



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO

DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DO CONSUMO



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE  
ALIMENTOS

**MICROPARTÍCULAS DE EUGENOL POR GELIFICAÇÃO IÔNICA: AÇÃO  
ANTIMICROBIANA**

MERIELLY SAELI DE SANTANA

RECIFE

2020

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO  
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DO CONSUMO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE  
ALIMENTOS

MERIELLY SAELI DE SANTANA

**MICROPARTÍCULAS DE EUGENOL POR GELIFICAÇÃO IÔNICA: AÇÃO  
ANTIMICROBIANA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como requisito para obtenção do Grau de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

ORIENTADOR/A: Erilane Castro de Lima Machado

CO-ORIENTADOR/A: Francisco Humberto Xavier Júnior

CO-ORIENTADOR/A: Mariane Cajubá de Brito Lira Nogueira

RECIFE

2020

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO  
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DOMÉSTICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE  
ALIMENTOS

**MICROPARTÍCULAS DE EUGENOL POR GELIFICAÇÃO IÔNICA: AÇÃO  
ANTIMICROBIANA**

Por Merielly Saeli de Santana

Esta dissertação foi julgada para obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos e aprovada em 03/03/2020 pelo Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos em sua forma final.

Banca Examinadora:

---

Prof Dr<sup>a</sup> Celiane Gomes Maia da Silva  
Universidade Federal Rural de Pernambuco

---

Prof Dr<sup>a</sup> Andreлина Maria Pinheiro dos Santos  
Universidade Federal Rural de Pernambuco

---

Prof Dr<sup>a</sup> Isabella Macário Ferro Cavalcanti  
Universidade Federal de Pernambuco (CAV/UFPE)

## **DEDICATÓRIA**

Aos meus pais, que sempre me apoiaram e lutaram por mim. A conquista dessa etapa se deve à força que vocês me dão para vencer.

## AGRADECIMENTOS

O desempenho desta etapa e a elaboração deste trabalho não seriam possíveis sem o apoio de algumas pessoas. Assim, pretendo agradecer a todos que contribuíram para a finalização desta fase em minha formação. Desta forma, agradeço:

À Deus, por se fazer presente em minha vida e me conceder bênçãos, em especial a de me permitir concluir esta etapa em minha vida acadêmica e profissional. Sou grata ainda por ter me proporcionado viver este momento na presença de pessoas sabiamente escolhidas por Ele, as quais pude criar laços de amizade e compartilhar conhecimentos pessoais e acadêmicos. *Em tudo dai graças a Deus, porque esta é a vontade de Deus em Cristo Jesus para convosco* (I Tes 5:18).

Aos meus pais, Elias e Rosimere, por todo amor, dedicação, apoio e ensinamentos. Vocês são tudo para mim e sempre busco enchê-los de orgulho por tudo que fizeram e fazem por mim. Aos meus irmãos, William e Juninho por todo amor, amizade e cumplicidade. Ao meu namorado, Wallace Dias, por todo amor, apoio, compreensão e motivação. *There's nothing in this world I wouldn't do for you!* Aos meus demais familiares e amigos, por todo o carinho. Em especial, aos meus avós Maria Lourenço e José Antônio, que sempre oraram por mim e hoje o fazem do céu, como dois anjos.

A minha orientadora, Prof<sup>a</sup> Eriane Castro por todas as contribuições, conhecimentos e auxílios. Aos professores e colaboradores, Mariane, Humberto, Michelle, Sílvio e Dayane, pelo apoio que tornaram possível a realização deste trabalho.

A Universidade Federal Rural de Pernambuco e ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos pela possibilidade de realizar o mestrado.

A CAPES pela concessão da bolsa de pesquisa.

A todos que me auxiliaram direta ou indiretamente para que eu finalizasse esta etapa em minha vida.

Obrigada a todos!

## RESUMO

A contaminação microbiológica pode tornar o alimento susceptível a deterioração e ser veículo de doenças, o que pode ser contornado pela aplicação de antimicrobianos. O uso de antimicrobianos sintéticos em alimentos alerta para os efeitos negativos à saúde da população, indicando a necessidade de alternativas para a sua substituição pelos naturais, como o eugenol. No entanto a sua aplicação em alimentos é limitada devido ao seu odor e sensibilidade às condições ambientais. Desta forma, o processo de microencapsulação além de controlar o odor, promove maior proteção ao composto. A combinação desta técnica com o processo de recobrimento proteico permite a obtenção de micropartículas com melhores características protetivas. Assim, o presente estudo teve como objetivo avaliar o potencial antibacteriano do eugenol microencapsulado, usando a técnica de gelificação iônica utilizando alginato de sódio como material de parede, em associação ao emulsificante Tween 80, e recobrimento com proteína do soro do leite isolada. O recobrimento proteico foi avaliado de forma qualitativa e quantitativa para determinar a sua eficiência. A quantificação dos compostos fenólicos foi realizada para avaliar a eficiência da encapsulação do eugenol. As micropartículas foram caracterizadas através das técnicas de microscopia óptica (MO), microscopia eletrônica de varredura (MEV) e espalhamento dinâmico de luz (DLS) que determinou o tamanho médio, índice de polidispersão e potencial zeta. A atividade antimicrobiana *in vitro* do eugenol foi determinada em concentrações equivalentes para a sua forma livre e microencapsulada por meio das técnicas de concentração inibitória mínima frente às espécies contaminantes de alimentos: *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes*. A eficiência qualitativa do recobrimento proteico obteve resultado satisfatório devido a coloração azul das micropartículas quando utilizado o corante específico para proteínas (Coomassie Brillante Blue). O percentual de 16% de adsorção proteica permitiu uma eficiência quantitativa baixa. A MO permitiu observar micropartículas uniformes com formato esférico, assim como através da MEV foi possível perceber a diminuição da rugosidade das micropartículas após o processo de recobrimento proteico. O tamanho obtido foi de  $1,33 \pm 0,5 \mu\text{m}$ , favorável a aplicação em alimentos, e seu índice de polidispersão (0,32) evidencia a uniformidade deste tamanho. O potencial zeta se manteve negativo após a adsorção proteica. A atividade antimicrobiana *in vitro* frente aos microrganismos testados se mostrou eficaz de acordo com os menores crescimentos microbianos encontrados. Desta forma, foi possível desenvolver um sistema de micropartícula com cobertura com efeito antibacteriano.

**PALAVRAS-CHAVE:** Óleo essencial. Fitoquímico. Proteína do soro lácteo.

Alginato de sódio. Conservação. Alimentos.

## ABSTRACT

Microbiological contamination can make food susceptible to deterioration and be a vehicle for disease, which can be circumvented by the application of antimicrobials. The use of synthetic antimicrobials in foods warns of the negative health effects of the population, indicating the need for alternatives to replace them with natural ones, such as eugenol. However, its application in food is limited due to its odor and sensitivity to environmental conditions. Thus, the microencapsulation process, in addition to controlling the odor, promotes greater protection to the compound. The combination of this technique with the protein coating process allows obtaining microparticles with better protective characteristics. Thus, the present study aimed to evaluate the antibacterial potential of microencapsulated eugenol, using the technique of ionic gelation using sodium alginate as a wall material, in association with the emulsifier Tween 80, and coating with isolated whey protein. Protein coating was evaluated qualitatively and quantitatively to determine its efficiency. The quantification of phenolic compounds was performed to evaluate the efficiency of eugenol encapsulation. The microparticles were characterized by the techniques of optical microscopy (OM), scanning electron microscopy (SEM) and dynamic light scattering (DLS) that determined the average size, polydispersity index and zeta potential. The *in vitro* antimicrobial activity of eugenol was determined in concentrations equivalent to its free and microencapsulated form using the techniques of minimum inhibitory concentration and minimum bactericidal concentration against contaminating food species: *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*. The qualitative efficiency of the protein coating obtained a satisfactory result due to the blue color of the microparticles when the specific protein dye (Coomassie Brillante Blue) was used. The percentage of 16% protein adsorption allowed a low quantitative efficiency. The OM allowed to observe uniform microparticles with spherical shape, as well as through SEM it was possible to perceive the decrease of the microparticles' roughness after the protein coating process. The size obtained was  $1.33 \pm 0.5 \mu\text{m}$ , favorable to food applications, and its polydispersity index (0.32) shows the uniformity of this size. The zeta potential remained negative after protein adsorption. The *in vitro* antimicrobial activity against the tested microorganisms proved to be effective according to the smallest microbial growths found. In this way, it was possible to develop a microparticle system with coverage with an antibacterial effect.

**KEYWORDS:** Essential oil. Phytochemical. Whey protein. Sodium alginate. Conservation. Foods.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Tipos de micropartículas.....	20
<b>Figura 2.</b> Representação esquemática de um sistema de liberação controlada.....	22
<b>Figura 3.</b> Representação gráfica genérica dos perfis de liberação tardia e contínua.....	22
<b>Figura 4.</b> Fotos ilustrativas da árvore (a), folha (b), cravo-da-índia em flor (c) e cravo-da-índia seco (d).....	25
<b>Figura 5.</b> Estrutura química molecular do eugenol.....	26
<b>Figura 6.</b> Estrutura química molecular do alginato.....	28
<b>Figura 7.</b> Estruturas químicas de bloco G, bloco M e bloco alternado em alginato.....	29
<b>ARTIGO 1</b>	
<b>Figura 1.</b> Fluxograma das análises de eficiência de encapsulação das micropartículas.....	43
<b>Figura 2.</b> Determinação da Concentração Inibitória Mínima.....	46
<b>Figura 3.</b> Micrografias ópticas das micropartículas com recobrimento proteico (a) e sem recobrimento proteico (b) coradas com Coomassie Brilliant Blue.....	47
<b>Figura 4.</b> Micrografias ópticas das micropartículas de eugenol sem recobrimento proteico (a) e das micropartículas de eugenol com recobrimento proteico (b).....	50
<b>Figura 5.</b> Imagens obtidas por microscópio eletrônico de varredura das micropartículas de eugenol sem recobrimento proteico (a) e das micropartículas de eugenol com recobrimento proteico (b).....	51

## LISTA DE QUADROS

**Quadro 1.** Verificação de letalidade progressiva do extrato etanólico de cravo-da-índia diluído em solução fisiológica para via intraperitoneal em ratos.....27

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1.** Porcentagem dos componentes do óleo essencial do *Syzygium aromaticum*.....25

## ARTIGO 1

**Tabela 1.** Concentração inibitória mínima (CIM) em mg.mL<sup>-1</sup> do eugenol livre (OL), encapsulado sem cobertura (PS), encapsulado com cobertura (PC) e encapsulado vazio (PV).....58

## LISTA DE GRÁFICOS

<b>Gráfico 1:</b> Número de artigos publicados nos últimos anos, retirados da base de dados CAPES, palavra-chave “microencapsulation” – tipo de documento “artigo” – ano.....	20
-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

## **LISTA DE ABREVIações**

**BFS** – Botões florais secos

**CBM** – Concentração Bactericida Mínima

**CIM** – Concentração Inibitória Mínima

**CLSI** - Clinical And Laboratory Standards Institute

**DTA** – Doença Transmitida por Alimentos

**DTAs** – Doenças Transmitidas por Alimentos

**E. coli** – *Escherichia coli*

**EAEC** - *Escherichia coli enterro-agregativa*

**EE** – Eficiência de encapsulação

**Ex.** – Exemplo

**FF** – Folhas frescas

**FSE** – Folhas secas em estufa

**FSS** – Folhas secas ao sol

**GRAS** – Geralmente Conhecido como Seguro

**HWP** – Proteína do soro do leite hidrolisada

**IUPAC** – International Union of Pure and Applied Chemistry

**LIKA** - Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami

**MEV** – Microscopia Eletrônica de Varredura

**MO** – Microscopia óptica

**OEs** – Óleos essenciais

**Pen** – Pedúnculos

**TSB** – Tryptic Soy Broth

**UFPE/CAV** – Universidade Federal de Pernambuco / Centro Acadêmico de Vitória

**WPC** – Proteína do soro do leite concentrada

**WPI** – Proteína do soro do leite isolada

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	13
2. PROBLEMA DE PESQUISA E HIPÓTESE.....	16
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	17
3.1 Antimicrobianos naturais.....	17
3.2 Principais contaminantes de alimentos.....	18
3.3 Microencapsulação.....	20
3.3.1 Gelificação iônica.....	23
3.4 Eugenol.....	24
3.5 Materiais encapsulantes.....	27
3.5.1 Alginato de sódio.....	28
3.5.2 Proteína do soro do leite.....	30
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	33
ARTIGO 1.....	37
1. INTRODUÇÃO.....	39
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	40
2.1 Avaliação das condições e processamento do sistema.....	40
2.2 Preparação das amostras.....	40
2.2.1 Solução de alginato de sódio.....	40
2.2.2 Emulsão.....	40
2.2.3 Dispersão proteica.....	40
2.3 Preparação das micropartículas.....	41
2.4 Recobrimento das micropartículas.....	41
2.5 Eficiência do recobrimento proteico.....	41
2.6 Eficiência de encapsulação (EE %)......	42
2.7 Caracterização das micropartículas.....	43
2.7.1 Microscopia óptica (MO).....	43
2.7.2 Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	44
2.7.3 Tamanho de micropartícula, índice de polidispersão e potencial zeta.....	44
2.7.4 Atividade antimicrobiana.....	44
2.7.4.1 Concentração Inibitória Mínima (CIM).....	45
2.8 Análise estatística.....	47
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	47
3.1 Eficiência do recobrimento proteico.....	47
3.2 Eficiência de encapsulação.....	48
3.3 Caracterização das micropartículas.....	49
3.3.1 Tamanho médio.....	49
3.3.2 Morfologia.....	50
3.3.3 Potencial zeta.....	52
3.4 Atividade antimicrobiana.....	53
4. CONCLUSÃO.....	59
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	60

## 1 INTRODUÇÃO

A contaminação microbiológica pode causar a deterioração dos alimentos, além de tornar-se um risco para a saúde da população. Apesar do gradativo avanço quanto à fiscalização visando à segurança alimentar há o crescimento significativo das doenças transmitidas por alimentos (DTAs) a nível mundial decorrente da associação de diversos fatores, o que caracteriza a permanência destas patologias como problema de saúde pública (BRASIL, 2019).

Desta forma, visando os aspectos da segurança microbiológica e conservação dos alimentos têm sido utilizados os antimicrobianos naturais que derivam de origem animal, vegetal e microbiana. Dentre estas origens são destacados os antimicrobianos de origem vegetal. Nesta perspectiva, os óleos essenciais são considerados os antimicrobianos mais importantes presentes nas plantas e rotineiramente mais utilizados, além de apresentarem atividade antioxidante e anti-inflamatória (MAJEED et al., 2015; CASTRO-ROSA et al., 2017).

Desde a antiguidade são investigadas e utilizadas as propriedades antimicrobianas de óleos essenciais de extratos vegetal, especiarias e ervas. O alto teor de compostos fenólicos, como o eugenol, constituinte majoritário do óleo essencial de cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum* L.), são os principais responsáveis pela funcionalidade antimicrobiana, sendo o eugenol reconhecido pela sua efetividade *in vitro* na inibição de microrganismos causadores de doença, como por exemplo *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* (IRKIN e ESMER, 2015).

O eugenol é um óleo volátil tido como o componente dos óleos essenciais que melhor reduz a atividade bacteriana cujas suas propriedades já estão consolidadas pela literatura. Este composto fenólico tem mostrado atividade bactericida devido a sua capacidade inibir a respiração e divisão celular, onde a parede celular bacteriana é desnaturada pela presença do próton que causa lise bacteriana (TANGERINO, 2006).

