temperatura, o que caracteriza a liberação de eugenol ao longo do tempo de aquecimento. Na Figura 9 (eugenol puro) estes picos são mais acentuados, em virtude da ausência de outros materiais interferentes.

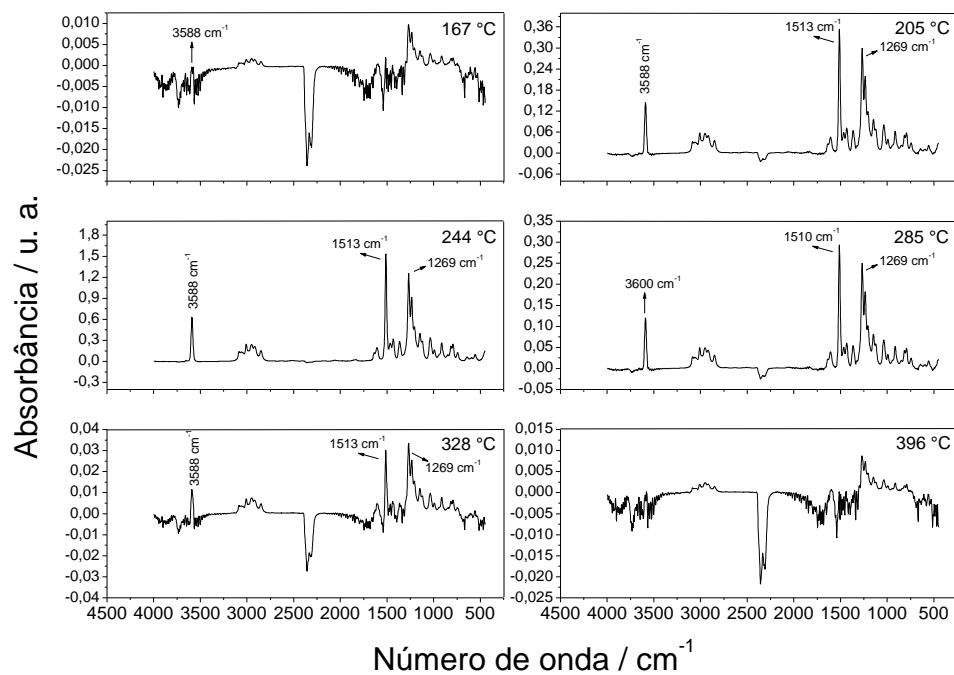


Figura 6 - Espectros de infravermelho (FTIR-UATR) de eugenol microencapsulado em carragena e proteína do farelo de arroz (ensaio 2) determinados em diferentes temperaturas durante aquecimento em DSC.

