



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO TECNOLÓGICO
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA E
ENGENHARIA DE ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA
QUÍMICA**

RAQUEL PILETTI

**OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE MICROCÁPSULAS DE
EUGENOL E DE ÓLEO DE ALHO DUPLAMENTE
REVESTIDAS PARA AUMENTO DA ESTABILIDADE
TÉRMICA**

**FLORIANÓPOLIS, SC
2016**

RAQUEL PILETTI

**OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE MICROCÁPSULAS DE
EUGENOL E DE ÓLEO DE ALHO DUPLAMENTE
REVESTIDAS PARA AUMENTO DA ESTABILIDADE
TÉRMICA**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Santa Catarina para obtenção do Grau de Doutor em Engenharia Química.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Cíntia Soares

Coorientador: Prof. Dr. Márcio Antônio Fiori

Coorientador: Prof. Dr. Humberto Gracher Riella

Florianópolis
2016

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária
da UFSC.

Piletti, Raquel

Obtenção e Caracterização de Microcápsulas de Eugenol e de Óleo de Alho Duplamente Revestidas para Aumento da Estabilidade Térmica / Raquel Piletti; orientadora, Cintia Soares, coorientador, Márcio Antonio Fiori, coorientador, Humberto Gracher Riella. - Florianópolis, SC, 2016.

187 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro Tecnológico. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química

Inclui referências

1. Engenharia Química. 2. extratos naturais. 3. microencapsulamento. 4. atividade antimicrobiana. 5. Degradação. I. Soares, Cintia. II. Fiori, Márcio Antonio. III. Riella, Humberto Gracher. IV. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. V. Título.

RAQUEL PILETTI

**OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE MICROCÁPSULAS DE
EUGENOL E DE ÓLEO DE ALHO DUPLAMENTE
REVESTIDAS PARA AUMENTO DA ESTABILIDADE
TÉRMICA**

Esta Tese foi julgada adequada para obtenção do Título de “Doutor em Engenharia Química” e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-graduação em Engenharia Química.

Prof^a. Cíntia Soares, Dr^a.
Coordenador do Curso

Prof^a. Cíntia Soares, Dr^a.
Orientadora

Prof. Márcio Antônio Fiori, Dr.
Coorientador

Prof. Humberto Gracher Riella, Dr.
Coorientador

Banca Examinadora:

Prof. Agenor Furigo Jr., Dr.

Profa. Débora de Oliveira, Dr^a.

Prof^a. Mara Gabriela Novy Quadri, Dr^a.

Prof^a. Josiane M. M. de Mello, Dr^a.

Prof. Elidio Angioletto, Dr.

Florianópolis, 15 de agosto de 2016.

À minha família.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que participaram direta ou indiretamente na realização deste trabalho, em especial as seguintes pessoas.

Minha mãe, Terezinha Conte Piletti, por toda sua dedicação como mãe, e sobretudo por ser esta amiga de todas as horas.

Ao meu irmão, Giovanni Piletti, pela amizade e parceria de sempre.

Ao meu amado pai (*in memoriam*) Valmor Antônio Piletti, que me faz muita falta, e que sentirei saudades por toda minha vida.

Ao meu esposo, Jair Fiori Júnior, grande parceiro, amigo e meu companheiro de todas as horas. Agradeço por toda ajuda que me deu neste trabalho e pelos momentos que passamos, principalmente pelos difíceis, que nos fizeram crescer como pessoas e profissionais.

A minha orientadora Cíntia Soares, pela confiança, ajuda e ensinamentos. Ao meu coorientador Humberto Gracher Riella pela confiança em mim depositada. Em especial ao meu coorientador, Márcio A. Fiori, que foi peça fundamental para a realização deste trabalho, pela sua dedicação, amizade e apoio.

As professoras Josiane Mello, Francieli Dalcanton e Raquel Ternus, e a Unochapecó pelo convênio e uso de sua estrutura física para realização dos experimentos.

Um agradecimento especial para os IC's Ana Paula Roani, Evandra Gusatti, Francieli Schneider, Alícia Barreta e Guilherme Jung por contribuírem de forma dedicada com os experimentos.

Aos verdadeiros amigos pelos quais a vida gentilmente me presenteou, amizades essas pelas quais tenho apreço. A vocês agradeço pelo convívio, palavras de apoio e sobretudo pela amizade, que sem dúvida é um dos valores mais importantes que podemos ter na vida.

A FAI Faculdades, pelo tempo que pude me dedicar ao trabalho.

A UFSC por sua estrutura e apoio com toda sua estrutura.

A CAPES e ao CNPQ pelo auxílio financeiro.

A todos, meu muito obrigada e eterno agradecimento.

O que destrói a
humanidade:
A política, sem
princípios;
O prazer, sem
compromisso;
A riqueza, sem
trabalho;
A sabedoria, sem
caráter;
Os negócios, sem
moral;
A ciência, sem
humanidade;
A oração, sem
caridade.