Para a aplicação desses compostos em produtos alimentícios, é observada potencial expansão da produção de sistemas capazes de preservar compostos bioativos contra danos causados nos alimentos oriundos de diversos

fatores, como a contaminação microbiológica. Paralelamente, há a busca de sistemas que possibilitem a liberação controlada para aplicações em alimentos, fármacos e na agricultura (XIAO et al., 2014).

A microencapsulação pode ser definida como uma técnica que é capaz de proteger o material encapsulado de situações adversas que possam ocorrer no meio, como por exemplo, luz, umidade, oxigênio e interações com outros compostos. Este processo permite a estabilidade do produto, visto que é capaz de associar produtos incompatíveis (hidrofílicos e hidrofóbicos), preservar produtos voláteis, liberar de forma controlada o material encapsulado, proteger substância ou mascarar odores (HOLKEM et al., 2015).

A gelificação iônica é um processo de encapsulação simples que não requer o uso de solventes orgânicos nem de temperatura ou pH extremos, caracterizando um processo de baixo custo quando comparado com outras técnicas. Além de permitir encapsular substâncias hidrofílicas ou hidrofóbicas e o seu principal diferencial é a porosidade da matriz, a qual determina a liberação da substância encapsulada. A fim de melhorar as limitações do processo de gelificação iônica, pode-se modificar a estrutura do gel por meio da combinação de diferentes tipos de biopolímeros, garantindo assim o aproveitamento das vantagens da composição química de cada composto ou pela interação com polieletrólitos como proteínas (SILVA et al., 2014; BAKRY et al., 2016).

O soro do leite é um resíduo orgânico e devido a sua rica composição nutricional, pode acarretar graves problemas quando descartado incorretamente no meio ambiente. Com isso, as proteínas do soro do leite são desperdiçadas como resíduo quando poderiam ser aplicadas em diversas áreas e o seu aproveitamento é sugerido visando o enriquecimento de produtos e benefício para a saúde. Ao aproveitá-las como material para revestimentos comestíveis é possível obter a extensão da validade comercial e melhoria na qualidade nutricional dos alimentos (RIBEIRO-SANTOS et al., 2015).

Neste sentido, o recobrimento de micropartículas com proteína do soro do leite possibilita uma maior proteção do material ativo, visto que a elaboração das mesmas pela técnica de gelificação iônica externa com a aplicação de alginato como material de parede produz micropartículas porosas, e o recobrimento com

uma proteína pode permitir a obtenção de partículas mais protetivas. Além disso, a aplicação de proteína do soro isolada tem sido relatada por apresentar barreira eficaz contra a oxidação de óleos encapsulados (FUSTIER et al., 2015; SILVERIO et al., 2018).

Diante do exposto, o estudo pretende obter micropartículas de eugenol, encapsulado por alginato de sódio recoberto com proteína do soro do leite, realizar a caracterização físico-química das micropartículas e avalia-las quanto a sua eficácia na ação antimicrobiana frente à *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium*, *Listeria monocytogenes* e *Escherichia coli*.

## 2 PROBLEMA DE PESQUISA E HIPÓTESE

O eugenol é componente majoritário do óleo essencial de cravo-da-índia, o qual é geralmente conhecido como seguro (GRAS) pelo seu uso como aromatizante. Entretanto, seu uso como agente ativo antimicrobiana apresenta limitações de uso em alimentos principalmente pelos aspectos sensoriais como o odor. Além disso, o uso do eugenol em alimentos sofre alterações diante de situações adversas do ambiente, como por exemplo, a luz, umidade, oxigênio e interações com outros compostos. A microencapsulação do eugenol associada ao recobrimento com proteína do soro do lácteo permite reverter os problemas anteriormente citados, além de agregar valor nutricional ao alimento.

No entanto, algumas questões necessitam ser elucidadas, a saber: A encapsulação por gelificação iônica externa, em aparelho encapsulador, com revestimento proteico reduz os odores característicos do eugenol e propõe benefício para as características das micropartículas possibilitando o seu uso em produtos alimentícios? A liberação controlada das micropartículas de eugenol elaboradas com alginato de sódio, Tween 80 e proteína do soro lácteo intensifica a ação antimicrobiana frente às cepas bacterianas estudadas?

Assim sendo, tem-se como hipótese: De acordo com as propriedades físico-químicas do alginato de sódio e da proteína isolada do soro do leite, bem como, a ação antimicrobiana presente no eugenol, será possível desenvolver micropartículas bioativas de alginato de sódio recobertas de proteína de soro lácteo com eugenol encapsulado, por gelificação iônica externa, e que apresentam atividade antibacteriana.

### **3 REVISÃO DE LITERATURA**

#### **3.1 Antimicrobianos naturais**

A ingestão de alimentos contaminados por microrganismos patogênicos causa a Doença Transmitida por Alimentos (DTA). Dentre estes microrganismos, as bactérias são as principais causadoras, responsável por 90% dos surtos de DTA segundo o Ministério da Saúde. Diante disso, são necessárias pesquisas para o desenvolvimento de produtos com ação antimicrobiana frente a estas bactérias. Esta ação antimicrobiana envolve a eliminação ou impedimento do desenvolvimento de microrganismos. E os agentes antimicrobianos podem ser sintéticos ou naturais, oriundos de bactérias, fungos ou plantas (BRASIL, 2018; BRASIL, 2019).

A fim de garantir a segurança e atender a demanda para a conservação do produto alimentício, tem sido crescente a busca de antimicrobianos naturais (como óleos essenciais e fitoquímicos) com potencial aplicação em alimentos, que sejam capazes de serem utilizados isoladamente ou em combinação com outra tecnologia. A escolha deste conservante natural deve se basear na compatibilidade química e sensorial do mesmo com o alimento alvo, além da sua efetividade contra os microrganismos indesejáveis, segurança, e dentre outras características (MACHADO et al., 2011).

Em geral, os óleos essenciais (OEs) atuam danificando diversos sistemas enzimáticos das bactérias. Dentre eles, são danificados os sistemas responsáveis pela produção de energia celular e síntese de componentes estruturais, interferindo na divisão celular do microrganismo (FREIRE et al., 2011).

Os OEs possuem componentes hidrofóbicos que são responsáveis por sua ação antimicrobiana. No entanto, o uso de altos teores de óleos essenciais no produto pode tornar o mesmo sensorialmente intolerável, necessitando de alternativas para avaliar as concentrações mais baixas e eficazes desta propriedade antimicrobiana (MAJEED et al., 2015).

Dentre estes óleos, o óleo essencial de cravo-da-índia se mostra como um dos sugeridos como substitutos de conservantes alimentares sintéticos devido a sua propriedade antimicrobiana, a qual está atribuída a presença do seu composto majoritário, o eugenol. Assim sendo, alguns estudos observaram a eficácia do eugenol *in vitro* frente as principais bactérias contaminantes de alimentos: *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium* e *Staphylococcus aureus*. É destacado ainda que a ação antimicrobiana do eugenol tem se mostrado mais ativa contra cepas Gram-positivas como *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus* (IRKIN e ESMER, 2015; RESENDE et al., 2017).

Os compostos fenólicos são os principais responsáveis pelo caráter antibacteriano dos OEs, no entanto alguns estudos relatam que compostos não fenólicos (ex. alilisotiocianato) são mais efetivos contra bactérias Gram-negativas, assim como contra fungos. A presença de aldeídos, terpenos, álcoois alifáticos, cetonas, ácidos e isoflavonoides também estão atribuídas à atividade citotóxica destes óleos (MACHADO et al., 2011).

O antimicrobiano pode ser avaliado de acordo com a resposta do microrganismo ao mesmo, através de métodos como a concentração inibitória mínima (CIM) a qual considera a menor quantidade do composto necessário para inibir o desenvolvimento do patógeno, bem como a concentração bactericida mínima (CBM) a qual considera a menor quantidade de composto necessário para eliminar o patógeno (MACHADO, BARROS, 2006).

Desta forma, o microrganismo é considerado resistente ao antimicrobiano quando possui a capacidade de se multiplicar na presença do mesmo. Por outro lado, quando o microrganismo não é eliminado por completo, mesmo em altos teores do composto, é dito que há uma tolerância ao antimicrobiano. Sendo assim, quando a CBM for  $\geq 32$  vezes superior à CIM, determina-se que o microrganismo é tolerante ao antimicrobiano (MACHADO; BARROS, 2006).

### **3.2 Principais contaminantes de alimentos**

Dentre as principais bactérias contaminantes de alimentos, a *Escherichia coli* é pertencente do grupo de bactérias responsáveis pelo maior número de surtos (23,4%) de DTAs entre os anos de 2009 e 2018 segundo o Ministério da

Saúde. Este grupo é caracterizado por serem bactérias Gram-negativas que possuem como seu habitat natural a microbiota entérica de animais. No entanto, há diferenças entre si, como: *E. coli* entero-hemorrágica (produção de verotoxina), *E. coli* entero-toxigênica (causa infecção entérica), *E. coli* enteropatogênica (não invasiva e não produtora de toxina), *E. coli* entero-invasiva (causa doença invasiva do cólon) e *E. coli* enterro-agregativa – EAEC (causa diarreia aguda e persistente) (BRASIL, 2019; RADÜNZ et al., 2019).

Assim como a *E. coli*, a *Salmonella typhimurium* também é caracterizada como uma bactéria Gram-negativa, pertencente da ordem Enterobacteriales. A mesma possui forma de bastonetes movidas por flagelos peritríquos, não fermentadores de lactose e responsáveis por graves intoxicações alimentares que causam vários surtos. Apresenta alta morbidade e dificuldade de medidas de controle (BRASIL, 2019).

Por outro lado, *Staphylococcus aureus* se caracteriza como uma bactéria Gram-positiva em forma de cocos com tamanho entre 0,5 e 1,5 µm de diâmetros, imóvel e não formadora de esporos. Devido a divisão celular deste grupo de bactérias, a qual é feita em três planos perpendiculares, estes microrganismos podem estar sozinhos, em pares, em cadeias curtas ou reunidos em formato de cacho de uva (RADÜNZ et al., 2019).

É considerado um microrganismo oportunista e sua multiplicação nos alimentos ocorre de forma facilitada, possuindo a capacidade de produzir toxinas termorresistentes (enterotoxinas) que podem resultar em intoxicação alimentar. Segundo o Ministério da Saúde 9,4% dos surtos de DTA notificados entre 2009 e 2018 foram causados por este grupo de bactérias que possuem como habitat natural a pele e o trato respiratório superior dos seres humanos (BRASIL, 2019).

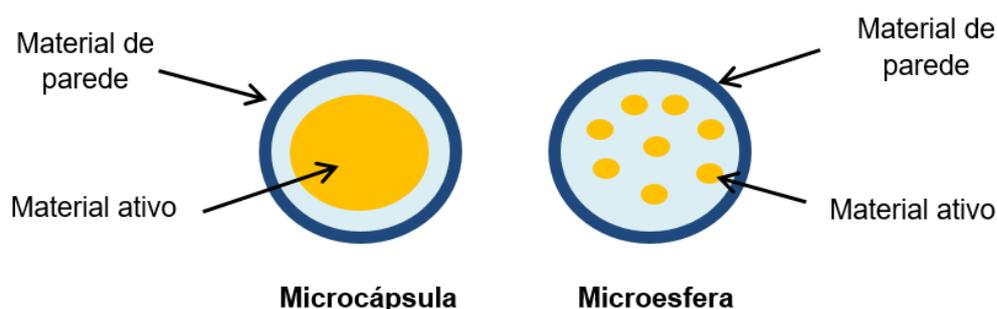
Outra bactéria Gram-positiva, contaminante de alimento, é a *Listeria monocytogenes* que possui forma de bastonetes curtos e coco bacilos com tamanhos de 0,5 µm de largura e 1 a 1,5 µm de comprimento, geralmente formada em cadeias de três a cinco células. Neste grupo as bactérias são aeróbias facultativas, não formadoras de esporos, incapazes de produzir gás e capazes de produzir catálise e ácido a partir da glicose (MADIGAN et al., 2010). É destacada a capacidade deste microrganismo causar infecção tanto em seres

humanos como em animais. Além disso, apresentar alta resistência frente alterações de concentração de sal, pH e temperatura, podendo ser encontradas tanto em alimentos quanto na água e solo (RADÜNZ et al., 2019).

### 3.3 Microencapsulação

A microencapsulação pode ser definida como um processo de aprisionamento de uma substância ativa dentro de um material de revestimento. Neste sentido, a substância é protegida de fatores ambientais que possam induzir a sua deterioração (ex. oxigênio, luz ou umidade). Esta técnica permite a redução da volatilidade, higroscopicidade e reatividade do composto, aumentando a estabilidade em condições adversas e melhorando a vida útil do produto (SILVA et al., 2014; COMUNIAN et al., 2016).

O processo de microencapsulação resulta em micropartículas que podem ser classificadas de acordo com o seu núcleo, dividindo-se em dois grupos: microcápsula e microesfera (Figura 1). A microcápsula apresenta um núcleo interno, onde contém o material ativo, e um invólucro externo. Já a microesfera não possui núcleo definido, mas sim uma matriz sólida, na qual o material ativo é distribuído. Para que as microesferas sejam formadas, uma pré-mistura entre o material ativo e a solução contendo o polímero deve ser realizada antes do processo de encapsulação (BENAVIDES et al., 2016).

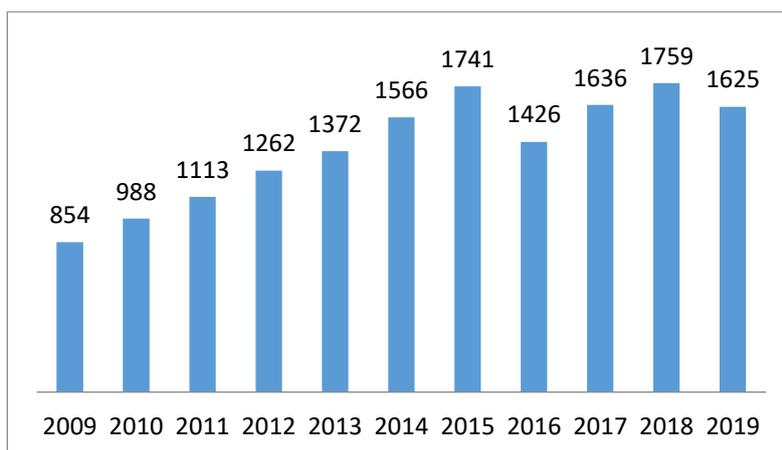


**Figura 1.** Tipos de micropartículas.

Atualmente, a microencapsulação é utilizada para diversas aplicações, como na indústria têxtil, indústria farmacêutica, alimentícia e em cosméticos. O número de artigos publicados sobre esta técnica aumentou entre os anos de

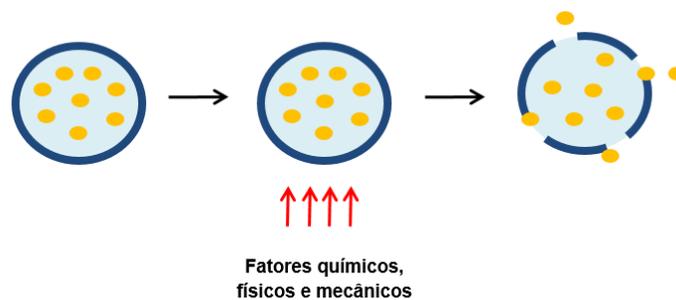
2009 e 2019, havendo alguns períodos com diminuição no número de publicações como o ano de 2016, o que mostra o gráfico 1 (CAPES, 2019).

**Gráfico 1.** Número de artigos publicados nos últimos anos, retirados da base de dados CAPES, palavra-chave “microencapsulation” – tipo de documento “artigo” – ano. (CAPES, 2019).