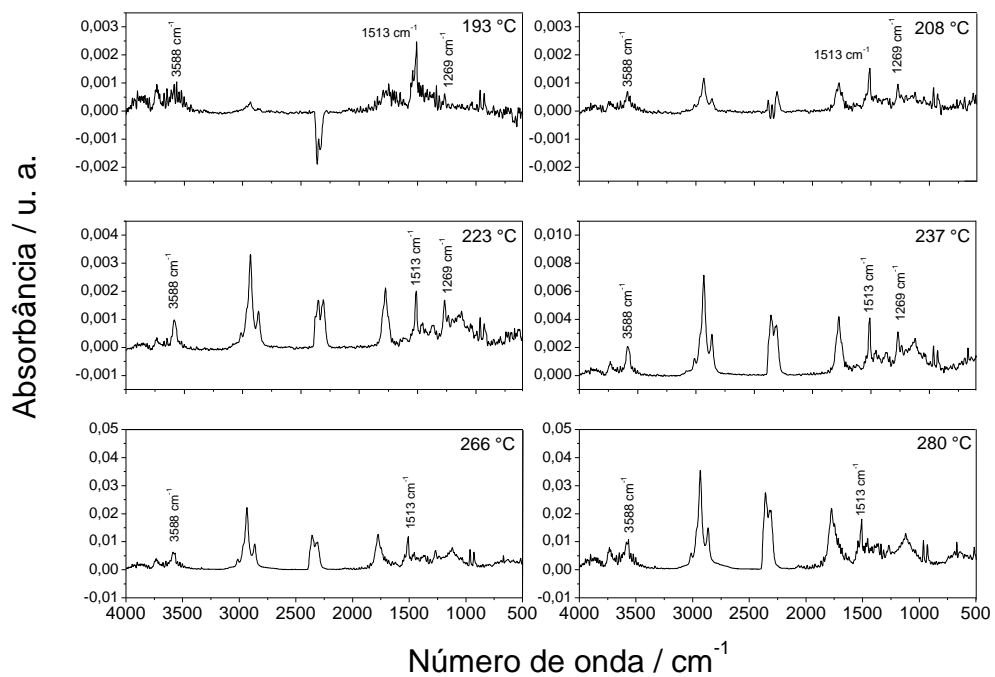


Figura 7 - Espectros de infravermelho (FTIR-UATR) de eugenol microencapsulado em carragena e albumina sérica bovina (ensaio 3) determinados em diferentes temperaturas durante aquecimento em DSC.



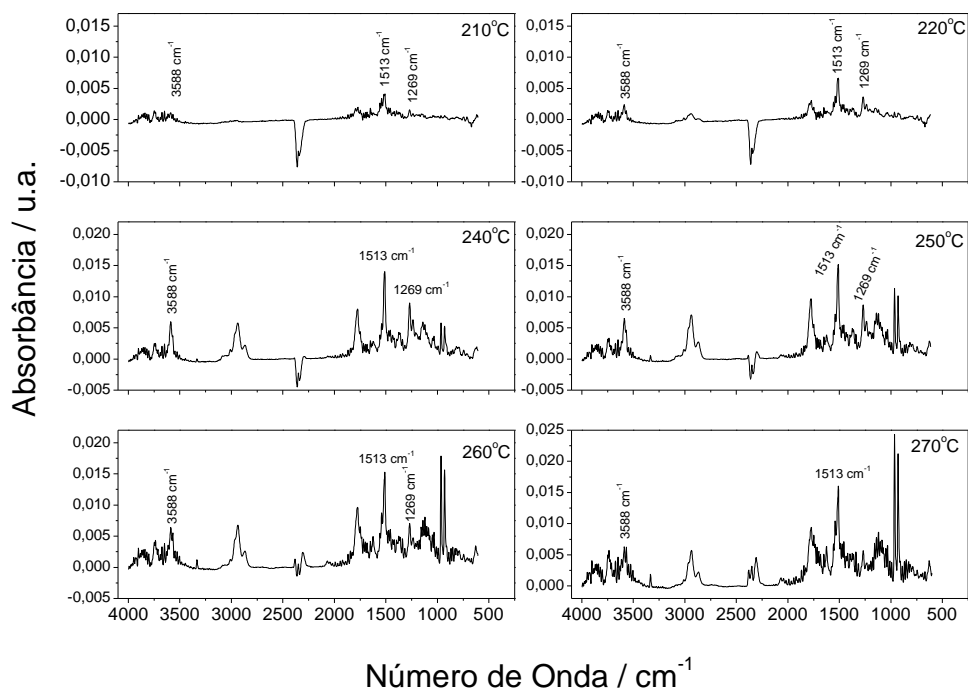


Figura 8 - Espectros de infravermelho (FTIR-UATR) de eugenol microencapsulado em carragena, proteína do farelo de arroz e albumina sérica bovina (ensaio 6) determinados em diferentes temperaturas durante aquecimento em DSC.