Mahatma Gandhi

RESUMO

Os extratos naturais e os óleos essenciais vêm sendo estudados há muito tempo devido as suas propriedades antimicrobianas e podem ser usados em diversos segmentos industriais, sobretudo na área de alimentos. Porém, em decorrência da baixa estabilidade térmica e oxidativa as aplicações são limitadas. Neste sentido, o encapsulamento pode ser usado para aumentar a estabilidade térmica, oxidativa e, sobretudo, aumentar a solubilidade dos compostos encapsulados, fator importante para aplicações em tecnologias de alimentos. Dentre os extratos naturais o eugenol e o óleo essencial de alho apresentam propriedades antimicrobianas interessantes e já são utilizados em formulações de alguns alimentos. Neste trabalho foram obtidos complexos de inclusão de eugenol e de óleo de alho em β -ciclodextrina. A confirmação da formação dos complexos de inclusão de β CD-eugenol e de β CD-óleo de alho foram observadas com a determinação da constante de formação ou de estabilidade (K_c) e a partir da caracterização com as técnicas de FTIR, TGA, MEV. A propriedade antibacteriana foi caracterizada com as técnicas microbiológicas de CIM e de Difusão em Ágar foi determinada com as bactérias *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. Os valores de K_c obtidos indicam a presença de fortes interações do eugenol e do óleo de alho com a ciclodextrina. Os resultados de FTIR indicaram formação desses complexos. Os termogramas mostram que a β -ciclodextrina aumentou a estabilidade térmica desses compostos encapsulados. Os resultados de MEV indicaram a formação dos complexos de inclusão com dimensões micrométricas devido a mudanças na estrutura da β -ciclodextrina. Os resultados microbiológicos demonstraram que a atividade antibacteriana dos compostos puros é mantida, porém em menor intensidade, visto que a β -ciclodextrina, além de proteger controla a liberação do eugenol e do óleo de alho. Os complexos de inclusão foram tratados termicamente em estufa e posteriormente caracterizados por FTIR, TGA, MEV, Difusão em Ágar e por CIM. Os resultados indicaram que as alterações na estrutura dos complexos não foram significativas. Os resultados de TGA mostraram que a ciclodextrina aumentou a estabilidade térmica do eugenol e do óleo de alho e as alterações observadas foram devido a volatilização dos respectivos compostos adsorvidos na β -ciclodextrina. O MEV não indicou alterações na estrutura dos complexos de inclusão tratados termicamente. O teste de difusão em ágar mostrou a presença da atividade antibacteriana dos complexos de inclusão após o tratamento

térmico. Também, foi possível revestir os complexos de inclusão de β CD-eugenol e de β CD-óleo de alho com PMMA pelo processo de pulverização. O revestimento proporcionou aumento da estabilidade térmica, bem como a fixação do eugenol e do óleo de alho na matriz de PMMA. Os resultados de difusão em ágar para as microcápsulas revestidas não indicaram atividade antibacteriana, resultado considerado positivo, visto que esse revestimento deverá ser parcialmente rompido em temperaturas mais elevadas para a liberação do eugenol ou do óleo de alho para o meio.

Palavras-chave: extratos naturais, microencapsulamento, atividade antimicrobiana, degradação, revestimento.

ABSTRACT

Natural extracts and essential oils have been studied for a long time due to their antimicrobial properties and could be used widely in the industrial sector, especially in the food area. However, the applications are limited because of low thermal and oxidative stability. In this sense, the encapsulation shows a greater alternative to increase the thermal and oxidative stability and, above all, increase the solubility of encapsulated compounds. This factor is important for applications in food technologies. Among the natural extracts, the eugenol and the garlic essential oil show an interesting antimicrobial property and they are already used in formulations in some foods. In this work was obtained inclusion complex of eugenol and garlic oil in β -cyclodextrin. The confirming the formation of inclusion complexes of β CD-eugenol and β CD-garlic oil used the determination of constant of formation or constant of stability (K_c) and from the characterization by FTIR, TGA and SEM. The antimicrobial property was evaluated using CIM microbiological technique and agar diffusion was determined using *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* Bacteria. The K_c values show the presence of strong interaction of eugenol and garlic oil with cyclodextrin. FTIR results confirm the formation of these complexes. The TGA indicates that the β -cyclodextrin increases the thermal stability of this encapsulated compounds. MEV images indicated the formation of inclusion complexes with micrometric dimensions due to changes in β -cyclodextrin structure. Microbiological results showed that the antimicrobial activity of pure compounds is maintained, but with less intensity, since β -cyclodextrin, besides protect, control the eugenol and garlic oil liberation. The inclusion complexes were thermally treated and posteriorly characterized using FTIR, TGA, SEM, agar diffusion and CIM. The results indicated that the structure alteration of the complexes were not significant. The TGA results showed that the cyclodextrin enhances the thermal stability of eugenol and garlic oil and this alteration is due to volatilized or respective compounds adsorbed in β -cyclodextrin. The SEM does not indicate modifications in the structure of inclusion complexes thermally treated. The agar diffusion test shows the presence of antimicrobial activity of inclusion complexes after thermal treatment. In addition, it was possible to coat the inclusion complexes of β CD-eugenol and β CD-garlic with PMMA by pulverization process. This coating provides an increase of thermal stability, as well as the fixation of eugenol and garlic oil in PMMA matrix. The results of agar

diffusion to coated microcapsules do not indicated antimicrobial activity, result considered positive, since this coat must be broken in higher temperatures to release the eugenol and garlic oil to environment.

Key words: natural extracts, microencapsulation, antimicrobial activity, degradation, coating.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Esquema representativo de microcápsula e microesfera, respectivamente.	43
Figura 2 - Representação esquemática da α , β e γ -ciclodextrina (da esquerda para a direita).....	45
Figura 3 – Estruturas da α , β e γ -CD.....	45
Figura 4 - Estrutura funcional da β -ciclodextrina.	46
Figura 5 – Esquema ilustrativo da formação do complexo de inclusão.	51
Figura 6 - Tipos de diagrama de solubilidade.....	53
Figura 7 - Funções básicas das embalagens e interfaces de atuação das embalagens ativas e inteligentes.	58
Figura 8 - Unidade monomérica do poli(metacrilato de metila).	60
Figura 9 - Componentes de uma extrusora.	63
Figura 10 - Microplacas estéreis de 96 cavidades.	70
Figura 11 - Esquema representativo da área biocida: (a) Área biocida e (b) Área da amostra.	72
Figura 12 - Formação de complexo de inclusão de β CD-eugenol.....	73
Figura 13 - Formação de complexo de inclusão de β CD-alho.	74
Figura 14 – Resultados microbiológicos de difusão em ágar para o eugenol com bactérias do tipo (a) <i>Escherichia coli</i> e (b) <i>Staphylococcus aureus</i>	84
Figura 15 – Resultados microbiológicos de difusão em ágar para o óleo de alho com bactérias do tipo (a) <i>Escherichia coli</i> e (b) <i>Staphylococcus aureus</i>	85
Figura 16 – Resultados microbiológicos de difusão em ágar para a β -ciclodextrina com bactérias do tipo (a) <i>Escherichia coli</i> e (b) <i>Staphylococcus aureus</i>	86
Figura 17 - Resultados de CIM para o eugenol diluído com a bactéria do tipo <i>Escherichia coli</i> . Controle Positivo (coluna 8), Controle Negativo (coluna 10) e Branco (coluna 12). Colunas 1, 2 e 3 contêm eugenol diluído no meio de cultura BHI.....	88
Figura 18 - Resultados de CIM para o eugenol diluído com a bactéria do tipo <i>Staphylococcus aureus</i> . Controle Positivo (coluna 8), Controle Negativo (coluna 10) e Branco (coluna 12). Colunas 1, 2 e 3 contêm eugenol diluído no meio de cultura BHI.....	89
Figura 19 - Resultados de CIM para o óleo de alho diluído com a bactéria do tipo <i>Escherichia coli</i> . Colunas 1, 2 e 3 contêm óleo de alho diluído no meio de cultura BHI.....	90