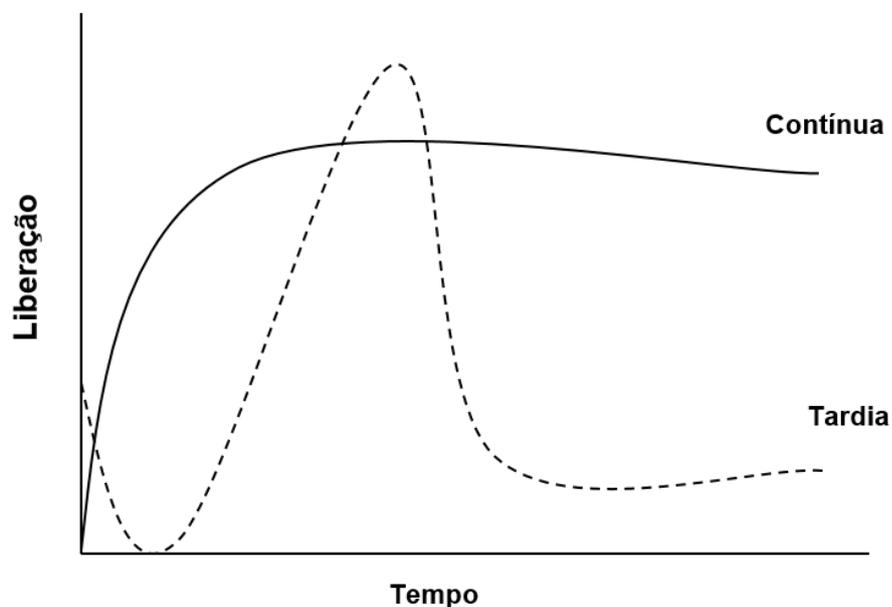
Dentre suas aplicações, a indústria alimentícia utiliza essa tecnologia com o intuito de facilitar o uso de ingredientes considerados instáveis, assim como melhorar o processamento e textura de ingredientes visando a sua higroscopicidade, solubilidade e capacidade de dispersão em diferentes tipos de materiais. A possibilidade de controle de liberação de substâncias de interesse é um benefício adicional (COMUNIAN et al., 2016).

A liberação controlada é caracterizada como uma condição onde uma ou mais substâncias ativas são disponibilizadas em um meio e tempo desejados a uma taxa específica (Figura 2). O desenvolvimento destes sistemas de liberação controlada depende de diversos fatores, como: a escolha do material encapsulado, métodos empregados para a encapsulação, possibilidades de predição e controle do gatilho e da cinética de liberação dessa substância no ambiente. Os gatilhos de liberação dependem, além do material encapsulante, da substância encapsulada, da geometria e morfologia da micropartícula, das condições do meio (solvente, pH, força iônica, temperatura) e do método de produção das micropartículas (MADERUELO et al., 2011; BAKRY et al., 2016).



**Figura 2.** Representação esquemática de um sistema de liberação controlada (GALLO, 2019).

Os sistemas de liberação controlada possuem duas classificações: (I) sistema de liberação tardia, onde a liberação do composto ativo ocorre tardiamente e acontece a partir de um “tempo de espera” finito até um ponto quando e/ou onde a liberação é favorecida; (II) sistema de liberação contínua, onde ocorre uma liberação constante do ativo em um lugar desejado (Figura 3).



**Figura 3.** Representação gráfica genérica dos perfis de liberação tardia e contínua (GALLO, 2019).

Diante disso, a escolha do protocolo de microencapsulação é de grande importância para os resultados a serem obtidos. Dentre as diversas opções de técnicas, a seleção da mesma dependerá de uma análise geral de determinados fatores, como: objetivo da aplicação, tamanho da partícula desejada,

características do material(is) de parede e material(is) ativo(s), além do custo e segurança (FAVARO-TRINDADE et al., 2008; COMUNIAN et al., 2016).

Como as técnicas levam em consideração as propriedades físico-químicas dos materiais utilizados, as mesmas são classificadas em três diferentes métodos (FAVARO-TRINDADE, 2008):

- Métodos físicos: secagem por atomização, aspersão e ventilação/refrigeração/congelamento, leite fluidizado, fluidos supercríticos e revestimento por pulverização, gelificação iônica externa, extrusão com centrífuga;
- Métodos químicos: polimerização, inclusão molecular;
- Métodos físico-químicos: gelificação iônica interna, coacervação complexa, lipossomas, micelas, emulsões, processo com matrizes lipídicas nanoestruturados, e a evaporação do solvente.

### **3.3.1 Gelificação iônica**

Dentre as técnicas utilizadas para o processo de microencapsulação, a gelificação iônica se destaca pela sua simplicidade, versatilidade, permitindo o uso de solventes orgânicos e resultando em uma prática ativamente utilizada em fármacos e compostos ativos termosensíveis de interesse da indústria de alimentos (BENAVIDES et al., 2016; SILVA et al., 2018).

A formação de microesferas por gelificação iônica envolve a reticulação de grupos carboxílicos da cadeia polimérica do hidrocolóide, formando zonas de junção que são base para a estrutura tridimensional dos géis. Esta técnica é baseada na capacidade de vários polissacarídeos (ex. pectina, alginato de sódio e carragena) em formar gel na presença de íons polivalentes. O processo é dado pelo gotejamento ou aspersão de uma solução de polissacarídeo aniônico sobre uma solução catiônica em concentrações previamente determinadas (AGUILAR et al., 2015; BENAVIDES et al., 2016).

Há duas maneiras de obter partículas por meio de gelificação iônica: através da gelificação iônica interna ou gelificação iônica externa. A gelificação iônica interna é dada pela dispersão de uma fase aquosa contendo agente de reticulação em sua forma inativa e biopolímero. Obtêm-se resultado através da

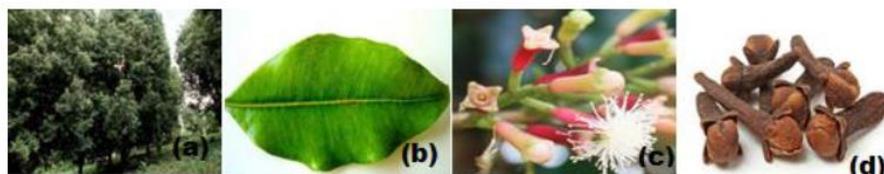
ionização do agente de reticulação com a redução do pH do meio ou pela adição de um ácido orgânico que ao reagir com o agente de reticulação na fase aquosa produz as partículas. Por outro lado, a gelificação iônica externa pode produzir partículas a partir da atomização ou extrusão da solução contendo o biopolímero e o agente ativo em solução salina, onde as gotas permanecem sob agitação por um determinado período de tempo resultando em microgeis, visto que a difusão dos cátions divalentes presentes na solução salina através da superfície da gota, promovem a formação de ligações cruzadas nas partículas (AGUILAR et al., 2015; SILVA et al., 2018).

Assim, a técnica de gelificação iônica se mostra uma vantajosa escolha para o processo de microencapsulação por apresentar diversos benefícios como: não necessita de pH e temperatura extremos, não requer o uso de solventes orgânicos, permite o uso combinado de biopolímeros, é capaz de encapsular tanto compostos hidrofóbicos como quanto hidrofílicos, devido a porosidade da matriz da micropartícula e por apresentar baixo custo comparado a outras técnicas (GUZEY; MCCLEMENTS, 2007; SILVA et al., 2018).

Isto posto, a microencapsulação do eugenol por gelificação iônica externa permite a garantia de uma maior proteção do óleo, visto que diminui a interação do mesmo com o ambiente. Além disso, diminui o aroma do eugenol, possibilitando uma melhor aceitação dos consumidores quando aplicado em alimentos.

### **3.4 Eugenol**

O cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*) é o botão seco da flor (Figura 4) pertencente à família das mirtáceas (*Myrtaceae*) de origem das ilhas Molucas, localizada na Indonésia. É uma planta de porte arbóreo com copa alongada característica capaz de atingir em média 8 a 10 metros de altura. Suas folhas possuem características ovais, aromáticas e tem de 7 a 11 centímetros de comprimento. Seu ciclo vegetativo é longo, podendo alcançar mais de cem anos (CORTÉS-ROJAS et al., 2014).



**Figura 4.** Fotos ilustrativas da árvore (a), folha (b), cravo-da-índia em flor (c) e cravo-da-índia seco (d) (RADÜNZ et al., 2019).

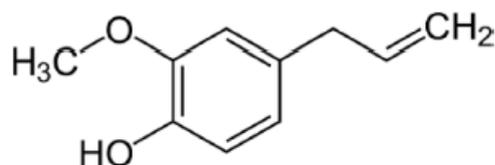
A composição química dos compostos voláteis extraídos do *S. aromaticum* (folhas, caules e botões florais) apresenta como seu principal componente o eugenol conforme a Tabela 1 (OLIVEIRA et al., 2009).

Segundo a IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry) a nomenclatura para o eugenol é 4-Alil-2-Metoxifenol, sua fórmula molecular é  $C_{10}H_{12}O_2$  (Figura 5); peso molecular: 164,20 g/mol, ponto de ebulição: 255°C, densidade: 1,0664 g/L, suas características físicas: líquido incolor ou amarelado, solúvel em álcool etílico, éter, clorofórmio e óleo, pouco solúvel em água e forte odor (OLIVEIRA et al., 2009).

**Tabela 1.** Porcentagem dos componentes do óleo essencial do *Syzygium aromaticum* (OLIVEIRA et al., 2009).

Componentes	% Área				
	FF*	FSS*	FSE*	Pen*	BFS*
<b>Eugenol</b>	81,47	87,07	82,64	90,41	88,38
<b><math>\beta</math>-Cariofileno</b>	10,78	8,29	10,45	3,61	0,64
<b><math>\alpha</math>-Humuleno</b>	1,44	1,08	1,63	0,60	-
<b>Acetato de eugenila</b>	1,89	-	-	3,76	10,98
<b>Óxido de cariofileno</b>	0,47	-	0,51	-	-

\*FF: Folhas frescas; FSS: Folhas secas ao sol; FSE: Folhas secas em estufa; Pen: Pedúnculos e BFS: Botões florais secos de *Syzygium aromaticum*.



**Figura 5.** Estrutura química molecular do eugenol (MEHER; CHAKRABORTY, 2018).

Os principais produtos obtidos do cravo-da-índia no mercado nacional atualmente, além do uso de seu botão seco na culinária, são o óleo puro propriamente dito ou derivados dele, cujas principais aplicações são como anestésicos locais e como antissépticos em odontologia. Porém, há muitos estudos que envolvem diferentes aplicações desse composto, desde lenços umedecidos com aroma de eugenol e filtros solares, até inseticidas e dispositivos de liberação programada contendo uma mistura de agentes repelentes (CORTÉS-ROJAS et al., 2014).

O eugenol também possui aplicações como componente de perfumes à base de cravo, flavorizante de bebidas não alcóolicas, gomas de mascar, doces, sorvetes, chocolates, produtos de panificação, gelatinas e pudins, além de ser matéria-prima para a obtenção de baunilha, e suas flores desidratadas são usadas como especiarias tanto para fins medicinais quanto para cosméticos (SANTOS et al., 2014).

A extração do eugenol em escala laboratorial é realizada através da hidrodestilação, já em escala industrial é preferível o uso do sistema de destilação por arraste de vapor. No entanto, métodos de extração com solventes e com CO<sub>2</sub> supercrítico também podem ser empregados quando se pretende resultados mais eficazes (CORTÉS-ROJAS et al., 2014). O eugenol vem despertando o interesse dos cientistas devido a sua lipossolubilidade, baixa toxicidade e por possuir atividades biológicas (SANTOS et al., 2014).

Dentre as suas propriedades farmacológicas, pode-se destacar: antimicrobiana, anti-inflamatória, antioxidante, modulador de respostas imunes, anticarcinogênica, cardiovasculares, antinociceptiva e anestésica local. Podem ser destacadas também atividade espasmolítica, antisséptica, relaxante muscular, redutor de edema de língua induzido por envenenamento de plantas,

atividade anti-helmíntica em ruminantes, antipirética (quando administrado periférica ou centralmente reduzindo a febre por ação central, igualmente ao acetaminofeno) (SANTOS et al., 2014).

Embora o eugenol seja considerado uma substância de baixa toxicidade, toda substância do ponto de vista toxicológico é considerada tóxica conforme suas condições de exposição (dose administrada ou absorvida, tempo, frequência de exposição e vias de administração). Desta forma, é importante conhecer formas seguras de utilização a fim de prevenir possíveis efeitos indesejados (Quadro 1).

**Quadro 1.** Verificação de letalidade progressiva do extrato etanólico de cravo-da-índia diluído em solução fisiológica para via intraperitoneal em ratos (AFFONSO et al., 2012).

<b>Dose (mg/Kg)</b>	<b>Sintomas</b>	<b>Mortalidade</b>
500 e 437,5	Piloereção, edema de focinho, proptose, contorções abdominais, baixas excreções urinárias, excreções fecais com muco, redução da frequência respiratória, distensão abdominal e agressividade.	Acima de 80% dos grupos
187,5; 250 e 375	Piloereção, palidez generalizada, agitação motora e posterior sonolência, lacrimejamento, convulsões, contorções abdominais, dispneia, baixa diurese e excreção fecal intensa.	Entre 33 e 67% das amostras
137,5 e 180	Ausência de diurese, excreção fecal abundante, redução da frequência respiratória, alterações de marcha e tremores leves.	Abaixo de 17%

### **3.5 Materiais encapsulantes**

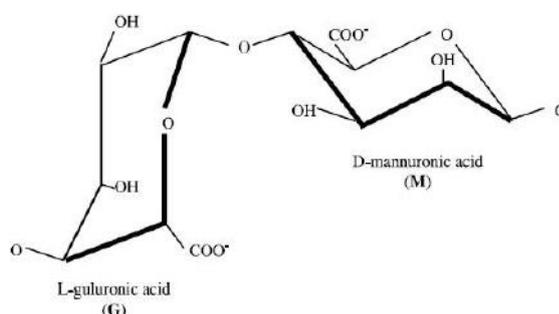
Um dos principais determinadores do desempenho, e por sua vez, da eficácia do processo de microencapsulação é a escolha do material

encapsulante ou material de parede. Os materiais de parede possuem a função primordial de proteger o material ativo do ambiente (luz, umidade, substâncias, entre outros) durante o processo de armazenamento, permitindo o prolongamento da vida de prateleira do produto. Além de possuir a capacidade de prevenção da perda de compostos voláteis encapsulados e facilitar o manuseio do produto final (SHAHIDI; HAN, 1993).

Para que o material de parede possua essas funcionalidades, o mesmo precisa apresentar propriedades emulsificantes, formar facilmente a película envolvente, possuir baixa viscosidade em altas concentrações de sólidos e apresentar baixa higroscopicidade, além de ser econômico, possuir um sabor agradável e ser de fácil obtenção. No entanto, nenhum material encapsulante sozinho apresenta todas estas características, logo são utilizadas combinações de materiais encapsulantes. Desta forma, a escolha do agente encapsulante é baseada em três critérios principais: aplicação, economia e segurança. No setor alimentício são necessárias a biocompatibilidade, a biodegradabilidade e a não toxicidade (MARFIL, 2014).

### 3.5.1 Alginato de sódio

O alginato ou ácido algínico é um polissacarídeo não tóxico de alta massa molar, cuja formação se dá de forma linear por ligações glicosídicas  $\alpha(1,4)$  entre os monômeros  $\beta$ -D-Maurônico e ácido  $\alpha$ -L-Gulurônico (Figura 6) (MENEZES et al., 2013).