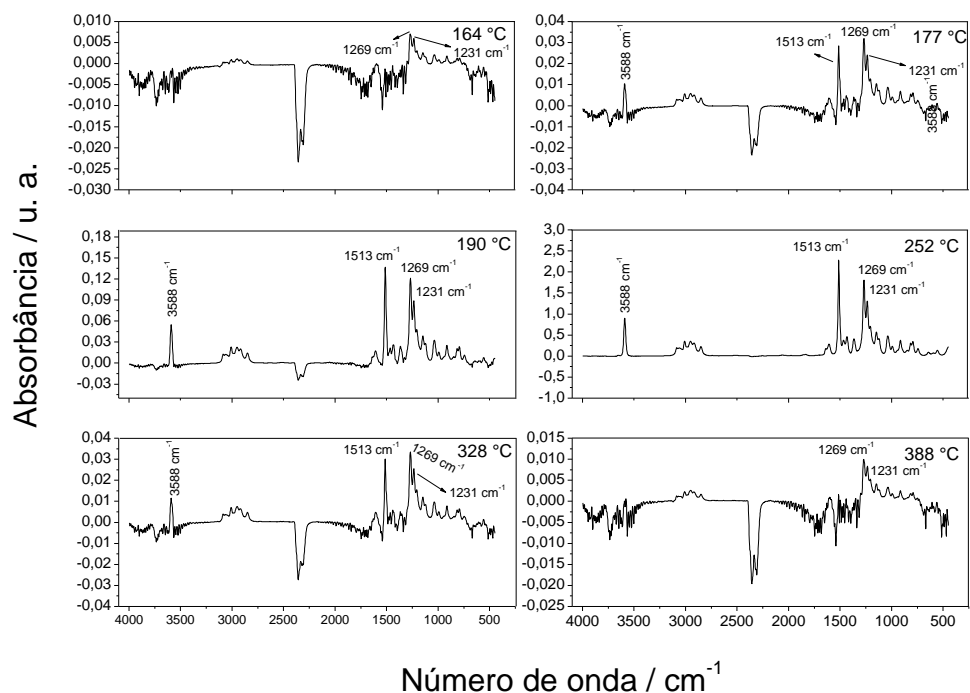


Figura 9 - Espectros de infravermelho (FTIR-UATR) de eugenol puro determinados em diferentes temperaturas durante aquecimento em DSC.

No eugenol puro, as bandas de absorção características são detectadas a partir de 164 °C, enquanto que para os ensaios 2, 3 e 6 as temperaturas de detecção das bandas são, respectivamente, 167, 193 e 201 °C. Esses resultados demonstram o aumento da estabilidade ao eugenol microencapsulado em comparação ao eugenol puro. Cabe ressaltar que a temperatura de aparecimento das bandas de absorção de eugenol no ensaio 6 (carragena com proteína do farelo de arroz e albumina sérica bovina) foi a mais elevada, indicando a microcápsula de maior estabilidade, dentre as produzidas, corroborando com os resultados obtidos para eficiência de encapsulação e morfologia.

## 4 CONCLUSÃO

No processo de microencapsulação de eugenol por atomização, o uso da carragena em combinação com a proteína de farelo de arroz ou com a albumina sérica bovina permitiram resultados superiores de RE (%) do que quando combinada à proteína de soro de leite com baixo teor de lactose ou em combinações binárias e ternárias com estes agentes encapsulantes. E ainda, a carragena com a combinação binária com a proteína de farelo de arroz e a albumina sérica bovina proporcionou um valor médio superior de EE (%) e morfologia esférica e sem rachaduras, indicando que estes agentes encapsulantes foram eficientes para a formação do material de parede, possibilitando maior efeito de proteção do eugenol. As análises térmicas e de FTIR corroboraram para confirmar os dados de EE (%) e uma possível interação entre os agentes encapsulantes (carragena, proteína de farelo de arroz e albumina sérica bovina) e o eugenol, indicando que os mesmos combinados com carragena são materiais de parede viáveis para a obtenção de microcápsulas de eugenol.