Figura 20 - Resultados de CIM para o óleo de alho diluído com as bactérias do tipo <i>Staphylococcus aureus</i> . Colunas 1, 2 e 3 contém óleo de alho diluído no meio de cultura BHI.	90
Figura 21 - Espectros de absorção UV-Visível obtidos para soluções de eugenol com diferentes concentrações em água destilada.	92
Figura 22 – Espectros de absorção UV-Visível obtidos para soluções de óleo de alho com diferentes concentrações em água destilada.	93
Figura 23 - Curva de calibração para eugenol disperso em água destilada obtida para a banda de absorção em 280 nm.	94
Figura 24 - Curva de calibração para óleo de alho diluído em metanol obtida para a banda de absorção em 217 nm.	95
Figura 25 - Curva de solubilidade para o eugenol em meio reacional aquoso contendo diferentes concentrações de β -ciclodextrina.	96
Figura 26 - Curva de solubilidade para o óleo de alho em meio reacional aquoso contendo diferentes concentrações de β -ciclodextrina.	98
Figura 27-Espectros de FTIR obtidos para eugenol, β -ciclodextrina e complexo β CD- eugenol. Detalhes na região de 4000 a 2000 cm^{-1}	99
Figura 28 - (a) detalhe do FTIR no intervalo de 3000 cm^{-1} a 4000 cm^{-1} e (b) detalhe no intervalo de 2800 cm^{-1} a 3000 cm^{-1}	101
Figura 29 - Espectro de FTIR para o eugenol, β -ciclodextrina e para o complexo β CD- eugenol. Detalhes na região de 2000 a 400 cm^{-1}	103
Figura 30 - (a) detalhe do espectro FTIR para o eugenol e para o complexo de inclusão β CD-eugenol no intervalo de 900 cm^{-1} a 1150 cm^{-1} e (b) detalhe no intervalo de 1500 cm^{-1} a 1700 cm^{-1}	104
Figura 31 - Espectro de FTIR para o óleo de alho, para a β -ciclodextrina e para o complexo β CD-óleo de alho. Detalhes para a região de 4000 cm^{-1} a 2000 cm^{-1}	105
Figura 32 - Espectro de FTIR obtidos para o óleo de alho, β -ciclodextrina e para o complexo β CD - óleo de alho. Detalhes na região 2000 cm^{-1} a 400 cm^{-1}	106
Figura 33 - Detalhes dos espectros de FTIR na região 4000-3000 cm^{-1} para a β -ciclodextrina e para o complexo β CD - óleo de alho.	107
Figura 34 - Termogramas de TGA para o eugenol, para a β -ciclodextrina e para o complexo β CD-eugenol.	108
Figura 35 - Diagrama do termograma diferencial de TGA (dm/dT) para a β -ciclodextrina e para o complexo β CD-eugenol.	111
Figura 36 - Análise termogravimétrica para a β -ciclodextrina, para o óleo de alho e para o complexo β CD -óleo de alho.	112
Figura 37 - Diagrama do termograma diferencial de TGA (dm/dT) para a β -ciclodextrina e para o complexo β CD-óleo de alho.	113

Figura 38 - Imagem obtida com microscopia eletrônica de varredura da β -ciclodextrina, com uma ampliação de 1000 vezes.	115
Figura 39 - Imagem obtida com microscopia eletrônica de varredura do complexo de inclusão de β CD-eugenol, com ampliação de 1000 vezes.	116
Figura 40 – Imagem obtida por microscopia eletrônica de varredura do complexo de inclusão de β CD-óleo de alho, obtida com uma ampliação de 1000 vezes.	117
Figura 41 - Resultado do ensaio de difusão em ágar para os complexos de inclusão obtidos com 77,32 mmol.L ⁻¹ de eugenol (amostra 6) e com a bactéria do tipo <i>Escherichia coli</i> - (a) β CD-eugenol sem tratamento térmico e (b) β CD-eugenol com tratamento térmico a 75°C.	119
Figura 42 - Resultados do ensaio de difusão em ágar para os complexos de inclusão obtidos com 77,32 mmol.L ⁻¹ de eugenol (amostra 6) e com a bactéria do tipo <i>Staphylococcus aureus</i> - (a) β CD-eugenol sem tratamento térmico e (b) β CD-eugenol com tratamento térmico a 70°C.	120
Figura 43 - Resultados do ensaio de difusão em ágar para os complexos de inclusão obtidos com 115,98 mmol.L ⁻¹ de eugenol (amostra 7) e com a bactéria do tipo <i>Escherichia coli</i> - (a) β CD-eugenol sem tratamento térmico e (b) β CD-eugenol com tratamento térmico a 75°C.	120
Figura 44 – Resultados do ensaio de difusão em ágar para os complexos de inclusão obtidos com 115,98 mmol.L ⁻¹ de eugenol (amostra 7) e com a bactéria do tipo <i>Staphylococcus aureus</i> : (a) β CD-eugenol sem tratamento térmico e (b) β CD-eugenol com tratamento térmico a 75 °C.	121
Figura 45 - Resultados do ensaio de difusão em ágar para os complexos de inclusão obtidos com 193,31 mmol.L ⁻¹ de eugenol (amostra 8) e com a bactéria do tipo <i>Escherichia coli</i> - (a) β CD-eugenol sem tratamento térmico e (b) β CD-eugenol com tratamento térmico a 75 °C.	121
Figura 46 – Resultados do ensaio de difusão em ágar para os complexos de inclusão obtidos com 193,31 mmol.L ⁻¹ de eugenol (amostra 8) e com a bactéria do tipo <i>Staphylococcus aureus</i> : (a) β CD-eugenol sem tratamento térmico e (b) β CD-eugenol com tratamento térmico a 75 °C.	122
Figura 47 - Diâmetros médios dos halos de inibição obtidos pelo teste de difusão em ágar para os complexos de inclusão β CD-eugenol obtidos com diferentes concentrações de eugenol no meio reacional. Amostras com e sem tratamento térmico. Testes realizados com a bactéria <i>Escherichia coli</i>	123