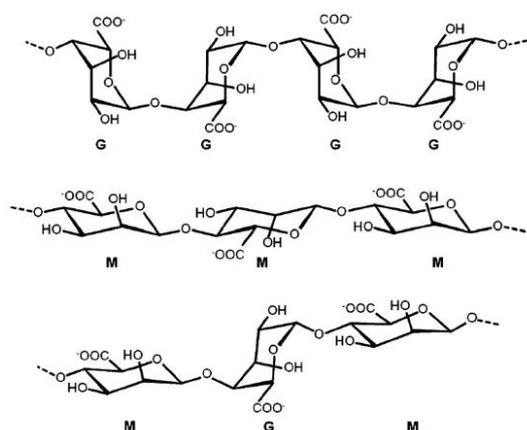


**Figura 6.** Estrutura química molecular do alginato (MENEZES et al., 2013).

A parede celular de algas marinhas pardas é a fonte mais comum utilizada para extrair este polissacarídeo para finalidade comercial, entretanto,

também microrganismos também são utilizados em condições controladas para a produção deste biomateria (MULLER et al., 2011).

O d-manuronato era dito como principal componente do alginato até a identificação do l-guluronato. Posteriormente foi observado que os alginatos são copolímeros em bloco e que a proporção entre os seus compostos (manuronato e guluronato) variam de acordo com a fonte natural. Desta forma, o alginato é considerado uma família completa de copolímeros lineares contendo blocos de resíduos de <0044> -d-manuronato (M) e <0045> -l-guluronato (G) ligados por (1,4). Os blocos são compostos de resíduos G consecutivos (GGGGGG), resíduos M consecutivos (MMMMMM) e resíduos M e G alternados (GMGMGM) (LEE, MONEY, 2012) (Figura 7).



**Figura 7.** Estruturas químicas de bloco G, bloco M e bloco alternado em alginato (LEE, MONEY, 2012).

Assim, a fonte da qual é extraído o alginato difere nos teores M e G, além do comprimento de cada bloco. Acredita-se que apenas os blocos G participam na reticulação intermolecular com cátions divalentes (por exemplo,  $\text{Ca}^{2+}$ ) para formar hidrogéis. Assim, as propriedades físicas do alginato e seus respectivos hidrogéis sofrem influência de diversos fatores: composição (razão M/G), sequência dos blocos, comprimento do bloco G e do peso molecular. Por outro lado, as propriedades mecânicas dos géis de alginato são diretamente proporcionais ao tamanho do comprimento do bloco G e do peso molecular, ou seja, quando o tamanho do bloco aumenta as propriedades também se elevam (LEE; MONEY, 2012).

De acordo com as suas características, como ser atóxico, biodegradável, de baixo custo e de fácil gelificação, o alginato é comumente utilizado como agente espessante, estabilizante, formador de suspensões e de filmes, produtor de géis e agente estabilizador de emulsões, possuindo capacidade de formar géis rapidamente quando na presença de cátions de metais divalentes, tais como cálcio, magnésio, manganês, alumínio e ferro (MAHDI et al., 2016; KHALIL et al., 2017).

Diante disto, o alginato pode ser utilizado amplamente pela indústria por ser um aditivo alimentar. É possível constatar que várias pesquisas relacionadas à elaboração de filmes e revestimentos com alginato, especialmente aditivado, vem sendo desenvolvidas. Essa aditivação pode gerar alterações nas características dos filmes e revestimentos, seja aumentando sua opacidade (como no uso de extratos), como melhorando suas propriedades mecânicas (como, por exemplo, adicionando glicerol ou reticulando com íons de cálcio), reduzindo sua solubilidade (aplicando outras matrizes em misturas com alginato ou adicionando cálcio no preparo dos filmes), e até aumentando ou gerando capacidade antimicrobiana (como no uso de agentes que atuam contra microrganismos) e antioxidante (utilizando compostos fenólicos com ação antioxidante) (PEREDA et al., 2011; KHALIL et al., 2017).

Desta forma, para Lee e Money (2012) a escolha do alginato de sódio como material de parede para a microencapsulação é justificada devido as suas vantagens como liberação controlada das substâncias encapsuladas, facilidade de gelificação, biocompatibilidade e atoxicidade.

### **3.5.2 Proteína do soro do leite**

As proteínas são macromoléculas compostas por aminoácidos unidos por ligações peptídicas. Apresentam estrutura macromolecular tridimensional que abrange as estruturas primária, secundária, terciária e quaternária. Esta estrutura se estabiliza por meio de ligações de hidrogênio e ligações dissulfídicas entre os grupos laterais dos aminoácidos. A diversidade das estruturas é dada pelo tipo, número e sequência de aminoácidos ao longo da cadeia polipeptídica (AGUILAR et al., 2015; WAGONER et al., 2016).

As cadeias polipeptídicas das proteínas globulares são normalmente dobradas apresentando-se de forma compacta esferoide, com a maior parte dos aminoácidos apolares no interior da molécula e os aminoácidos polares em seu exterior. A interação entre as proteínas pode ocorrer de forma complexa envolvendo o sítio de ligação, por exemplo. Estas proteínas podem ser aderidas às partículas por meio de vários mecanismos físico-químicos ou podem ser adsorvidas à matriz através de interações específicas, ligação covalente e não covalente (WAGONER et al., 2016).

A principal fonte de proteínas globulares em produtos alimentícios são as proteínas do soro do leite, as quais compõem entre 18 e 20% do teor total de proteínas presente no leite. São compostas pelas seguintes proteínas  $\beta$ -lactoglobulina,  $\alpha$ -lactoalbumina, albumina do soro bovino, imunoglobulina, lactoferrina, lactoperoxidase, traços de lactose e sais (EL-SALAM, EL-SHIBINY, 2015).

As proteínas do soro do leite são desperdiçadas como resíduo originado na indústria de laticínios e devido à sua rica composição nutricional o seu descarte é preocupante em relação a preservação ambiental. A aplicação destas proteínas pode ser benéfica para a saúde visto que enriquecem nutricionalmente o produto. Ao serem utilizadas como material para revestimentos comestíveis apresenta como vantagem a extensão da validade comercial e melhoria na qualidade nutricional dos alimentos (RIBEIRO-SANTOS et al., 2015).

Neste sentido, as proteínas do soro lácteo vêm sendo largamente usadas na área de alimentos devido não apenas ao seu alto valor nutricional como as suas propriedades funcionais (solubilidade, emulsificação, gelatinização e capacidade de reter água). Podem ser encontradas comercialmente como isolados (WPI), concentrados (WPC) e hidrolisado proteico de soro (HWP), os quais apresentam diferenças em suas propriedades devido a composição do leite e condições de produção (AGUILAR et al., 2015; EL-SALAM, EL-SHIBINY, 2015).

Assim, estas proteínas têm sido utilizadas na produção de micro e nanopartículas como material único de parede, em misturas de materiais ou como recobrimento. O seu caráter catiônico permite que seja complexada à

polissacarídeos aniônicos formando assim um sistema de proteção contra fatores como pH, oxigênio, luz, vapor de água, entre outras condições ambientais ou do próprio produto alimentício (AGUILAR et al., 2015; EL-SALAM, EL-SHIBINY, 2015; WAGONER et al., 2016).

Desta forma, o recobrimento de micropartículas com proteína do soro do leite isolada garante maior proteção do material ativo, agregando ainda valor nutricional e propriedades funcionais ao alimento a serem aplicadas. Além disso, permite o aumento e a carga de superfície das micropartículas. E para que a sua aplicação obtenha eficácia é ressaltada a influência das condições ambientais e do alimento (temperatura, pH, força iônica), relação de quantidade entre os biopolímeros e concentração dos mesmos na adsorção das proteínas na superfície da micropartícula, pois estes fatores possuem grande impacto na força e no tipo de cargas formadas (RAIKOS, 2010; FUSTIER et al., 2015).

Desta maneira, recobrir as micropartículas de alginato de sódio com proteína do soro do leite isolada (WPI) para encapsular eugenol pode possibilitar adicional proteção do óleo (principalmente frente à oxidação lipídica), melhorar a estabilidade e a viabilidade do ativo à passagem da micropartícula pelo trato gastrointestinal. Além disso, traz à matriz alimentar benefícios nutricionais e pode melhorar as propriedades funcionais da partícula (RAIKOS, 2010; AGUILAR et al., 2015; WAGONER et al., 2016).

#### 4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AFFONSO, R.S.; RENNÓ, M.N.; SLANA, G.B.C.A.; FRANÇA, T.C.C. Aspectos químicos e biológicos do óleo essencial de cravo-da-índia. **Revista Virtual de Química**, v.4, n.2, p.146-161, 2012.
- AGUILAR, K.C.; TELLO, F.; BIERHALZ, A.C.K.; ROMO, M.G.G.; FLORES, H.E.M.; GROSSO, C.R.F. Protein adsorption onto alginate-pectin microparticles and films produced by ionic gelation. **Journal of Food Engineering**, v.154, p.17-24, 2015.
- BAKRY, A.M.; ABBAS, S.; ALI, B.; MAJEED, H.; ABOUELWAF, M.Y.; MOUSA, A.; LIANG, L. Microencapsulation of oils: a comprehensive review of benefits, techniques, and applications. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 15, n.1, p.143-182, 2016.
- BENAVIDES, S.; CORTÉS, P.; PARADA, J.; FRANCO, W. Development of alginate microspheres, containing thyme essential oil using ionic gelation. *Food Chemistry, Barking*, v.2014, p.77-83, 2016.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos no Brasil**: Informe 2018. Disponível em: <<http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2019/fevereiro/15/Apresenta---o-Surtos-DTA---Fevereiro-2019.pdf>> Acesso em: agosto, 2019.
- CAPES. Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior. Artigos sobre microencapsulação publicados entre 2009 e 2019. Disponível em: <http://www.periodicos.capes.gov.br/> Acesso em: dezembro, 2019.
- CASTRO-ROSA, J.; GROSSO, C.R.F.; ALDAPA, C.A.G.; VARGAS, E.R.; MARÍN, M.L.R.; ORTIZ, F.A.A.G.; CORTES, R.N.F. Recent advances in microencapsulation of natural sources of antimicrobial compounds used in food – A review. **Food Research International**, v.102, p.575-587, 2017.
- COMUNIAN, T.A.; GOMEZ-ESTACA, J.; FERRO-FURTADO, R.; CONCEIÇÃO, G.J.A.; MORAES, I.Z.F.; CASTRO, I.A.; FAVARO-TRINDADE, C.S. Effect of diferente polysacharides and crosslinkers on echium oil microcapsules. **Carbohydrate Polymers**, v. 150, p. 319-329, 2016.
- CORTÉS-ROJAS, D.F.; SOUZA, C.R.F.; OLIVEIRA, W.P. Encapsulation of eugenol rich clove extract in solid lipid carries. **Journal of Food Engineering**, v.127, p.34-42, 2014.
- EL-SALAM, M.H.A.; EL-SHIBINY, S. Preparation and properties of milk proteins-based encapsulated probiotics: a review. **Dairy Sci. & Technol.**, v. 95, p. 393-412, 2015.
- FAVARO-TRINDADE, C.S.; PINHO, S.C.; ROCHA, G.A. Revisão: Microencapsulação de ingredientes alimentícios. **Brazilian Journal of Food Technology**, v.11, n.2, p.103-112, 2008.
- FREIRE, J.M.; CARDOSO, M.G.; BATISTA, L.R.; ANDRADE, M.A. Essential oil of *Origanum majorana* L., *Illicium verum* Hook. f. and *Cinnamoun zeylanicum*

Blume: chemical and antimicrobial characterization. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 13, n. 2, p. 209-214, 2011.

FUSTIER, P.; ACHOURI, A.; TAHERIAN, A.R.; BRITTEN, M.; PELLETIER, M.; SABIK, H.; VILLENEUVE, S.; MONDOR, M. Protein-protein multilayer oil-in-water emulsions for the microencapsulation of flaxseed oil: effect of whey and fish gelatin concentration. **J. Agric. Food Chem.**, v.63, p.9329-9250, 2015.

GALLO, T.C.B. Transferência de massa e cinética de liberação de óleo essencial de oregano encapsulado pelos métodos de gelificação iônica e coacervação complexa. 111f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos). Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, São José do Rio Preto, 2019.

GUZEY, D.; MCCLEMENTS, D.J. Formation, stability and properties of multilayer emulsions for application in the food industry. **Nature**, Heidelber, v.130, n. 2006, p. 227-248, 2007.

HOLKEM, A.T.; CODEVILLA, C.F.; MENEZES, C.R. Emulsificação/gelificação iônica interna: alternativa para microencapsulação de compostos bioativos. **Ciência e Natura**, v.37, p.116-124, 2015.

IRKIN, R.; ESMER, O.K. Novel food packaging systems with natural antimicrobial agentes. **J. Food Sci. Technol.**, v.52, n.10, p.6095-6111, 2015.

KHALIL, A.H.P.S.; TYE, Y.Y.; SAURABH, C.K.; LEH, C.P.; LAIM, T.K.; CHONG, E.W.N.; FAZITA, M.R.N.; HAFIDZ, J.M.; BANERJEE, A.; SYAKIR, M.I. Biodegradable polymer films from seaweed polysaccharides: A review on cellulose as a reinforcement material. **Express Polymer Letters**, v. 11, n. 4, p. 244-465, 2017.

MACHADO, A.; BARROS, E. **Antimicrobianos em Pediatria – Consulta Rápida**. Porto Alegre: Artmed, 2006, 296 p.

MACHADO, T. F.; BORGES, M.F.; BRUNO, L.M. Aplicação de Antimicrobianos Naturais na Conservação de Alimentos. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), Agroindústria Tropical. Fortaleza, 2011.

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

MAHDI, M.H.; DIRYAK, R.; KONTOGIORGOS, V.; MORRIS, G.A.; SMITH, A.M. *In situ* rheological measurements of the external gelation of alginate. **Food Hydrocolloids**, v.55, p.77-80, 2016.

MAJEED, H.; BIAN, Y.; ALI, B.; JAMIL, A.; MAJEED, U.; KHAN, Q.F.; IQBAL, J.; SHOEMAKER, C.F.; FANG, Z. Essential oil encapsulations: uses, procedures, and trends. **Royal Society of Chemistry**, v.5, p.58449-58463, 2015.

MARFIL, P.H.M. Microencapsulação de óleo de palma por coacervação complexa em matrizes de gelatina/goma arábica e gelatina/alginate. 2014. 156f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho. São José do Rio Preto, 2014.

MEHER, G.; CHAKRABORTY, H. Influence of eugenol on the organization and dynamics of lipid membranes: a phase-dependent study. **Lagmuir**, v. 34, p. 2344-2351, 2018.

MULLER, J.M.; SANTOS, R.L.; BRIGIDO, R.V. Produção de alginato por microrganismos. **Polímeros**, v. 21, n. 4, 2011.

OLIVEIRA, R.A.; REIS, T.V.; SACRAMENTO, C.K.; DUARTE, L.P.; OLIVEIRA, F.F. Constituintes químicos voláteis de especiarias ricas em eugenol. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.19, n.771, 2009.

PEREDA, M.; AMICA, G.; RACZ, I.; MARCOVICH, N.E. Structure and properties of nanocomposite films based on sodium caseinate and nanocellulose fibers. **Journal of Food Engineering**, v. 103, n. 1, p. 76-83, 2011.

RADÜNZ, M.; DA TRINDADE, M.L.M.; CAMARGO, T.M.; RADÜNZ, A.L.; BORGES, C.D.; GANDRA, E.A.; HELBIG, E. Antimicrobial and antioxidante activity of unencapsulated and encapsulated clove (*Syzygium aromaticum*) essential oil. **Food Chemistry**, v.276, p.180-186, 2019.

RAIKOS, V. Effect of heat treatment on milk protein functionality at emulsion interfaces. A review. **Food Hydrocolloids**, v.24, p.259-265, 2010.