## REFERÊNCIAS

ABAUL, J.; BOURGEOIS, P.; BESSIERE, J. M. Chemical Composition of the Essential oils of Chemotypes of *Pimenta racemosa* var. *racemosa* (P. Miller) J. W. Moore ( Bois d'Inde) of Guadeloupe (F. W. I.). *Flavour and Fragrance Journal*, v. 10, p. 319–321, 1995.

AGBOOLA, S.; NG, D.; MILLS, D. Characterisation and functional properties of Australian rice protein isolates. *Journal of Cereal Science*, v. 41, p. 283–290, 2005.

AHN, J.-H.; KIM, Y.-P.; LEE, Y.-M.; SEO, E.-M.; LEE, K.-W.; KIM, H.-S. Optimization of microencapsulation of seed oil by response surface methodology. *Food Chemistry*, v. 107, p. 98-105, 2008.

BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, B.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils – a review. *Food and Chemical Toxicology*, v. 46, 446-475, 2008.

BARANAUSKIENE, R.; VENSKUTONIS, P. R.; DEWETTINCK, K.; VERHE, R.; Properties of oregano (*Origanum vulgare* L.), citronella (*Cymbopogon nardus* G.) and marjoram (*Majorana hortensis* L.) flavors encapsulated into milk protein-based matrices. *Food Research International*, v. 39, p. 413–425, 2005

BAUER, A. K.; DWYER-NIELD, L. D.; HANKIN, J. A.; MURPHY, R. C.; MALKINSON, A. M. The lung tumor promoter, butylated hydroxy toluene (BHT), causes chronic inflammation in promotion-resistant C57BL/6 mice. *Toxicology*, v. 169, p. 1-15, 2001.

BHUIYAN, M. N. I. Constituents of essential oil from leaves and buds of clove (*Syzygium caryophyllatum* (L.) Alston). *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, v. 6, p. 1260 -1263, 2012.

BOTREL, A. D.; BORGES, V. S.; FERNANDES, R. B. V. R.; VIANA, D. A.; COSTA, G. M. J.; MARQUES, R. G. Evaluation of spray drying conditions on properties of microencapsulated oregano essential oil. *International Journal of Food Science and Technology*, v. 47, p. 2289-2296, 2012.

CANO-HIGUITA, D. M.; VELEZ, H. A. V.; TELIS, V. R. N. Microencapsulation of turmeric oleoresin in binary and ternary blends of gum arabic, Maltodextrin and modified starch. *Ciência e Agrotecnologia*, v. 39, n. 2, p. 173-182, 2015.

CASTILLO, S.; PÉREZ-ALFONSO, C. O.; MARTÍNEZ-ROMERO, D.; GUILLÉN, F.; SERRANO, M.; VALERO, D. The essential oils thymol and carvacrol applied in the packing lines avoid lemon spoilage and maintain quality during storage. *Food Control*, v. 35, p. 132-136, 2014.

CASTRO, I. A., SILVA, R. S. F., TIRAPEGUI, J., BORSATO, D., BONA, E. Simultaneous optimization of response variables in protein mixture formulation: constrained simplex method approach. *International Journal of Food Science and Technology*, v. 38, p. 103–110, 2003.

CHATTERJEE, D.; BHATTACHARJEE, P. Comparative evaluation of the antioxidant efficacy of encapsulated and un-encapsulated eugenol-rich clove extracts in soybean oil: Shelf-life and frying stability of soybean oil. *Journal of Food Engineering*, v. 117, p. 545-550, 2013.

CHAMI, N.; BENNIS, S.; ABOUSSEKHRA, A.; REMMAL, A. Study of anticandidal activity of carvacol and eugenol in vitro and in vivo. *Oral Microbiology Immunology*, v. 20, p. 106 -111, 2005.