Figura 48 -Diâmetros médios dos halos de inibição obtidos pelo teste de difusão em ágar para os de complexos inclusão de β CD-eugenol obtidos com diferentes concentrações de eugenol no meio reacional. Amostras com e sem tratamento térmico. Testes realizados com a bactéria <i>Staphylococcus aureus</i>	124
Figura 49 – Resultados dos ensaios de difusão em ágar para os complexos de inclusão β CD-óleo de alho obtidos contendo 81,73 mmol.L ⁻¹ de óleo de alho (amostra 6) e a bactéria do tipo <i>Escherichia coli</i> - (a) β CD-óleo de alho sem tratamento térmico e (b) β CD-óleo de alho com tratamento térmico a 60°C.	126
Figura 50 – Resultados dos ensaios de difusão em ágar para os complexos de inclusão β CD-óleo de alho obtidos contendo 81,73 mmol.L ⁻¹ de óleo de alho (amostra 6) e a bactéria do tipo <i>Staphylococcus aureus</i> - (a) β CD-óleo de alho sem tratamento térmico e (b) β CD-óleo de alho com tratamento a 60°C.	126
Figura 51 – Resultados dos ensaios de difusão em ágar para os complexos de inclusão β CD-óleo de alho obtidos contendo 122,60 mmol.L ⁻¹ de óleo de alho (amostra 7) e a bactéria do tipo <i>Escherichia coli</i> - (a) β CD-óleo de alho sem tratamento térmico e (b) β CD-óleo de alho com tratamento térmico a 60°C.	127
Figura 52 – Resultados dos ensaios de difusão em ágar para os complexos de inclusão β CD-óleo de alho obtidos contendo 122,60 mmol.L ⁻¹ de óleo de alho (amostra 7) e com a bactéria do tipo <i>Staphylococcus aureus</i> - (a) β CD-óleo de alho sem tratamento térmico e (b) β CD-óleo de alho com tratamento térmico a 60°C.	127
Figura 53 – Resultados dos ensaios de difusão em ágar para os complexos de inclusão β CD-óleo de alho obtidos contendo 245,20 mmol.L ⁻¹ de óleo de alho (amostra 8) e a bactéria do tipo <i>Escherichia coli</i> - (a) β CD-óleo de alho sem tratamento térmico e (b) β CD-óleo de alho com tratamento térmico a 60°C.	128
Figura 54 – Resultados dos ensaios de difusão em ágar para os complexos de inclusão β CD-óleo de alho obtidos contendo 245,20 mmol.L ⁻¹ de óleo de alho (amostra 8) e a bactéria do tipo <i>Staphylococcus aureus</i> - (a) β CD-óleo de alho sem tratamento térmico e (b) β CD-óleo de alho com tratamento a 60°C.	128
Figura 55 - Diâmetros médios dos halos de inibição obtidos pelo teste de difusão em ágar para amostras de complexos de inclusão β CD-óleo de alho obtidas com diferentes concentrações de óleo de alho no meio reacional, tratadas e não tratadas termicamente. Testes realizados com as bactérias do tipo <i>Staphylococcus aureus</i>	129

Figura 56 - Teste de concentração inibitória mínima (CIM) para os complexos de inclusão β CD-eugenol com tratamento térmico (S), sem tratamento térmico (NS), Branco (B – coluna 12), Controle Positivo (+), Controle Negativo (-). Bactérias do tipo <i>Staphylococcus aureus</i>	131
Figura 57 - Teste de concentração inibitória mínima (CIM) para os complexos de inclusão β CD-eugenol com tratamento térmico (S), sem tratamento térmico (NS), Branco (B – coluna 12), Controle Positivo (+), Controle Negativo (-). Bactéria do tipo <i>Escherichia coli</i>	131
Figura 58 - Teste de concentração inibitória mínima (CIM) para os complexos de inclusão β CD-óleo de alho sem tratamento térmico (NS), Branco (B – coluna 12), Controle Positivo (+), Controle Negativo (-). Bactéria do tipo <i>Staphylococcus aureus</i>	133
Figura 59 - Teste de concentração inibitória mínima (CIM) para os complexos de inclusão β CD-óleo de alho com tratamento térmico (NS), Branco (B – coluna 12), Controle Positivo (+), Controle Negativo (-). Bactéria do tipo <i>Staphylococcus aureus</i>	133
Figura 60 - Teste de concentração inibitória mínima (CIM) para os complexos de inclusão β CD-óleo de alho sem tratamento térmico (NS), Branco (B – coluna 12), Controle Positivo (+), Controle Negativo (-). Bactérias do tipo <i>Escherichia coli</i>	134
Figura 61 - Teste de concentração inibitória mínima (CIM) para os complexos de inclusão β CD-óleo de alho com tratamento térmico (S), Branco (B – coluna 12), Controle Positivo (+), Controle Negativo (-). Bactéria do tipo <i>Escherichia coli</i>	135
Figura 62 - Espectro de FTIR obtidos para o complexo β CD–eugenol sem e com o tratamento térmico a 75 °C por uma hora. Detalhes na região de 4000 a 2000 cm^{-1}	136
Figura 63 - Espectro de FTIR obtidos para o complexo β CD–eugenol sem e com o tratamento térmico em 75 °C por uma hora. Detalhes na região de 400 a 2000 cm^{-1}	137
Figura 64 - Espectro de FTIR obtidos para o complexo β CD–óleo de alho sem e com o tratamento térmico a 60 °C por uma hora. Detalhes na região de 4000 a 2000 cm^{-1}	138
Figura 65- Espectro de FTIR obtidos para o complexo de β CD–óleo de alho sem e com o tratamento térmico em 60 °C por uma hora. Detalhes na região de 400 a 2000 cm^{-1}	139
Figura 66 - Termogramas de TGA obtido para os complexos de inclusão β CD-eugenol com e sem o tratamento térmico 75°C por 1 h.....	140
Figura 67 - Diagrama dm/dT para os complexos de β CD-eugenol sem e com o tratamento térmico com 75°C por 1 h.....	141