RESENDE, D.B.; MARTINS, H.H.A.; SOUZA, T.B.; CARVALHO, D.T.; PICCOLI, R.H.; SCHWAN, R.F.; DIAS, D.R. Synthesis and *in vitro* evaluation of peracetyl and deacetyl glycosides of eugenol, isoeugenol and dihydroeugenol acting against food-contaminating bacteria. **Food Chemistry**, v.237, p.1025-1029, 2017.

RIBEIRO-SANTOS, R.; SOUZA, A.L.R.; TROMBETE, F.M.; MELO, N.R. Proteína do soro do leite: Aproveitamento e aplicações na produção de embalagem biodegradável. **Revista Verde**, v. 10, n. 5, p. 51, 2015.

SANTOS, A.L.; CHERGE, G.O.; ALEXANDER, K.; RIGA, A.; MATHEWS, E. Characterization of the raw essential oil of eugenol extracted from *Syzygium aromaticum* L. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v.96, p.821-825, 2014.

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

SILVA, K.C.G.; CEZARINO, E.C.; MICHELON, M.; SATO, A.C.K. Symbiotic microencapsulation to enhance *Lactobacillus acidophilus* survival. **LWT - Food Science and Technology**, v.89, p.503-509, 2018.

SILVA, P.T.; FRIES, L.L.M.; MENEZES, C.R.; HOLKEM, A.T.; SHWAN, C.L.; WIGMANN, E.F.; BASTOS, J.O.; SILVA, C.B. Microencapsulation: concepts, mechanisms, methods and some applications in food technology. **Ciência Rural**, v.44, n.7, p.1304-1311, 2014.

TANGERINO, L.M.B. Estudo das propriedades antimicrobianas de copolímeros derivados do eugenol. 172 f. Dissertação (Mestrado em Materiais para Engenharia). Universidade Federal de Itajubá, 2006.

WAGONER, T.; VARDHANABHUTI, B.; FOEGEDING, A. Designing whey protein-polysaccharide particles for colloidal stability. **Annual Review of Food Science and Technology**, v.7, p.93-116, 2016.

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

# ARTIGO 1

## EFEITO DA MICROENCAPSULAÇÃO E COBERTURA DE MICROCÁPSULAS COM PROTEÍNA ISOLADA DE SORO DE LEITE NA ATIVIDADE BACTERIANA DO EUGENOL

Merielly Saeli de Santana, Francisco Humbeto Xavier Júnior, Mariane Cajubá  
de Brito Lira Nogueira, Erilane Castro de Lima Machado

### RESUMO

O eugenol é reconhecido por seu efeito antimicrobiano contra bactérias patogênicas responsáveis por contaminações alimentares. As suas características que limitam a sua aplicação em alimentos podem ser superadas ao utilizar a técnica de microencapsulação. A combinação desta técnica com recobrimento proteico favorece a proteção da substância ativa, além de utilizar um sub-produto da indústria de alimentos com alto valor nutricional. Objetivou-se com este estudo avaliar o potencial antibacteriano do eugenol microencapsulado com alginato de sódio em associação ao Tween 80, por gelificação iônica externa, e recobrimento com proteína do soro do leite isolada. A eficiência do recobrimento proteico e da encapsulação do eugenol foram avaliadas ao se quantificar a proteína e os compostos fenólicos, respectivamente. A caracterização das micropartículas se deu através das técnicas de microscopia (MO e MEV), espalhamento dinâmico de luz (DLS), tamanho médio, índice de polidispersão e potencial zeta. A atividade antimicrobiana *in vitro* do eugenol foi determinada em concentrações equivalentes para a sua forma livre, microencapsulada (com e sem recobrimento proteico) e com a micropartícula vazia (com e sem recobrimento proteico), por meio das técnicas de concentração inibitória mínima frente às espécies contaminantes de alimentos: *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes*. O recobrimento proteico foi satisfatório devido a coloração azul das micropartículas, assim como a presença de 16% de proteína na superfície das micropartículas. A morfologia uniforme das micropartículas foi observada, apresentando formato esférico. Além de apresentar redução na rugosidade das micropartículas após o processo de recobrimento proteico. O tamanho  $1,33 \pm 0,5 \mu\text{m}$  favorável a aplicação em alimentos, e seu índice de polidispersão (0,32) evidencia a uniformidade deste tamanho. O potencial zeta se manteve negativo após a adsorção proteica. A atividade antibacteriana *in vitro* dos microencapsulados com eugenol frente aos microrganismos em teste se mostrou eficaz de acordo com os menores valores de crescimento microbiano encontrados.

**PALAVRAS-CHAVE:** Óleo essencial. Fitoquímico. Proteína do soro lácteo. Alginato de sódio. Conservação. Alimentos.

## ABSTRACT

Eugenol is recognized for its antimicrobial effect against pathogenic bacteria responsible for food contamination. Its characteristics that limit its application in food can be overcome by using the microencapsulation technique. The combination of this technique with protein coating favors the protection of the active substance, in addition to using a by-product of the food industry with high nutritional value. The objective of this study was to evaluate the antibacterial potential of eugenol microencapsulated with sodium alginate in association with Tween 80, by external ionic gelation, and coating with isolated whey protein. The efficiency of protein coating and eugenol encapsulation were evaluated by quantifying protein and phenolic compounds, respectively. The microparticles were characterized by microscopy techniques (MO and SEM), dynamic light scattering (DLS), medium size, polydispersity index and zeta potential. The *in vitro* antimicrobial activity of eugenol was determined in concentrations equivalent to its free, microencapsulated form (with and without protein coating) and with the empty microparticle (with and without protein coating), using the techniques of minimum inhibitory concentration and bactericidal concentration minimal against contaminating food species: *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*. The protein coating was satisfactory due to the blue color of the microparticles, as well as the presence of 16% protein on the surface of the microparticles. The uniform morphology of the microparticles was observed, presenting a spherical shape. In addition to presenting a reduction in the roughness of the microparticles after the protein coating process. The size  $1.33 \pm 0.5 \mu\text{m}$  favorable to application in food, and its polydispersity index (0.32) shows the uniformity of this size. The zeta potential remained negative after protein adsorption. The *in vitro* antibacterial activity of microencapsules with eugenol against the microorganisms under test was effective according to the lowest values of microbial growth found.

**KEYWORDS:** Essential oil. Phytochemical. Whey protein. Sodium alginate. Conservation. Foods.

## 1 INTRODUÇÃO

A contaminação dos alimentos por microrganismos patogênicos pode causar a Doença Transmitida por Alimentos (DTA) nos consumidores. A deterioração destes alimentos também pode ser causada influenciando as suas características físico-químicas. Diante disso, há a necessidade do uso de produtos com atividade antimicrobiana frente a bactérias contaminantes de alimentos para que ocorra a eliminação ou impedimento do desenvolvimento destes microrganismos (BRASIL, 2018; BRASIL, 2019).

A fim de substituir os conservantes sintéticos devido aos seus efeitos carcinogênicos, o uso de antimicrobianos de origem vegetal é visto como alternativa para garantir a segurança microbiológica e conseqüentemente a conservação do alimento. Dentre os agentes mais eficazes presentes nos óleos essenciais, o eugenol se destaca como o componente que melhor reduz a atividade bacteriana. O eugenol é um óleo volátil e sua atividade está atribuída aos compostos fenólicos em sua composição, agindo na inibição da respiração e divisão celular bacteriana (TANGERINO, 2006; MAJEED et al., 2015; CASTRO-ROSA et al., 2017).

Para que este composto seja aplicado em alimentos é necessário um sistema capaz de protegê-lo das condições ambientais (ex. oxigênio, luz, umidade), assim como capaz de reduzir o seu odor característico. A técnica de microencapsulação permite a proteção do material encapsulado de situações adversas, estabilização do produto, além de mascarar odores e liberar de forma controlada a substância ativa (XIAO et al., 2014; HOLKEM et al., 2015).

A combinação do processo de microencapsulação com o recobrimento proteico permite uma maior proteção do composto a ser microencapsulado, visto que a produção de micropartículas pela técnica de gelificação iônica externa resulta em micropartículas porosas e o uso de proteína do soro do leite isolada favorece a proteção do eugenol frente à oxidação lipídica (FUSTIER et al., 2015; SILVERIO et al., 2018).

Desta forma, o estudo propõe a obter micropartículas com eugenol recobertas com proteína do soro do leite, e verificar a influência da cobertura nas características físico-químicas das micropartículas e na atividade antibacteriana

do eugenol na inibição de à *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium*, *Listeria monocytogenes* e *Escherichia coli*.

## **2 MATERIAIS E MÉTODOS**

### **2.1 Avaliação das condições e processamento do sistema**

Ensaio preliminares foram realizados para alcançar as condições mais adequadas para a obtenção de micropartículas de eugenol por gelificação iônica externa utilizando como material de parede o alginato de sódio em associação ao Tween 80 recobertas de proteína de soro lácteo isolada, baseando-se nos seguintes fatores associados as micropartículas: formação, aspectos e características visuais, e percepção de odores (dados não publicados).

### **2.2 Preparação das amostras**

A solução de alginato de sódio, bem como a dispersão proteica foram preparados no Laboratório de Bromatologia, localizado no Centro Acadêmico de Vitória – UFPE/CAV. A emulsão e o preparo das micropartículas foram realizados no Laboratório de Bioquímica, localizado no Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA) – UFPE, Campus Recife.

#### *2.2.1 Solução de alginato de sódio*

O polissacarídeo (Sigma – Aldrich) foi dissolvido a 2 % (p/v) em água destilada sob agitação constante a uma temperatura de 70 °C até completa solubilização.

#### *2.2.2 Emulsão*

A fim de compor a emulsão para o preparo das micropartículas, foram homogeneizados em banho de gelo em Ultra-Turrax (IKA T25) a 13.500 rpm: 10 ml (p/v) de alginato de sódio (2 %), 200 µl (v/v) do emulsificante Tween 80 (Polissorbato – Dinâmica) (2 %) e 100 µl (1,06 mg.mL<sup>-1</sup>) (v/v) do eugenol (Sigma – Aldrich, ReagentPlus, 99%) (1 %).

#### *2.2.2 Dispersão proteica*

A proteína do soro do leite isolada (WPI) (Isofort – Vitafor, Sabor neutro) (6 %) foi dispersa em 200 ml (p/v) de água destilada. O pH da dispersão foi

ajustado para 4,0 utilizando solução de ácido clorídrico (HCl) a 0,5 M (TELLO et al., 2015).

### **2.3 Preparação das micropartículas**

A emulsão composta de alginato de sódio, tween 80 e eugenol foi depositada em uma seringa (10 mL) e posteriormente pulverizada no encapsulador (BUCHI 395-PRO), sob frequência de 1500 Hz, voltagem de 1500 Hz e fluxo de 10 mL/min, utilizando bico de aspersão de 120 µm em um béquer contendo uma solução de 250 mL de cloreto de cálcio (Dihidratado – Dinâmica) sob agitação constante a temperatura ambiente.

### **2.4 Recobrimento das micropartículas**

O recobrimento proteico foi realizado, no laboratório de Bromatologia (UFPE/CAV), através da transferência das micropartículas para a dispersão proteica de WPI em um béquer sob agitação constante (500 rpm) por 30 minutos. Em seguida, as micropartículas recobertas foram lavadas com água destilada, filtradas com auxílio de papel de filtro e armazenadas sob refrigeração ( $6 \pm 2$  °C).

### **2.5 Eficiência do recobrimento proteico**

A eficiência do recobrimento proteico foi determinada de forma qualitativa e quantitativa, ambas realizadas no Laboratório de Bromatologia (UFPE/CAV).

A determinação qualitativa da eficiência consistiu na análise colorimétrica específica para proteínas com o corante Coomassie Brilliant Blue – G250 segundo HE (2011). Para isto, soluções corante e descorante foram preparadas, sendo a solução corante composta de metanol (90 mL), ácido acético glacial (10ml) e 0,25g do corante; e a solução descorante composta das mesmas quantidades de metanol e ácido acético glacial com a ausência do corante.

Para o procedimento, as micropartículas foram mantidas em solução corante por 24h sob refrigeração ( $6 \pm 2$  °C), em seguida foram filtradas e transferidas para a solução descorante, onde foram mantidas por 24h sob refrigeração ( $6 \pm 2$  °C). O processo de descoloração das partículas foi realizado duas vezes a fim de garantir a remoção de possível corante fixo na superfície das partículas. A leitura do resultado foi observada a olho nu e através de microscopia óptica, verificando-se micropartículas com coloração azul quando

recobertas por proteína do soro do leite.

Por outro lado, a determinação quantitativa da eficiência foi realizada pelo método de Kjeldhal (AOAC, 1995), usando o fator de correção de nitrogênio-proteína de 6,38.

## **2.6 Eficiência de encapsulação (EE %)**

A EE% foi calculada pela quantificação dos compostos fenólicos presentes na superfície e no interior das micropartículas, segundo o método proposto por Rutz et al. (2013). As análises realizadas, no Laboratório de Bromatologia e Multifuncional 2 (UFPE/CAV), para este fim estão expressas na figura 1.

Para isso, foram pesados 0,1 g de micropartículas e distribuídas em um balão volumétrico com 10 mL de metanol. Em seguida, foi realizada uma ligeira homogeneização manual e extraído 0,2 mL do sobrenadante da solução inicial, este volume foi agitado em vórtex por 1 min e destinado à análise do método de Folin-Ciocalteu (RUTZ et al., 2013), resultando no valor de compostos fenólicos de superfície.

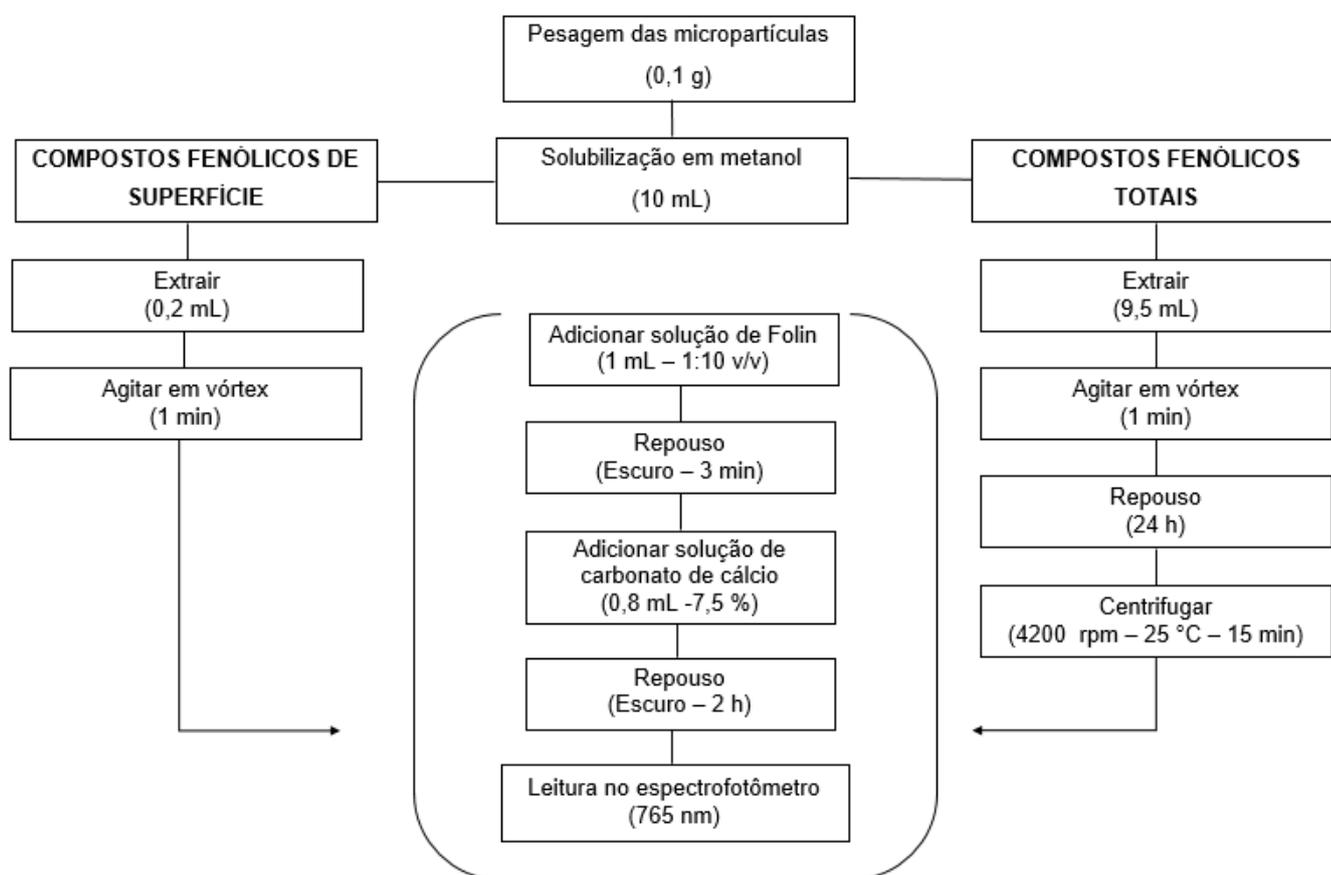
Os compostos fenólicos totais foram determinados ao extrair 9,5 mL da solução inicial do balão volumétrico para um tubo de ensaio e homogeneizada em vórtex (Marconi) por 1 min e mantida em repouso por 24 h. Posteriormente a solução foi centrifugada a 4200 rpm por 15 min a 25 °C e por fim destinado a análise do método de Folin-Ciocalteu (RUTZ et al., 2013).