CHEN, H.; ZHANG, Y.; Q. ZHONG. Physical and antimicrobial properties of spray-dried zein–casein nanocapsules with co-encapsulated eugenol and thymol. *Journal of Food Engineering*, v. 144, n. 93-102, 2015.

CHANDI, G. K.; SOGI, D. S. Functional properties of rice bran protein concentrates. *Journal of Food Engineering*, v. 79, p. 592–597, 2007

CHOI, M.-J.; SOOTTITANTAWAT, A.; NUCHUCHUA, O.; MIN, S.-G; RUKTANONCHAI, U. Physical and light oxidative properties of eugenol encapsulated by molecular inclusion and emulsion diffusion method. *Food Research International*, v. 42, p. 148-156, 2009.

COSTA, J. M. G.; BORGES, S. V.; HIJO, A. A. C. T.; SILVA, E. K.; MARQUES, G. R.; CIRILLO, M. A.; AZEVEDO, V. M.; Matrix structure selection in the microparticles os essential oil oregano produced by dryer. *Journal of Microencapsulation*, p. 1464- 5246, 2013.

DEVI, K. P.; NISHA, A. S.; SAKTHIVEL, R.; PANDIAN, K. S.; Eugenol (an essential oil of clove) acts as an antibacterial agent against *Salmonella typhi* by disrupting the cellular membrane. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 130, p. 107–115, 2010.

DHOOT, G.; AURAS, R.; RUBINO, M.; DOLAN, K.; SOTO-VALDEZ, H.; Determination of eugenol diffusion through LLDPE using FTIR – ATR flow cell and HPLC techniques. *Polymer*, v. 50, p. 1470-1482, 2009.

DUBEY, R.; SHAMI, T. C.; BASHKER RAO, K. U. Microencapsulation technology and applications. *Defence Science Journal*, v. 59, n. 1, p. 82-95, 2009.

FABIAN, C.B., HUYNH, L.H., JU, Y.H. 2010. Precipitation of rice bran protein using carrageenan and alginate. *Food Science and Technology*, v.43, p. 375–379, 2010.

FERNANDES; R. V. B; BORGES, S. V.; BOTREL, D. A. Gum arabic/starch/maltodextrin/inulin as wall materials on the microencapsulation of rosemary essential oil. *Carbohydrate Polymers*, v. 101, p. 524-532, 2014.

FRITZEN-FREIRE; C. B.; PRUDÊNCIO, E. S.; AMBONI, R. D. M. C. PINTO, S. S.; NEGRÃO-MURAKAMI, A. B.; MURAKAMI, F. S. Microencapsulation of *bifidobacteria* by spray drying in the presence of prebiotics. *Food Research International*, v. 45, n.1, p. 306-312, 2012.

FUCHS, M.; TURCHIULI, C.; BOHIN M.; CUVELIER M. E.; ORDONNAUD, C.; PEYRAT-MAILLARD, M. N.; DUMOULIN, E. Encapsulation of oil in powder using spray drying and fluidised bed agglomeration. *Journal of Food Engineering*, v. 75, n. 1, p. 27-35, 2006.

GARCÍA-GARCÍA, R.; LÓPEZ-MALO, A.; PALOU, E. Bactericidal action of binary and ternary mixtures of carvacrol, thymol, and eugenol against *Listeria innocua*. *Journal of Food Science*, v. 76, n. 2, 2011.

GAYOSO, C. W.; LIMA, E. O.; OLIVERIRA, V. T.; PEREIRA, F. O.; SOUZA, E. L.; LIMA, I. O., NAVARRO, D. F. Sensitivity of fungi isolated from onychomycosis to *Eugenia caryophyllata* essential oil and eugenol. *Fitoterapia*, v.76, p. 247–249, 2005.

GIRALDI, C.; RODRIGUES, A. C.; CÂNDIDO, L. M. B. Hidrólise da lactose e secagem por atomização de concentrado proteico de soro de leite. IV SIMALI - Simpósio de Alimentos e ISQUIM - 1º Semana Acadêmica de Química. UTFPR- Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Medianeira, 2014.