Figura 68 - Termogramas de TGA obtidos para os complexos de inclusão β CD-óleo de alho com e sem o tratamento térmico em 60°C por 1 h.....	142
Figura 69 - Diagrama dm/dT para os complexos de β CD-eugenol sem e com o tratamento térmico com 75°C por 1 h.....	143
Figura 70 - Imagem obtida por Microscopia Eletrônica de Varredura para o complexo de β CD-eugenol tratado a 75°C por 1 h.....	145
Figura 71 - Imagem obtida por microscopia eletrônica de varredura para o complexo de β CD-óleo de alho tratado a 60°C por 1 h.....	145
Figura 72 - Microcápsulas de β CD-eugenol após revestimento com PMMA.....	146
Figura 73 - Microcápsulas de β CD-óleo de alho após revestimento com PMMA.....	147
Figura 74 - Imagem obtida por microscopia eletrônica de varredura para o complexo de β CD-eugenol revestido com PMMA.	148
Figura 75 - Imagem obtida por microscopia eletrônica de varredura para o complexo de β CD-óleo de alho revestido com PMMA.	149
Figura 76 - (a) Termograma de TGA para o polímero PMMA e (b) diagrama do diagrama diferencial de TGA. Termograma obtido com 10 °C/min e atmosfera de nitrogênio.	151
Figura 77 - (a) Termograma de TGA para o complexo β CD-eugenol revestido com PMMA e (b) diagrama do termograma diferencial de TGA. Termograma obtido com 10°C/min e atmosfera de nitrogênio.	152
Figura 78 - Comparativo entre os termogramas de TGA para o PMMA, complexo β CD-eugenol e complexo β CD-eugenol revestido com PMMA.....	153
Figura 79 - Comparativo entre os diagramas diferenciais de TGA para o PMMA, complexo β CD-eugenol e complexo β CD-eugenol revestido com PMMA.....	154
Figura 80- (a) Termograma de TGA para o complexo β CD-óleo de alho revestido com PMMA e (b) diagrama do termograma diferencial de TGA. Termograma obtido com 10°C/min e atmosfera de nitrogênio.	156
Figura 81 - Valores de concentrações de substratos de eugenol e de óleo de alho nos complexos de inclusão com revestimento de PMMA determinadas antes do tratamento térmico e após os tratamentos térmicos de 5 min e de 10 min em temperatura de 170°C. Concentrações determinadas por espectroscopia de UV-Visível.....	159
Figura 82 – Resultados da difusão em ágar para o PMMA puro, com as bactérias do tipo (a) <i>Escherichia coli</i> e (b) <i>Staphylococcus aureus</i>	161

Figura 83 – Resultados de difusão em ágar para o complexo β CD-eugenol revestido com PMMA, com bactérias do tipo (a) <i>Escherichia coli</i> e (b) <i>Staphylococcus aureus</i>	162
Figura 84 – Resultados da difusão em ágar para o complexo β CD-óleo de alho revestido com PMMA, com as bactérias do tipo (a) <i>Escherichia coli</i> e (b) <i>Staphylococcus aureus</i>	162

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Métodos utilizados para encapsulação e tamanhos das cápsulas.....	49
Tabela 2 - Concentração de eugenol e óleo de alho usadas no CIM.....	70
Tabela 3 - Quantidade de eugenol a ser microencapsulado.....	74
Tabela 4 - Quantidade de óleo de alho a ser microencapsulado.....	75

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BHI - *Brain Heart Infusion*
CD – Ciclodextrina
CIM– Concentração inibitória Mínima
DMSO - Dimetilsulfóxido
DSC – Calorimetria Diferencial de Varredura
FDA - *Food and Drug Administration*
FTIR – Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier
KBr – Brometo de potássio
Kc – Constante de formação ou estabilidade
MEV – Microscopia Eletrônica de Varredura
MMA – Metacrilato de metila
PCA – *Plate Count Agar*
PMMA - Polimetilmetacrilato
S₀ – Solubilidade do substrato na ausência de ciclodextrina
TGA – Análise Termogravimétrica
UV – Ultra Violeta
 α -CD - alfa-ciclodextrina
 β -CD - beta-ciclodextrina
 γ -CD - gama-ciclodextrina

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	33
1.1	OBJETIVOS	36
1.1.1	Objetivo Geral	36
1.1.2	Objetivos Específicos	36
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	37
2.1	EXTRATOS NATURAIS	37
2.2	ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS	39
2.2.1	Óleo essencial de alho	40
2.2.2	Eugenol	41
2.3	MICROENCAPSULAMENTO	42
2.4	CICLODEXTRINAS (CD)	44
2.5	MÉTODOS DE MICROENCAPSULAMENTO	47
2.5.1	Complexos de inclusão	50
2.6	DIAGRAMA OU ISOTERMA DE SOLUBILIDADE	52
2.6.1	Aditivos para embalagens poliméricas	56
2.6.2	Embalagens ativas	57
2.7	POLI(METACRILATO DE METILA) (PMMA)	59
2.8	PROCESSO DE EXTRUSÃO E COEXTRUSÃO DE FILMES POLIMÉRICOS	62
3	ESTADO DA ARTE DO MICROENCAPSULAMENTO DE ÓLEOS ESSENCIAS	65
4	PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	69
4.1	CARACTERIZAÇÃO MICROBIOLÓGICA DOS COMPOSTOS	69
4.1.1	Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) do eugenol e do óleo de alho	69
4.2	OBTENÇÃO DOS COMPLEXOS DE INCLUSÃO β CD-EUGENOL E β CD-ÓLEO DE ALHO	72
4.2.1	Espectros de UV-visível do eugenol e óleo de alho	72
4.2.2	Formação dos complexos de inclusão de βCD-eugenol e βCD-alho	73
4.2.3	Curva de solubilidade de fases para determinação da constante de formação ou estabilidade (K_c)	75
4.2.4	Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)	76
4.2.5	Análise Termogravimétrica (TGA)	76
4.2.6	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	77