A análise do conteúdo fenólico através do método de Folin-Ciocalteu foi realizada segundo RUTZ et al. (2013) com algumas modificações. Das soluções dos compostos fenólicos de superfície e totais contidas nos tubos de ensaios foram adicionados 1 mL de solução de Folin 0,25 M diluída a 1:10 (v/v). Após 3 minutos no escuro, foram adicionados a cada tubo 0,8 mL de carbonato de sódio a 7,5 % e mantidos por 2 horas no escuro a temperatura ambiente. Em seguida, foi realizada a medida de absorvância em espectrofotômetro no comprimento de onda de 765 nm.

Usou-se a equação (1) seguinte para quantificar em percentual a EE (Eficiência de Encapsulação), considerando o conteúdo de compostos fenólicos presentes na superfície e dentro das micropartículas obtidos na leitura espectrofotométrica:

$$EE = \frac{\text{Compostos fenólicos totais} - \text{Compostos fenólicos da superfície}}{\text{Compostos fenólicos totais}} \times 100 \quad (1)$$

Para esta determinação foi utilizada uma curva padrão preparada com ácido gálico através da representação gráfica da absorbância em função da concentração e foi encontrada a equação linear ( $y = 0,012x - 0,032$ ,  $R^2 = 0,9967$ ). O teor total de fenol no extrato foi expresso em termos de equivalente de ácido gálico (mg EAG/g de extrato).



**Figura 1.** Fluxograma das análises de eficiência de encapsulação das micropartículas.

## 2.7 Caracterização das micropartículas

### 2.7.1 Microscopia óptica (MO)

A caracterização por meio da microscopia óptica foi realizada, no Laboratório de Microscopia (UFPE/CAV), com as partículas em dispersão, onde

uma gota da solução de cloreto de cálcio contendo as mesmas foi depositada em lâmina coberta por lamínula. As micrografias ópticas foram realizadas em um microscópio óptico (OPTON – TIM 2008) acoplado em um sistema de aquisição de imagens digitais.

#### 2.7.2 *Microscopia eletrônica de varredura (MEV)*

A avaliação morfológica por meio do MEV foi realizada no Laboratório de Instrumentação e Análise localizado Centro de Apoio à Pesquisa (CENAPESQ) – UFRPE. A desidratação das micropartículas foi realizada em dessecador por 24 horas. Então as amostras foram dispostas em stubs sobre fita de carbono e metalizadas a vácuo (Denton Vacuum, Disk V, EUA). Utilizou-se microscópio óptico de varredura (Tescan, MLU, VEGA3) com voltagem de 30kV.

#### 2.7.3 *Tamanho de micropartícula, índice de polidispersão e potencial zeta*

As micropartículas foram caracterizadas quanto ao tamanho e índice de polidispersão (expressos como tamanho médio) e quanto a carga superficial (através do potencial zeta) pela técnica de espalhamento dinâmico de luz (DLS) utilizando o equipamento *Nano Brook Zeta Plus Zeta Potential Analyzer* (Brookhaven, EUA). Para cada medição, 10 µL das amostras foram diluídos (v/v) em 2 mL de água destilada em pH neutro (~ 7,0). O experimento foi realizado quatro vezes utilizando preparações distintas para as micropartículas sem e com recobrimento proteico.

#### 2.7.4 *Atividade antimicrobiana*

As análises referentes à atividade antimicrobiana foram realizadas no Laboratório de Microbiologia de Alimentos, localizado no Centro Acadêmico de Vitória (UFPE/CAV). O efeito antimicrobiano foi determinado através das análises de Concentração Inibitória Mínima (CIM) utilizando as cepas padrão das espécies de bactéria *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Esherichia coli* ATCC 8739, *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 e *Listeria monocytogenes* ATCC 3533. Os resultados do CIM foram expressos em mg.mL<sup>-1</sup>.

A avaliação do efeito antimicrobiano foi determinada com as com as micropartículas vazias (sem o eugenol), micropartículas de eugenol sem o revestimento proteico, micropartículas de eugenol recobertas com WPI e com o

eugenol livre por meio de duas metodologias.

As bactérias foram mantidas sob refrigeração ( $6 \pm 2$  °C) em meio sólido inclinado TSB (Tryptic Soy Broth), realizando-se frequente renovação e manutenção da cultura, após a ativação da cultura estoque liofilizada. Para realizar a reativação, cada cepa bacteriana foi transferida, com auxílio de alça de platina, para tubos de ensaio com meio sólido inclinado TSB e incubadas em estufa durante 24 h a 37 °C. Em seguida, uma alçada foi extraída e ressuspendida em água destilada esterilizada, a qual foi padronizada na concentração equivalente ao tubo 0,5 da escala de McFarland ( $1,5 \times 10^8$  UFC/mL<sup>-1</sup>) através da leitura espectrofotométrica a 630 nm para confirmação da concentração de microrganismos na suspensão.

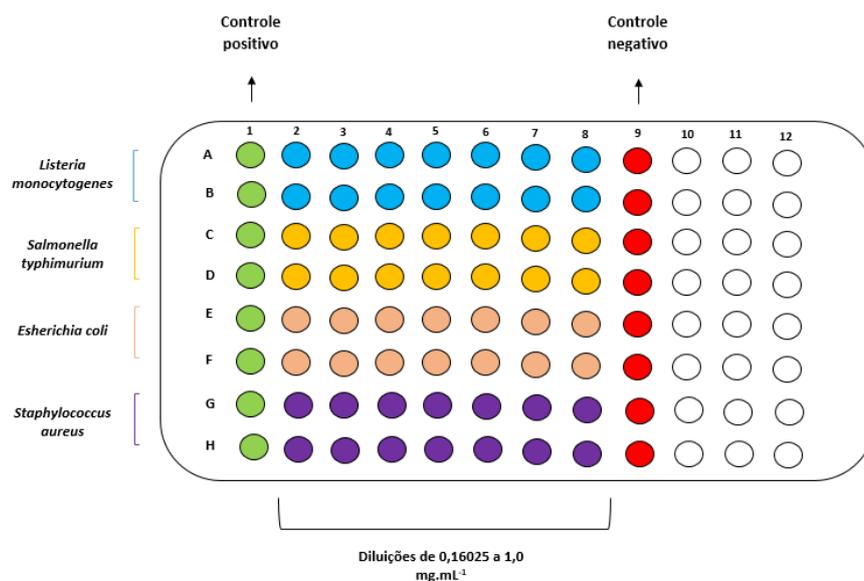
#### 2.7.4.1 Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi determinada pela técnica de diluição em microplacas (96 poços) de acordo com a metodologia descrita segundo a norma M7-A6 do Manual Clinical And Laboratory Standards Institute (CLSI, 2019).

Os poços das microplacas foram preenchidos com 80 µL de caldo Mueller Hinton. Em seguida cada antimicrobiano (eugenol livre e encapsulado) foi diluído em Tween 80 a 0,02%, de onde foram transferidos (100 µL) para seus respectivos poços para alcance da diluição seriada de 0,01 a 1,0 mg.mL<sup>-1</sup>. Adicionalmente foram distribuídos 20 µL das suspensões bacterianas em cada poço das microplacas.

Como controle negativo foram utilizados os antimicrobianos (micropartículas vazias – com e sem recobrimento proteico, micropartícula sem recobrimento proteico, micropartícula com recobrimento proteico e o eugenol livre - óleo) e o meio de cultura (caldo Mueller Hinton). Enquanto o controle positivo foi composto pelo meio de cultura (caldo Mueller Hinton) e a suspensão bacteriana.

Após o preparo, as misturas em teste foram avaliadas em leitor espectrofotômetro de microplacas BIOTEK Elx808 a 630 nm, determinando a leitura no tempo inicial (0 h), 24 h, 48 h e no tempo final (72 h).



**Figura 2.** Determinação da Concentração Inibitória Mínima.

A partir das leituras espectrofotométricas foi determinada a concentração inibitória mínima onde não houve crescimento bacteriano para cada microrganismo diante os antimicrobianos testados.

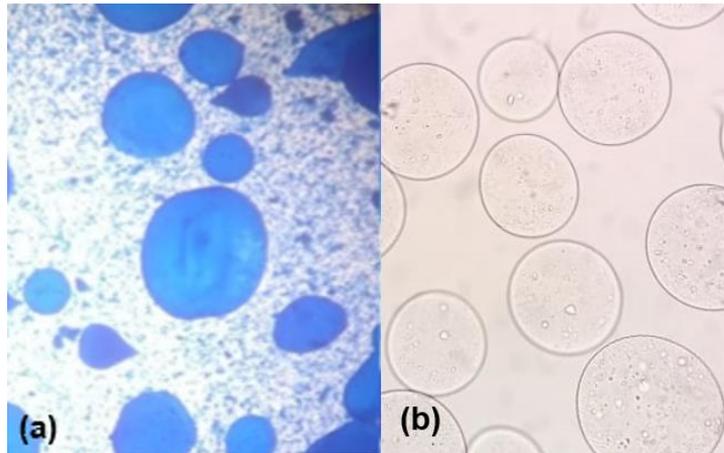
## 2.8 Análise estatística

Os experimentos foram realizados em triplicata e as análises estatísticas foram realizadas com estatística descritiva (média e desvio padrão).

## 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.1 Eficiência do recobrimento proteico

A determinação qualitativa da eficiência do recobrimento proteico permitiu observar que as micropartículas alteraram a sua coloração para azul. Desta forma, como o corante utilizado é específico para proteínas, esta mudança na coloração demonstra que houve fixação da proteína na parede das micropartículas sugerindo que houve uma boa eficiência de recobrimento. Ao comparar com a coloração de micropartículas sem o revestimento com proteína do soro do leite isolada submetidas ao mesmo método, é notório a ausência de cor azul, como mostra a Figura 3.



**Figura 3.** Micrografias ópticas das micropartículas com recobrimento proteico (a) e sem recobrimento proteico (b) coradas com Coomassie Brilliant Blue.

A determinação quantitativa da eficiência de recobrimento proteico a partir do método Kjeldhal (AOAC, 1995) usando o fator de correção de nitrogênio-proteína de 6,38 permitiu quantificar o percentual de proteína das micropartículas que resultou em 16 %.

Como as micropartículas formadas por gelificação iônica são porosas, devido a possibilidade de ocorrer além das interações eletrostáticas, ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas proteína-polissacarídeos, as moléculas de proteína também podem penetrar nos poros das micropartículas resultando em um baixo percentual de adsorção proteica (ARANHA, 2015).

Neste sentido, AGUILAR et al. (2015) observou que a quantidade de proteína adsorvida nas micropartículas aumentou à medida que a concentração proteica na solução era maior, independentemente do tipo de proteína utilizada. Nas concentrações de 1,7 %, 3 % e 4 % a quantidade adsorvida de proteína do soro do leite concentrada (pH 3,75) foi de  $38,8 \pm 4,7$  %,  $46,1 \pm 2,1$  % e  $59,2 \pm 1,9$  %, enquanto que quando as proteínas da clara de ovo (pH 3,50) foram utilizadas, as quantidades adsorvidas foram de  $25,7 \pm 1,4$  %,  $33,1 \pm 2,2$  % e  $45,5 \pm 2,8$  %

Ao avaliar a adsorção de proteína do soro de leite e proteínas da clara do ovo em micropartículas à base de alginato e pectina, Tello et al. (2015) obteve resultados de adsorção proteica superiores nas micropartículas de pectina (~ 62 %) do que nas micropartículas de alginato (~ 60 %) utilizando 8% de dispersão proteica.

### **3.2 Eficiência de encapsulação**

A eficiência de encapsulação foi determinada de acordo com a presença de compostos fenólicos nas micropartículas, a qual foi expressa em percentual. As micropartículas com recobrimento proteico e sem recobrimento proteico obtiveram valores médios de eficiência de encapsulação de 84,3% e 86,4%, sendo considerada uma alta faixa de encapsulação.

Este parâmetro é influenciado por diversos fatores e um deles é a escolha do emulsificante. O uso destes agentes surfactantes, como o Tween 80 utilizado no presente estudo, auxilia na estabilização da emulsão, facilitando a dispersão do óleo em pequenas gotas na fase aquosa e conseqüentemente pode favorecer o aumento da EE % no composto ativo (GALLO, 2019).

Com base nisto, RADÜNZ et al. (2019) ao elaborarem micropartículas de alginato por gelificação iônica para encapsular óleo essencial de cravo-da-índia, obtiveram variação no valor de EE % ao utilizarem emulsificantes diferentes. Quando fizeram uso de monolaurato de polioxietileno de sorbitana encontraram EE de 83,6 % e obtiveram valores superiores ao utilizarem monoésteraro de glicerol (92,1 %), havendo diferença significativa na eficiência de encapsulação em função da utilização de diferentes emulsificantes.

Assim como a seleção do surfactante, a temperatura também é um fator que influencia diretamente na eficiência de encapsulação. No presente estudo, as emulsões destinadas a produção das micropartículas foram preparadas em banho de gelo a fim de dar estabilidade às mesmas. Nesta perspectiva, MENDES et al. (2012) constataram que a baixa temperatura estabilizava as partículas mantendo mais óleo em seu interior obtendo valores de 31,2% a 43,1%, valores estes atribuídos paralelamente a diferença de material de parede utilizado.