GUPTA, S.; CHANDI, G. K.; SOGI, D. S. Effect of extraction temperature on functional properties of rice bran protein concentrates. *International Journal of Food Engineering*, v. 4, 2008.

JOHNY, A. K.; DARRE, M. J.; DONOGHUE, A. M.; DONOGHUE, D. J.; VENKITANARAYANAN, K. Antibacterial effect of trans-cinnamaldehyde, eugenol, carvacrol, and thymol on *Salmonella enteritidis* and *Campylobacter jejuni* in chicken cecal contents in vitro. *The Journal of Applied Poultry Research*, v. 19, p. 237-244, 2010.

HAMADA, J. S. Characterization and functional properties of rice bran proteins modified by commercial exoprotease and endoproteases. *Food Chemistry and Toxicology*, v. 65, p. 305 – 310, 2000.

HAN, S.-W.; JEONG, H.-C.; KIM, H.-K.; LEE, D.-Y.; PARK, H.-H.; PARK, H.-J.; SONG, S.-H. A method for preparing protein concentrate from rice bran. KR PAT. EP 2061339 A1, 2009.

HARE, L. B. Mixture design applied to food formulation: a review. *Food Technology*, p. 50-55, 1974

HARAGUCHI, F. K.; ABREU, W. C.; PAULA, H. Proteínas do soro do leite: composição, propriedades nutricionais, aplicações no esporte e benefícios para a saúde humana. *Revista de Nutrição*, v. 19, p. 479-488, 2006.

HILL, L. E.; LEE, G.; GOMES, C.; TAYLOR, T. M.; Characterization of beta-cyclodextrin inclusion complexes containing essential oils (trans-cinnamaldehyde, eugenol, cinnamon bark, and clove bud extracts) for antimicrobial delivery applications. *Food Science and Technology*, v. 51, p. 86- 93, 2013.

LEE, S. J.; ROSENBERG, M. Preparation and of glutaraldehyde cross-linked whey protein-based microcapsules containing theophylline. *Journal of Controlled Release*, v. 61, p. 123-136, 1999.

LIOLIOS, C. C.; GORTZI, O.; LALAS, S.; TSAKNIS, J.; CHINO, I. Liposomal incorporation of carvacrol and thymol isolated from the essential oil of *Origanum dictamnus* L. and in vitro antimicrobial activity. *Food Chemistry*, v. 112, p. 77-84, 2009.

LIU, K.; XU, Y.; WANG, X. Microencapsulation of sweet orange oil terpenes using the orifice method. *Journal Food Engineering*, v. 110, p. 390-394, 2012.

NUCHUCHUA, O.; SAESOO, S.; SRAMALA, I.; PUTTIPIATKHACHORN, S.; SOOTTITANTAWAT, A.; RUKTANONCHAI, U. Physicochemical investigation and molecular modeling of cyclodextrin complexation mechanism with eugenol. *Food Research International*. v.42, 1178–85, 2009.

OGATA, M.; HOSHI, M.; URANO, S.; ENDO, T.; 2000. Antioxidant activity of eugenol and related monomeric and dimeric compounds. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, v.48, p. 1467–1469, 2000.

PAN, K.; CHEN, H.; DAVIDSON, P. M.; ZHONG, Q. Thymol nanoencapsulated by sodium caseinate: Physical and antilisterial properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 62, p. 1649-1657, 2014.

PRATA, A. S; SGARBIERI, V. C.; Obtention, chemical and nutritional characterization in vitro of bovine sérum proteins. *Food Science and Technology*, v. 5, 2005.

RAUSCHER, M. F; SANDERS, A. R; JOHN B. WATKINS, B. J. Effects of isoeugenol on oxidative stress pathways in normal and streptozotocin-induced diabetic rats. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, v. 15, p. 159-164, 2001.