4.2.7	Análises Microbiológicas das microcápsulas.....	77
4.3	TRATAMENTO TÉRMICO DOS COMPLEXOS DE INCLUSÃO DE β CD-EUGENOL E DE β CD-ÓLEO DE ALHO ...	78
4.4	REVESTIMENTO DAS MICROCÁPSULAS DE β CD-EUGENOL E DE β CD-ÓLEO DE ALHO COM PMMA.....	79
4.4.1	Síntese do PMMA.....	79
4.4.2	Revestimento dos complexos de inclusão de βCD-eugenol e de βCD-óleo de alho com PMMA	79
4.4.3	Caracterização dos complexos de βCD-eugenol e de βCD-óleo de alho revestidos com PMMA.....	80
4.4.4	Tratamentos térmicos dos complexos de inclusão revestidos com PMMA.....	80
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	83
5.1	CARACTERIZAÇÃO DO EUGENOL, DO ÓLEO DE ALHO E DA β -CICLODEXTRINA	83
5.1.1	Caracterização microbiológica	83
5.1.2	Testes de Difusão em Ágar para eugenol, óleo de alho e βCD.....	83
5.1.3	Ensaio microbiológico de concentração inibitória mínima (CIM) para o eugenol e para o óleo de alho	87
5.2	OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS COMPLEXOS DE INCLUSÃO β CD-EUGENOL E β CD-ÓLEO DE ALHO	92
5.2.1	Análises por espectroscopia de UV-Visível para o eugenol e para o óleo de alho	92
5.2.2	Determinação da constante de estabilidade (K_c) do eugenol e do óleo de alho	95
5.2.3	Caracterização por Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier – FTIR dos complexos de inclusão.....	99
5.2.4	Caracterização por análise termogravimetria (TGA) dos complexos de inclusão	108
5.2.5	Caracterização com microscopia eletrônica de varredura da β-ciclodextrina e dos complexos de inclusão de βCD-eugenol e βCD-óleo de alho.....	115
5.3	TRATAMENTO TÉRMICO DAS MICROCÁPSULAS DE β CD-EUGENOL E β CD-ÓLEO DE ALHO	118
5.3.1	Testes de difusão em ágar dos complexos de βCD-eugenol e de βCD-óleo de alho sem e com tratamento térmico.....	119

5.3.2	Testes de concentração inibitória mínima para os complexos de inclusão de β CD-eugenol e β CD-óleo de alho..	130
5.3.3	Análises de Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR) para o complexo de inclusão de β CD-eugenol e de β CD-alho	135
5.3.4	Análise Termogravimétrica (TGA) para os complexos de inclusão de β CD-eugenol e de β CD-alho	139
5.3.5	Análise por microscopia eletrônica de varredura para as microcápsulas de β CD-eugenol e de β CD-alho após o tratamento térmico.....	144
5.4	REVESTIMENTO DOS COMPLEXOS DE INCLUSÃO β CD-EUGENOL E DE β CD-ALHO COM PMMA	146
5.4.1	Revestimento das microcápsulas de β CD-eugenol e de β CD-óleo de alho com PMMA por pulverização	146
5.4.2	Análise por microscopia eletrônica de varredura dos complexos de inclusão de β CD-eugenol e de β CD-alho revestidos com PMMA.....	147
5.4.3	Análise Termogravimétrica para os complexos de inclusão de β CD-eugenol e de β CD-alho revestidos com PMMA.....	149
5.4.4	Tratamento térmico em alta temperatura dos complexos de inclusão de β CD-eugenol e β CD-alho com PMMA.....	158
5.4.5	Teste de difusão em ágar para os complexos de inclusão de β CD-eugenol e β CD-óleo de alho revestidos com PMMA.	160
6	CONCLUSÕES	165
7	TRABALHOS FUTUROS.....	167
	REFERÊNCIAS	169

1 INTRODUÇÃO

Os extratos naturais de plantas aromáticas têm sido muito estudados com vistas à aplicação como conservantes naturais de alimentos, devido ao caráter atóxico e às propriedades antimicrobiana e antioxidante dos seus óleos essenciais. Outro fator que tem despertado grande interesse por estes compostos é que os consumidores estão a cada vez mais exigentes em relação ao uso de aditivos naturais, seguindo a tendência do consumo verde, que exige maior segurança alimentar.

A propriedade antimicrobiana dos extratos naturais, sobretudo dos óleos essenciais, tem demonstrado potencial aplicação em diversos segmentos e produtos. Porém, esta propriedade é atribuída a compostos químicos constituintes dos óleos essenciais que geralmente são voláteis em baixas temperaturas, têm forte odor e baixa solubilidade. Por isso, a aplicação destes compostos oferece grandes limitações práticas (CALO et al., 2015).

A FDA (*Food and Drug Administration*) reconhece os óleos essenciais como substâncias seguras de acordo com os seus regulamentos e permite o uso como aditivos antimicrobianos naturais para alimentos (ASBAHANI et al., 2015). Dentre os óleos essenciais de maior interesse científico e comercial, destacam-se o eugenol e o óleo de alho, por apresentarem atividade antimicrobiana para uma grande variedade de micro-organismos. Porém, como ponto de desafio, de acordo com Asbahani et al. (2015) os óleos essenciais podem ser facilmente oxidados e volatilizados normalmente com temperaturas inferiores a 35°C.

A baixa estabilidade térmica e o baixo ponto de fulgor destes óleos essenciais limitam muito as suas aplicações como aditivos, principalmente nas operações que envolvem o seu aquecimento durante alguma etapa de processo. Esses compostos são facilmente oxidados em temperatura ambiente e, quando aquecidos, o seu processo de degradação é acelerado e as suas propriedades são alteradas.