### **3.3 Caracterização das micropartículas**

#### *3.3.1 Tamanho médio*

O tamanho das micropartículas sofreu mudança após o processo de recobrimento proteico, visto que a média aumentou de  $1,17 \pm 0,3 \mu\text{m}$  para  $1,33 \pm 0,5 \mu\text{m}$ . Nesta perspectiva, é ressaltada a capacidade da concentração de

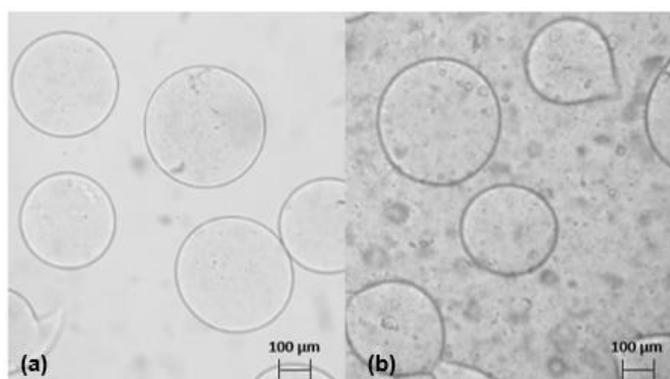
proteína utilizada assim como do tempo de imersão na dispersão proteica em influenciar o tamanho das micropartículas após o processo de recobrimento podendo resultar em seu aumento (SILVA, 2016).

Autores como TELLO et al. (2015) e BENAVIDES et al. (2016) perceberam o aumento no diâmetro de suas micropartículas, tal fato atribuído ao aumento da concentração proteica utilizada (2 a 8 %) bem como ao aumento da concentração de óleo essencial (1 a 3 %) utilizado na formulação. No entanto, GALLO (2019) ao recobrir micropartículas de alginato óleo essencial de orégano, por gelificação iônica, com 4 % de proteína do soro lácteo concentrada, não observou aumento do tamanho médio das amostras sem e com recobrimento.

O índice de polidispersão encontrados no presente estudo revela a similaridade entre as micropartículas recobertas com proteína das amostras correspondentes às formulações estudadas, haja vista que o seu valor médio foi de  $0,32 \pm 0,01$ . SILVA (2016) destaca que a uniformidade, bem como o tamanho reduzido das micropartículas formadas no encapsulador é prevista, pois o uso deste equipamento garante menor diâmetro e maior homogeneidade das micropartículas. Neste sentido, o uso de micropartículas (1  $\mu\text{m}$  a 1000  $\mu\text{m}$ ) é desejável para a aplicação em alimentos devido a sua incorporação causar menor alteração nas características sensoriais e propriedades de textura do produto (SILVA, 2016).

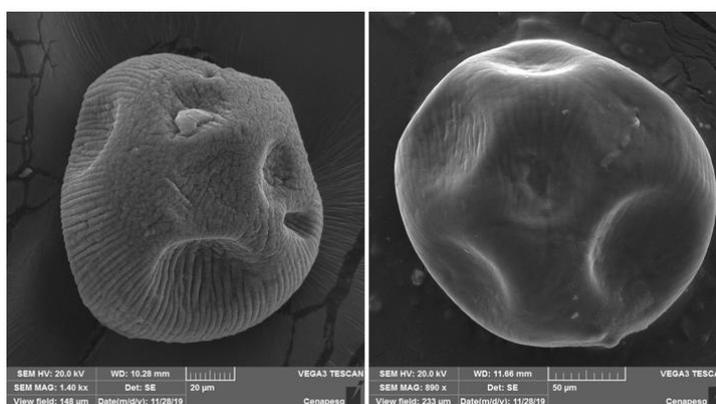
### 3.3.2 Morfologia

Verificou-se que houve uma uniformidade para tendência ao formato esférico entre as micropartículas (Figura 4).



**Figura 4.** Micrografias ópticas das micropartículas de eugenol sem recobrimento proteico (a) e das micropartículas de eugenol com recobrimento proteico (b).

Ainda, o processo de recobrimento resultou no aumento da espessura da parede das micropartículas. Tais resultados eram previstos com base no fato de que o processo de microencapsulação permite a formação de micropartículas com morfologia esférica e a adição de componentes pode influenciar a espessura da superfície das mesmas (GALLO, 2019).



**Figura 5.** Imagens obtidas por microscópio eletrônico de varredura das micropartículas de eugenol sem recobrimento proteico (a) e das micropartículas de eugenol com recobrimento proteico (b).

Quanto a superfície (Figura 5), as micropartículas apresentaram irregularidades exibindo abaulamento. As micropartículas sem recobrimento demonstraram um aspecto rugoso, o qual foi amenizado pelo processo de recobrimento proteico.

Estas características irregulares são amplamente mencionadas na literatura, visto que as amostras destinadas a técnica de MEV além de serem secas previamente são submetidas a um vácuo a fim de metalizá-las. Desta forma, as micropartículas tendem a perder o seu aspecto esférico, visto que não apresentam resistência total ao processo de secagem, ocorrendo perda de água e redução na porosidade da superfície (TELLO et al., 2015).

As alterações supracitadas percebidas no presente estudo se assemelham ao que foi encontrado por outros autores, como AGUILAR et al. (2015), que mencionaram a presença de inconstância na superfície das micropartículas recobertas com proteína do soro do leite e não observaram diferenças significativas com as micropartículas sem este recobrimento. Assim

como GALLO (2019), que ao submeter suas partículas a secagem, verificou mudanças na superfície, deixando-as com irregularidades e com presença de trincas superficiais.

### 3.3.3. *Potencial zeta*

Os valores de potencial zeta das micropartículas sem recobrimento proteico foram similares as amostras correspondentes à formulação estudada, apresentando valor de  $-5,86 \pm 1,75$  mV. A carga negativa destas micropartículas está atribuída ao fato de que o alginato de sódio, material de parede utilizado em sua formulação, é um polieletrólito aniônico e a sua carga líquida negativa é proveniente dos grupamentos carboxilas carregados negativamente ( $\text{COO}^-$ ) ao longo dos blocos D-manurônico e L-gulurônico (BAJPAI;TANKHIWALE, 2006; FEDALTO et al., 2017).

Ao recobrir as micropartículas o valor encontrado para o seu potencial zeta foi de  $-15,28 \pm 0,50$  mV. Logo, não houve alteração na carga líquida quando comparado as micropartículas sem cobertura, no entanto houve a diminuição deste valor. Estas cargas elétricas das micropartículas revestidas com WPI são controladas pelo grau de ionização dos grupos amino ( $\text{NH}_2$ ) e grupos carboxila ( $-\text{COOH}$ ) das moléculas de proteína, dependendo do pH da fase aquosa sobrenadante (SILVA, 2016).

Neste sentido, quando o pH se encontra inferior ao ponto isoelétrico da proteína, os grupos amino apresentam-se carregados positivamente ( $-\text{NH}_3^+$ ), enquanto os grupos carboxila são neutros ( $-\text{COOH}$ ). Quando há o aumento deste pH, a magnitude da carga positiva da solução diminui, porque os grupos carboxila se encontram carregados negativamente ( $-\text{COO}^-$ ) e alguns grupos amino tornam-se neutros ( $-\text{NH}_2$ ). Em seguida, há um equilíbrio entre os grupos carregados positivamente e os grupos carregados negativamente, no qual a carga elétrica da proteína torna-se zero. Considerando um aumento adicional no pH, as proteínas apresentarão carga líquida negativa, que aumentará à medida que o número de grupos carboxila de carga negativa aumento e o número de grupos amino carregados positivamente diminui (KULMYRZAEV et al., 2000).

Desta forma, considerando que o ponto isoelétrico das proteínas do soro do leite isolada são de 4,6 a 5,6 e o pH da fase aquosa para realizar a análise de potencial zeta era neutro ( $\sim 7,0$ ), as proteínas apresentaram carga líquida negativa visto que o número de grupos carboxila de carga negativa era maior que os grupos amino carregados positivamente (KULMYRZAEV et al., 2000; SILVA, 2016).

### **3.4 Atividade antimicrobiana**

Os resultados da atividade antibacteriana de eugenol livre (OL), encapsulado sem cobertura (PS), encapsulado com cobertura (PC) e encapsulado vazio (PV) na inibição de *Staphylococcus aureus*, *Esherichia coli*, *Salmonella typhimurium* e *Listeria monocytogenes* estão apresentados na tabela 1.

O eugenol em sua forma livre (óleo) obteve ação antibacteriana similar frente à todas as cepas estudadas no decorrer do tempo avaliado. Desta forma, o eugenol apresentou atividade antimicrobiana com efeito inibitório de  $1 \text{ mg.mL}^{-1}$ , sendo esta a maior concentração testada. Quando a eficiência da ação frente aos microrganismos, Duarte et al. (2006) destacam que para um óleo ter uma forte atividade antimicrobiana deve apresentar CIM de até  $0,5 \text{ mg.mL}^{-1}$ ; enquanto os valores entre  $0,6$  e  $1,5 \text{ mg.mL}^{-1}$  correspondem a uma atividade moderada; e acima de  $1,6$  a uma fraca atividade. Com base nesta afirmação, é possível considerar que o OL demonstrou possuir atividade moderada contra as cepas bacterianas testadas.

Este efeito também é observado por outros autores no óleo essencial de cravo-da-índia, do qual o eugenol é o componente majoritário. Neste sentido, RADÜNZ et al. (2019) ao avaliar a atividade antimicrobiana *in vitro* do óleo essencial de cravo-da-índia frente as mesmas espécies bacterianas avaliadas neste estudo observaram efeito inibitório até a concentração de  $0,3047 \text{ mg.mL}^{-1}$ , o qual é classificado segundo Duarte et al. (2006) como uma forte atividade antimicrobiana. Os autores atribuíram os resultados encontrados à composição química deste óleo essencial.

Quanto ao eugenol de forma isolada, o seu efeito na inibição de bactérias está atribuído aos fenóis devido à degeneração proteica que resulta em danos à

membrana celular do microrganismo. No entanto, quando utilizado em baixas concentrações o eugenol tende apenas a estabilizar as membranas celulares das bactérias (ESCOBAR, 2002).

No presente estudo, não foi observado diferenças significativas na ação do OL diante as bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Porém, de uma forma geral, o eugenol apresenta maior eficácia contra às espécies bacterianas Gram-positivas. No entanto, os compostos não fenólicos presentes em menor quantidade em sua composição são mais efetivos contra as bactérias Gram-negativas (MACHADO et al., 2011).

Nesta perspectiva, o estudo de SILVESTRI et al (2010) observou que diante as bactérias Gram-positivas foi possível obter valores de concentração inibitória mínima de 0,3 mg.mL<sup>-1</sup> para *Staphylococcus aureus* ao avaliar a atividade *in vitro* de óleo essencial de cravo-da-índia, sendo superior a CIM do eugenol do presente estudo. Enquanto OLIVEIRA et al. (2013) observou valores de CIM entre 0,4 e 0,5 mg.mL<sup>-1</sup> para *Listeria monocytogenes* em um estudo *in vitro* com óleo essencial de cravo-da-índia.

Em relação às bactérias gram-negativas, RADÜNZ et al. (2019) obteve valor de CIM de 0,3 mg.mL<sup>-1</sup> em estudo *in vitro* com o óleo essencial de cravo-da-índia para *Escherichia coli*. Por outro lado, SILVA et al. (2015) encontrou valor de 0,5 mg.mL<sup>-1</sup> em estudo com o mesmo óleo e para a mesma espécie bacteriana. Os valores de CIM atribuídos à *Salmonella typhimurium* na literatura apresentam grande variedade, encontrando valores de 0,04 e até mesmo de 0,8 mg.mL<sup>-1</sup> (SCHERER et al., 2009; BERALDO et al., 2013).

Deste modo, a razão das diferenças entre os valores de CIM encontrados nos estudos citados provêm de alguns fatores que podem interferir no resultado obtido por meio de métodos tanto de difusão como de diluição, como: condição de cultivo da amostra (tempo de incubação, temperatura, meio de cultura), concentração das substâncias ativas testadas e diferença nos métodos aplicados (RIO e RECIO, 2005).

O encapsulado sem cobertura (PS) apresentou ação antimicrobiana durante todo período de incubação. Os valores médios de CIM destas micropartículas variou entre as quatro cepas bacterianas testadas. A

encapsulação do OL permitiu a potencialização da sua ação antimicrobiana, visto que dentre as variações dos valores das concentrações inibitórias mínimas encontradas houve inibição após 24 h de incubação em 0,03 mg.mL<sup>-1</sup>. Enquanto no óleo livre, as concentrações para estas cepas mesmo após este período de incubação se mantiveram na maior concentração testada (1 mg.mL<sup>-1</sup>).

De forma geral, houve variações nos valores médios de atividade antimicrobiana, onde ocorreu a redução supracitada para as cepas de *E. coli* e *S. aureus*. Por outro lado, foi observado semelhança em relação ao OL na capacidade inibitória para as cepas de *L. monocytogenes* e *S. enteritidis*. Estas variações citadas podem ser conferidas ao sistema de liberação controlada das micropartículas, onde a substância ativa é disponibilizada no meio em função do tempo (de forma tardia ou contínua), sendo dependente de fatores como o material encapsulante, morfologia e as próprias condições do meio (ex. temperatura e pH) (MADERUELO et al., 2011; BAKRY et al., 2016).

Assim como encontrado no presente estudo, RANDÜNZ et al. (2019) identificaram que a encapsulação potencializou o efeito antimicrobiano em relação ao óleo puro, podendo ter ocorrido a alteração da hidrofobicidade do óleo. No entanto, o estudo supracitado verificou distintas concentrações inibitórias mínimas para os quatro microrganismos avaliados, diferentemente do que ocorreu no presente estudo que apresentou similaridade entre os valores de CIM para as bactérias em função do tempo das leituras.

Entre as bactérias Gram-positivas, o eugenol encapsulado (PS) apresentou valores da atividade antibacteriana após 24 h de incubação de 0,03 mg.mL<sup>-1</sup> para *Staphylococcus aureus*, sendo considerado como uma forte atividade antimicrobiana segundo Duarte et al. (2006). Em estudos realizados com o óleo essencial de cravo-da-índia encapsulado foram encontrados valores de CIM entre 0,2 e 0,8 mg.mL<sup>-1</sup> para *Staphylococcus aureus* e valores de 7,9 a 23,6 mg.mL<sup>-1</sup> para *Listeria monocytogenes* (HILL et al., 2012; MENESES, 2016). Por outro lado, PILETTI (2016) ao encapsular eugenol com ciclodextrina revestido com polimetilmetacrilato obteve valores de CIM *in vitro* para *Staphylococcus aureus* entre 0,6 e 1,2 mg.mL<sup>-1</sup>.

A classificação de forte atividade antimicrobiana também foi observada para a ação do eugenol encapsulado para a bactéria Gram-negativas *Escherichia coli*, a qual o OS foi capaz de inibir na concentração de 0,03 mg.mL<sup>-1</sup>. Esta mesma capacidade deixou de ser vista na cepa de *Salmonella enteritidis* após 24 h de incubação.

Para as bactérias Gram-negativas, PILETTI (2016) obteve valores de CIM para *Escherichia coli* entre 1,2 e 2,5 mg.mL<sup>-1</sup>, enquanto estudos realizados com o óleo essencial de cravo-da-índia encapsulado apresentaram valores entre 0,2 e 0,9 mg.mL<sup>-1</sup> para *Escherichia coli* e de 0,6 mg.mL<sup>-1</sup> para *Salmonella typhimurium* (HILL et al., 2012; MENESES, 2016).

Porventura as diferenças de CIM entre os resultados encontrados e os presentes nos estudos disponíveis na literatura se dão pela escolha do material de parede, substância ativa (óleo e/ou composto ativo), concentração da substância ativa, técnicas de encapsulação, tamanho das partículas, eficiência de encapsulação e interações entre o material ativo e os materiais encapsulantes (RADÜNZ et al., 2019).

O encapsulado com cobertura apresentou, assim como as demais, atividade antimicrobiana contra todas as cepas bacterianas estudadas. Além disso, foi identificado que o recobrimento proteico potencializou o efeito antimicrobiano, visto que os resultados da concentração inibitória mínima foram inferiores em relação às micropartículas sem recobrimento e ao eugenol livre após 24 h de incubação.