REINECCIUS, G. A. Carbohydrates for flavor encapsulation. *Food Technology*, v. 45, p. 144-147, 1991.

SHIMADA, K.; CHEFTEL, J. C. Texture characteristics, protein solubility and sulphhydryl group/disulfide bond contents of heat-induced gels of whey protein. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 36, p. 1018-1025, 1988.

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, p. 322-326, 2005.

SEO, E. J.; MIN, S. G.; CHOI, M. J. Release characteristics of freeze-dried eugenol encapsulated with  $\beta$ -cyclodextrin by molecular inclusion method. *Journal of Microencapsulation*, v. 27, p. 496- 505, 2010.

SCHEFFE´ H. The simplex-centroide design for experiments with mixtures. *Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological)*, v. 25, p. 235–263, 1963.

SILVERSTEIN, R. M.; WBESTER, F. X. Identificação espectrométrica de compostos orgânico. 7.ed. Rio de Janeiro: LTC, 2012.490 p.



TANAKA, T.; LU, T.; YUASA, S.; YAMAURA, K. Structure and properties of poly(vinyl alcohol)/κ-carrageenan blends. *Polymer International*, v.50, p.1103-1108, 2001.

TRCKOVÁ, J.; STETINA, J. KÁNSKÚ, J. Influence of protein concentration on rheological properties of carrageenan gels in milk. *International Dairy Journal*, n. 6, p. 137-146, 2003.

WANG, M.; HETTIARACHCHY, N. S.; QI, M., BURKS, W.; SIEBENMORGEN, T. Preparation and functional properties of rice bran protein isolate. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, v.47, p.411–416, 1999.

WANG, Yu.; LU, Z.; FV, F.; BIE, X. Study on microencapsulation of curcumin pigments by spray drying. *European Food Research and Technology*, v. 229, p. 391-396, 2009.

WORANUCH, S.; YOKSAN, R. Eugenol-loaded chitosan nanoparticles: I. Thermal stability improvement of eugenol through encapsulation. *Carbohydrate polymers*, v. 96, n. 2, p.578–85, 2013.

ZHANG, R., KULKARNI, K. A & KULKARNI, A P. Oxidation of eugenol by purified human term placental peroxidase. *Placenta*, V.21(2-3), p.234–40.2000.

ZBICINSKI, I; DELAG, A.; STRUMILLO, C.; ADAMIEC, J. Advanced experimental analysis of drying kinetics in spray drying. *Chemical Engineering Journal*, v. 86, p. 207-216, 2002.

## 6 CONCLUSÕES GERAIS

Foi possível, pelo DCCR, selecionar as condições operacionais do atomizador (temperatura e vazão de alimentação) para a maior EE (%), de eugenol utilizando somente carragena como material de parede, condições estas que não influenciaram significativamente na RE (%) ( $p > 0,05$ ).

O planejamento *simplex-centroid* possibilitou avaliar o efeito da combinação da carragena com proteínas do soro do leite com baixo teor de lactose, do farelo de arroz e da albumina sérica bovina como agentes encapsulantes.

A maior RE (%) foi obtida quando a carragena foi combinada à proteína de farelo de arroz ou à albumina sérica bovina, indicando que suspensões mais estáveis foram obtidas. Contudo, a combinação da carragena com a mistura binária de proteína de farelo de arroz e albumina sérica bovina resultou em valores médios superiores para a EE (%), além de microcápsulas com superfícies esféricas e ausência de rachaduras, características que conferem as mesmas uma maior retenção e proteção das substâncias voláteis, corroborando com os resultados obtidos para EE (%).

As análises térmicas e de FTIR, confirmam a EE (%) e indicaram possível interação entre os agentes encapsulantes e o eugenol.

A proteína do farelo de arroz, que ainda não havia sido explorada como agente encapsulante, mostrou-se viável para ser empregada como material de parede.