A encapsulação por matrizes inertes tem sido uma técnica interessante e bastante estudada para a proteção dos extratos naturais do processo de oxidação ou da degradação térmica. Com este objetivo, as ciclodextrinas têm sido empregadas em estudos para o desenvolvimento de matrizes de encapsulamento para proteção de extratos naturais. As ciclodextrinas representam um dos mais simples sistemas de

encapsulamento por apresentarem uma conformação espacial no formato de um “copo” com diâmetro interno variado. A sua superfície externa é hidrofílica e a da cavidade interna é hidrofóbica e, por isso, apresentam afinidade específica por regiões polares ou apolares dos óleos essenciais de interesse (CIOBANU, LANDY e FOURMENTIN, 2013). Além disso, as ciclodextrinas formam complexos de inclusão com os óleos essenciais, denominados microcápsulas e, assim, melhoram a solubilidade e aumentam a estabilidade desses óleos devido a sua proteção. Essas características potencializam ainda mais a aplicação destes complexos como aditivos em alimentos, assim como em materiais poliméricos empregados na fabricação de embalagens para alimentos. Porém, para a aplicação na fabricação de embalagens, como aditivo antimicrobiano, é necessário que os complexos suportem temperaturas próximas à decomposição das ciclodextrinas, por um tempo de processamento de alguns minutos.

Neste contexto, o desenvolvimento de aditivos à base de óleos essenciais para aplicação em materiais poliméricos tem sido um grande desafio. Muitos aditivos antimicrobianos empregados na fabricação de embalagens ativas são de natureza inorgânica ou aromática. Estes compostos são tóxicos mesmo em pequenas quantidades. Essas características limitam o uso dos aditivos antimicrobianos tradicionais na fabricação de embalagens ativas de alto desempenho, por exemplo.

Esta situação se apresenta como uma ótima oportunidade para os compostos antimicrobianos naturais. O desenvolvimento de derivados a partir de óleos essenciais promete ser um grande avanço para a indústria química de aditivos e de embalagens. Uma vez desenvolvido um aditivo com composição natural, o mesmo não terá caráter tóxico e poderá ser empregado com segurança na fabricação de embalagens ativas.

O encapsulamento dos óleos essenciais por compostos com maior estabilidade térmica e química como a ciclodextrina, pode ser uma alternativa viável para este desafio. Porém, é necessário o melhoramento da estabilidade térmica destes complexos de inclusão para suportar as condições de processamento dos materiais poliméricos tradicionais. Neste trabalho é proposto como tese que é possível obter ciclodextrinas contendo óleo de alho ou eugenol revestidas por material polímero específico, com a função de proteção das microcápsulas durante as condições de temperaturas superiores às empregadas no processamento, da ordem de 150°C. Temperaturas nesta ordem de grandeza são normalmente empregadas para o processamento de grande parte dos materiais poliméricos para a fabricação de embalagens.

Assim, um bom aditivo natural antimicrobiano deverá estar protegido da degradação térmica gerada pelo seu processamento e de degradações químicas geradas pela interação do composto com agentes químicos presentes nos alimentos e no ambiente.

Neste trabalho é proposto que as microcápsulas de ciclodextrinas contendo os óleos essenciais serão revestidas por polimetilmetacrilato (PMMA). A função desse revestimento deverá ser apenas de revestimento de proteção ou ser tratado como revestimento de sacrifício. A sua função será de apenas proteger os complexos de inclusão, durante o processamento ou da sua estocagem.

O PMMA é um polímero interessante para ser aplicado como material para o revestimento. Por ser solubilizado em acetona em baixas temperaturas pode ser empregado facilmente em processos de pulverização para a obtenção do revestimento dos complexos de inclusão. Assim, o processo de pulverização se torna viável e de fácil operação. Para tanto, alguns fatores são importantes e são destacados neste trabalho: i) os compostos naturais devem ser encapsulados em uma matriz inerte para facilmente serem revestidos; ii) os complexos de inclusão devem suportar temperaturas acima de 50°C e manter as suas propriedades antimicrobianas (esta temperatura é considerada como mínima para a realização do processo de pulverização com secagem rápida); iii) o revestimento de PMMA deve garantir a fixação da maior quantidade de complexo de inclusão possível ou do composto considerado princípio ativo e iv) o revestimento de PMMA deve ser suficiente para proteger termicamente e não permitir a volatilização ou liberação dos complexos de inclusão.

Além desta proteção, o revestimento polimérico tem a função de ajustar a compatibilidade química das microcápsulas com a matriz polimérica, de auxiliar na dispersão homogênea deste aditivo na matriz e de favorecer a liberação controlada dos extratos naturais durante o processamento.

Sendo assim, neste trabalho empregou-se a β -ciclodextrina como composto encapsulante por apresentar a melhor relação de tamanho de cavidade para o encapsulamento. Como substrato para encapsulamento foi empregado o óleo de alho e o eugenol e como revestimento o polimetilmetacrilato (PMMA). Estes óleos essenciais são compostos dotados de atividade antimicrobiana e de alto potencial para o uso em aplicações de tecnologias para alimentos.

O trabalho está organizado, fundamentalmente, em três etapas: a primeira é destinada aos procedimentos de encapsulação dos substratos em β -ciclodextrina, seguido das caracterizações físicas e

químicas; a segunda etapa consiste na avaliação da estabilidade térmica e microbiológica dos complexos de inclusão diante de tratamentos térmicos em temperaturas superiores a 50°C; por fim, tem-se o revestimento dos complexos de inclusão com o polímero PMMA, com a avaliação da estabilidade térmica e de fixação dos complexos de inclusão.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

Obter complexos de inclusão de β -ciclodextrina contendo os substratos de eugenol ou de óleo de alho revestidos com PMMA.