A potencialização do efeito antimicrobiano observado no PC é possivelmente atribuída ao processo de recobrimento proteico por interação eletrostática o que resulta em micropartículas mais protéticas, visto que a técnica de gelificação iônica produz micropartículas porosas. Estes resultados, de maior inibição microbiana, também podem estar atribuídos a propriedade antibacteriana da proteína do soro lácteo. Esta proteção adicional também foi observada por SILVERIO et al. (2018) ao produzir e caracterizar micropartículas de alginato por gelificação iônica de concentrado proteico de soja.

A fim de melhorar o efeito protetivo, de forma a favorecer a viabilidade de probióticos, MENEZES et al. (2019) realizaram gelificação iônica externa, de

forma semelhante ao presente estudo, mas utilizando pectina com multicamadas de proteína de soro de leite. Com isto, foi possível identificar a eficácia desta técnica de encapsulação, inferindo maior proteção e consequente favorecimento de viabilidade dos probióticos.

Ao encapsular eugenol por spray-drying usando proteína do soro do leite isolada, lecitina de soja e quitosana TALÓN et al. (2019) não identificaram efeito antibacteriano com a utilização de quitosana em todas as concentrações testadas contra *Escherichia coli* e *Listeria innocua*. Por outro lado, foi obtido valores de CIM com o uso de WPI, sendo estes valores significativamente semelhantes ao uso da lecitina de soja nestas condições.

O encapsulado vazio (PV) (com e sem recobrimento proteico), apesar de não conter o antimicrobiano (eugenol), foram capazes de inibir o crescimento bacteriano nas primeiras 24 h na maior concentração (menor diluição) avaliada ( $1 \text{ mg.mL}^{-1}$ ) frente às cepas *S. enteritidis*, *E. coli* e *S. aureus*.

Neste contexto é relevante considerar os materiais que as compõem, pois, diferentemente, na avaliação da atividade antibacteriana *in vitro* de micropartículas vazias de alginato mas recobertas com quitosana, BARBIZAN (2019) observou que não houve interferência destas no crescimento dos microrganismos avaliados em seu estudo (*Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*) realizando a leitura a 600 nm após 24 h de incubação.

Assim sendo, sugere-se que a propriedade antibacteriana atribuída ao alginato de sódio e proteína do soro do leite possivelmente favoreceu a inibição do crescimento dos microrganismos nas primeiras 24 h de incubação. O polímero utilizado como material de parede interfere no crescimento bacteriano através da imobilização das bactérias em sua matriz fibrosa. A presença de peptídeos bioativos nas proteínas do soro lácteo atuam como agentes antimicrobianos contra bactérias patogênicas, como *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* (GEORGE e ABRAHAM, 2006; HARAGUCHI et al., 2006; MA et al., 2007; WIEGAND e HIPLER, 2010).

**Tabela 1.** Concentração inibitória mínima (CIM) em mg.mL<sup>-1</sup> do eugenol livre (OL), encapsulado sem cobertura (PS), encapsulado com cobertura (PC) e encapsulado vazio (PV).

Tratamento	CIM
	24h
<b>OL</b>	
<i>Listeria monocytogenes</i>	1
<i>Salmonella typhimurium</i>	1
<i>Escherichia coli</i>	1
<i>Staphylococcus aureus</i>	1
<b>PS</b>	
<i>Listeria monocytogenes</i>	1
<i>Salmonella typhimurium</i>	1
<i>Escherichia coli</i>	0,03
<i>Staphylococcus aureus</i>	0,03
<b>PC</b>	
<i>Listeria monocytogenes</i>	1
<i>Salmonella typhimurium</i>	≤0,01
<i>Escherichia coli</i>	≤0,01
<i>Staphylococcus aureus</i>	0,03
<b>PV</b>	
<i>Listeria monocytogenes</i>	-
<i>Salmonella typhimurium</i>	1
<i>Escherichia coli</i>	1
<i>Staphylococcus aureus</i>	1

OL: Óleo livre; PS: Partícula sem cobertura; PC: Partícula com cobertura; PV: encapsulado vazio

#### **4 CONCLUSÃO**

A técnica de recobrimento por interação eletrostática com proteína do soro lácteo isolada promoveu aumento do tamanho e diminuição da rugosidade das micropartículas de eugenol elaboradas com alginato de sódio e Tween 80, e não alterou a carga líquida destas micropartículas. As micropartículas com recobrimento proteico se mostraram mais eficazes na inibição do crescimento dos microrganismos testados em função dos compostos fenólicos presentes no óleo, principalmente quando submetidas a mais tempo de exposição às bactérias, tendo efeito bacteriostático e bactericida na dependência da concentração usada. Desta forma, é destacada a viabilidade da obtenção de eugenol encapsulado para uso como conservante natural através da técnica de microencapsulação por gelificação iônica externa associada ao recobrimento proteico com proteína do soro do leite isolada.

## 5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUILAR, K.C.; TELLO, F.; BIERHALZ, A.C.K.; ROMO, M.G.G.; FLORES, H.E.M.; GROSSO, C.R.F. Protein adsorption onto alginate-pectin microparticles and films produced by ionic gelation. **Journal of Food Engineering**, v.154, p.17-24, 2015.

AOAC. **Association of Official Analytical Chemists. Official methods of analysis of the AOAC International**. 16<sup>th</sup> ed. Arlington, 1995.

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

BAJPAI, S.K.; TANKHIWALE, R. Investigation of water uptake behavior and stability of calcium alginate/chitosan bi-polymeric beads: Part-1. **Reactive & Functional Polymers**, v. 66, p. 645-658, 2006.

BARBIZAN, O.A. Produção e avaliação de micropartículas de alginato contendo bacitracina de zinco, berberina e nitroprussiato de sódio recobertas por quitosana para tratamento de bacterioses extraídas de peixes. 135f. Tese (Doutorado em Nanociência e Nanobiotecnologia). Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, 2019.

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

BERALDO, C.; DANELUZZI, N.S.; SCANAVACCA, J.; DOYAMA, J.T.; FERNADES JÚNIOR, A.; MORITZ, C.M.F. Eficiência de óleos essenciais de canela e cravo-da-índia como sanitizantes na indústria de alimentos. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 43, p. 436 – 440, 2013.

BRASIL. Ministério da Saúde. Surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos no Brasil: Informe 2018. Disponível em: <<http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2019/fevereiro/15/Apresenta----o-Surtos-DTA---Fevereiro-2019.pdf>> Acesso em: agosto, 2019.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Surtos por doenças transmitidas por alimentos**. Disponível em: <<http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2016/junho/08/Apresenta----o-Surtos-DTA-2016.pdf>>. Acesso em: julho, 2018.

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

CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 29<sup>th</sup> ed. CLSI supplement M100. Wayne, PA, 2019.

DUARTE, M.C.T.; LEME, C.; FIGUEIRA, G.M.; SARTORATTO, A.; REHDER, V.L.G. Effects of essential oils from medicinal plants used in Brazil against epec and etec *Escherichia coli*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 8, p. 139-143, 2006.

ESCOBAR, R.G. Eugenol: propriedades farmacológicas y toxicológicas. Ventajas y desventajas de su uso. **Revista Cubana de Estomatología**, v. 39, n. 2, 2002.

FEDALTO, M.B.; SANTOS, A.C.; SANSÃO, B.S.; ZANIN, S.M.W.; MIGUEL, M.D.; RIBEIRO, A.J.; Obtenção de nanopartículas biodegradáveis de ibuprofeno encapsuladas por “layer-by-layer (LBL) self-assembly” – camada por camada auto-estruturadas. **Visão Acadêmica**, Curitiba, v. 18, n. 4, Out – Dez, 2017.

FUSTIER, P.; ACHOURI, A.; TAHERIAN, A.R.; BRITTEN, M.; PELLETIER, M.; SABIK, H.; VILLENEUVE, S.; MONDOR, M. Protein-protein multilayer oil-in-water emulsions for the microencapsulation of flaxseed oil: effect of whey and fish gelatin concentration. **J. Agric. Food Chem.**, v.63, p.9329-9250, 2015.

GALLO, T.C.B. Transferência de massa e cinética de liberação de óleo essencial de orégano encapsulado pelos métodos de gelificação iônica e coacervação complexa. 111f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos). Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, São José do Rio Preto, 2019.

GEORGE, M.; ABRAHAM, T.E. Polyonic hydrocolloids for the intestinal delivery of protein drugs: Alginate and chitosan – a review. **Journal of Controlled Release**, v. 114, p. 1 – 14, 2006.

GUDIÑA, E.J.; ROCHA, V.; TEIXEIRA, J.A.; RODRIGUES, L.R. Antimicrobial and antiadhesive properties of a biosurfactante isolated from *Lactobacillus paracasei* ssp. *Paracasei* A20. **Letters in Applied Microbiology**, v. 50, n. 4, p. 419-424, 2010.

HARAGUCHI, F.K.; ABREY, 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, n. 4, Campinas, 2006.

HILL, L.E.; 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. **LWT – Food Science and Technology**, v. 51, p. 86 – 93, 2012.

HOLKEM, A.T.; CODEVILLA, C.F.; MENEZES, C.R. Emulsificação/gelificação iônica interna: alternativa para microencapsulação de compostos bioativos. **Ciência e Natura**, v.37, p.116-124, 2015.

KULMYRZAEV, A.; CHANAMAI, R.; MCCLEMENTS, D.J. Influence of pH and CaCl<sub>2</sub> on the stability of dilute whey protein stabilized emulsions. **Food Research International**, v. 33, p. 15-20, 2000.

MA, L.; YU, W.; MA, X. Preparation and characterization of novel sodium alginate/chitosan two ply composite membranes. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 106, p. 394 – 399, 2007.

MACHADO, T. F.; BORGES, M.F.; BRUNO, L.M. Aplicação de Antimicrobianos Naturais na Conservação de Alimentos. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), Agroindústria Tropical. Fortaleza, 2011.

MAJEED, H.; BIAN, Y.; ALI, B.; JAMIL, A.; MAJEED, U.; KHAN, Q.F.; IQBAL, J.; SHOEMAKER, C.F.; FANG, Z. Essential oil encapsulations: uses, procedures, and trends. **Royal Society of Chemistry**, v.5, p.58449-58463, 2015.

MENDES, L.G. Microencapsulação do corante natural de urucum: uma análise da eficiência da goma do cajueiro como material de parede. 132 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos). Universidade Federal do Ceará. Fortaleza, 2012.

MENESES, A.C. Encapsulação de óleo de cravo em nanopartículas lipídicas e poliméricas em sistema livre de solvente. 155 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química). Universidade Federal de Santa Catarina, 2016.

MENEZES, M.F.S.C.; SILVA, T.M.; ETCHEPARE, M.A.; FONSECA, B.S.; SONZA, V.P.; CODEVILLA, C.F.; BARIN, J.S.; SILVA, C.B.; MENEZES, C.R. Improvement of the viability of probiotics (*Lactobacillus acidophilus*) by multilayer encapsulation. **Ciência Rural**, v. 49, n. 9, 2019.

OLIVEIRA, T.L.C.; CARDOSO, M.G.; SOARES, R.A.; RAMOS, E.M.; PICCOLI, R.H.; TEBALDI, V.M.R. Inhibitory activity of *Syzygium aromaticum* and *Cymbopogon citratus*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 44, p. 357 – 365, 2013.

PILETTI, R. Obtenção e caracterização de microcápsulas de eugenol e de óleo de alho duplamente revestidas para aumento da estabilidade térmica. 187 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química). Universidade Federal de Santa Catarina, 2016.

RADÜNZ, M.; DA TRINDADE, M.L.M.; CAMARGO, T.M.; RADÜNZ, A.L.; BORGES, C.D.; GANDRA, E.A.; HELBIG, E. Antimicrobial and antioxidante activity of unencapsulated and encapsulated clove (*Syzygium aromaticum*) essential oil. **Food Chemistry**, v.276, p.180-186, 2019.

RESENDE, D.B.; MARTINS, H.H.A.; SOUZA, T.B.; CARVALHO, D.T.; PICCOLI, R.H.; SCHWAN, R.F.; DIAS, D.R. Synthesis and *in vitro* evaluation of peracetyl and deacetyl glycosides of eugenol, isoeugenol and dihydroeugenol acting against food-contaminating bacteria. **Food Chemistry**, v.237, p.1025-1029, 2017.

RIO, J.L.; RECIO, M.C. Medicinal plants and antimicrobial activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 100, p. 80 – 84, 2015.

ROZATTO, M.R. Determinação da atividade antimicrobiana *in vitro* de extratos, frações e compostos isolados de *Arrabidaea brachypoda*. 101f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, 2012.

RUTZ, J.K.; ZAMBIAZI, R.C.; BORGES, C.D.; KRUMREICH, F.D.; LUZ, S.R.; HARTWING, N.; ROSA, C.G. Microencapsulation of purple Brazilian cherry juice in xanthan, tara gums and xanthan-tara hydrogel matrixes. **Carbohydrate Polymers**, v. 29, p. 1256 – 1265, 2013.

SCHERER, R.; WAGNER, R.; DUARTE, M.C.T.; GODOY, H.T. Composição e atividades antioxidantes e antimicrobiana dos óleos essenciais de cravo-da-índia, citronela e palmarosa. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 11, n. 4, p. 442 – 449, 2009.

SGARBIERI, V.C. Propriedades fisiológicas-funcionais das proteínas do soro do leite. **Revista de Nutrição**, v. 17, n. 4, Campinas, 2004.

SILVA, A.A.; ANJOS, M.M.; RUIZ, S.P.; PANICE, L.B.; MIKCHA, J.M.G.; MACHINSKI JUNIOR, M.; ABREU FILHO, B.A. Avaliação da atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de *Thymus vulgaris* (tomilho), *Syzygium aromaticum* (cravo-da-índia) e *Rosmarinus officianalis* (alecrim) e dos conservantes benzoate de sódio e sobato de potássio em *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. **Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos**, v. 33, p. 111 – 117, 2013.

SILVA, K.C. Produção de microgéis simbióticos de gelatina-alginato e simulação da liberação controlada em condições gastrointestinais. 110f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos). Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas, 2016.

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

SILVESTRI, J.D.F.; PAROUL, N.; CZYEWski, E.; LERIN, L.; ROTAVA, I.; CANSIAN, R.L.; TONIAZZO, G.; OLIVEIRA, D.; TREICHE, H. Perfil da composição química e atividades antibacteriana e antioxidante do óleo essencial de cravo-da-índia (*Eugenia caryophyllata* Thunb.). **Revista Ceres**, v. 57, p. 589 – 594, 2010.

TALÓN, E.; LAMP, A.M.; VARGAS, M.; CHIRALT, A.; JOUPPIILA, K.; MARTÍNEZ, C.G. Encapsulation of eugenol by spray-drying using whey protein isolate or lecithin: release kinetics, antioxidant and antimicrobial properties. **Food Chemistry**, v. 295, p. 588 – 598, 2019.

TANGERINO, L.M.B. Estudo das propriedades antimicrobianas de copolímeros derivados do eugenol. 172 f. Dissertação (Mestrado em Materiais para Engenharia). Universidade Federal de Itajubá, 2006.

TELLO, F.; FALFAN-CORTÉS, R.N.; MARTINEZ-BUSTOS, F.; SILVA, V.M.; HUBINGER, M.D.; GROSSO, C. Alginate and pectin-based particles coated with globular proteins: production, characterization and anti-oxidative properties. **Food Hydrocolloids**, v. 43, p. 670-678, 2015.

WIEGAND, C.; HIPLER, U.C. Polymer-based biomaterials as dressings for chronic stagnating wounds. **Macromolecular Symposia**, v.294 – II, p. 1 – 13, 2010.

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