1.1.2 Objetivos Específicos

- Obter complexos de inclusão de β -ciclodextrina-eugenol e de β -ciclodextrina-óleo de alho com estabilidade térmica e propriedade antibacteriana após tratamento térmico.
- Obter complexos de inclusão de β -ciclodextrina-eugenol e de β -ciclodextrina-óleo de alho revestidos com PMMA.
- Obter complexos de inclusão de β -ciclodextrina-eugenol e de β -ciclodextrina-óleo de alho revestidos com PMMA.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 EXTRATOS NATURAIS

A utilização de extratos vegetais e plantas medicinais para humanos data de milhares de anos, sendo muito difundida no Egito antigo, China, Índia e Grécia. A eficiência da atividade dos extratos vegetais depende da espécie utilizada, da concentração do princípio ativo presente na planta, da fonte de origem (caule, folha ou sementes, por exemplo), do método de obtenção e da estabilidade dos componentes (KAMEL, 2000; BRUGALLI, 2003).

Nos últimos anos, as plantas aromáticas e seus extratos têm sido avaliados quanto à sua eficácia na conservação e segurança dos alimentos. Suas propriedades são devidas aos seus óleos essenciais (OEs) e outros componentes de metabólitos secundários das plantas. Diversos fitoquímicos, como o OE, são antimicrobianos de ocorrência natural encontrados em muitas plantas e mostraram ser eficazes numa variedade de aplicações através da redução do crescimento e sobrevivência de micro-organismos. Esses atributos e uma crescente demanda por aditivos alimentares naturais levaram a um interesse na utilização de OE como potenciais agentes antimicrobianos alternativos (CALO et al., 2015).

Na literatura existem diversos trabalhos avaliando a atividade antimicrobiana, antioxidante, antifúngica e/ou anti-helmíntica de diferentes extratos vegetais, em experimentos *in vitro*, contra diversos patógenos (KAMEL, 2000; KAMIMURA et al., 2014; CALO et al., 2015).

Devido ao surgimento da resistência bacteriana a antibióticos e também em razão da visão negativa dos consumidores em relação aos conservantes de alimentos, tem havido um aumento no interesse das indústrias quanto à utilização de componentes de plantas que contêm óleo essenciais ou extratos como alternativa para o controle da deterioração de alimentos. Além disso, os óleos essenciais possuem propriedades antimicrobianas que podem torna-los alternativas adequadas para tratamento preventivo ou substituição de determinados antibióticos (CALO et al., 2015; CHAVES et al., 2008).

Tanto os óleos essenciais como os componentes não voláteis (extratos), extraídos de plantas, têm sido estudados quanto à avaliação

do seu potencial antioxidante e antimicrobiano, demonstrando alta eficiência com possível aplicação nas indústrias de alimentos e de cosméticos, e têm se mostrado promissores dentro do contexto de aditivos naturais (MORAIS et al., 2009).

Os efeitos exercidos pelas plantas podem ser explicados pela presença e constituição de seus princípios ativos. Princípios ativos são componentes químicos, presentes em todas as partes das plantas ou em partes específicas, que conferem às plantas medicinais alguma atividade terapêutica (MARTINS et al., 2000; MOHMOUD e CROTEAU, 2002).

As substâncias ativas das plantas medicinais, condimentos e especiarias podem ser classificadas de acordo com suas características físicas, químicas ou atividade biológica. Os principais grupos existentes são: alcalóides (álcoois, aldeídos, cetonas, éteres, ésteres e lactonas), glucosídeos, compostos fenólicos, saponinas, mucilagens, flavonóides, terpenóides (mono e sesquiterpênicos e esteróides), taninos e óleos essenciais (MARTINS et al., 2000; BAKKALI et al., 2008). Essas substâncias normalmente não se encontram em estado puro, mas sob a forma de complexos, cujos diferentes componentes se completam e reforçam sua ação sob o organismo em questão. Uma das vantagens da utilização dos óleos essenciais é que grande parte dos compostos ativos da planta estão presentes em maior quantidade no óleo (OETTING, 2005).

O interesse quanto ao uso dos óleos essenciais como conservantes está relacionado com o conhecimento de ser um composto natural seguro, constituindo uma alternativa potencial para a produção de alimentos livres de aditivos sintéticos. Na indústria de alimentos, a peroxidação lipídica e a contaminação microbiana são reações que levam à deterioração dos alimentos, com conseqüente redução de sua vida útil, além de causar doenças e perdas econômicas. Atualmente, tem-se uma grande preocupação devido a essa deterioração e vários esforços estão sendo feitos para minimizar esses danos, seja pelo uso de diferentes processos de conservação como pelo uso de novos aditivos (YE, DAI e HU, 2013). No setor alimentar, a incursão do avanço nanotecnológico ainda é discreto, mas está ganhando muito interesse tanto do ponto de vista científico quanto industrial (SALVIA-TRUJILLO et al., 2015).

Existe a necessidade de novos métodos de redução ou eliminação de patógenos em alimentos, visto que a segurança alimentar é um constante problema de saúde pública. A sociedade ocidental a longo prazo vem seguindo a tendência do “consumo verde”, buscando alimentos com menos aditivos sintéticos e produtos com menor impacto

sobre o meio ambiente. A Organização Mundial da Saúde estabeleceu que as indústrias diminuam o teor de sal nos alimentos industrializados, a fim de reduzir a incidência de doenças cardiovasculares (BURT, 2004). Como consequência dessa redução de sal, é necessário o uso de outros aditivos para suprir a função de conservação proveniente desse aditivo e, à luz da tendência dos consumidores optarem por alimentos mais próximos aos naturais, os óleos essenciais apresentam-se como uma boa alternativa para auxiliar na conservação dos alimentos (TRAJANO et al., 2009).

2.2 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS

Óleos essenciais têm sido mencionados como poderosos agentes antimicrobianos naturais contra uma variedade de agentes patogênicos de origem alimentar (KIM et al., 1995; HILL et al., 2013). Por ser natural, sua potencialidade para uso em alimentos se dá pelo fato de satisfazer uma exigência dos consumidores, que preferem alimentos sem conservantes sintéticos. Muitos óleos essenciais já são reconhecidos como substâncias seguras (GRAS) para uso em alimentos pelo FDA, não sendo necessária uma nova aprovação para seu uso (HILL et al.; 2013). Balaguer et al. (2013) relatam que vários componentes individuais extraídos dos óleos essenciais, quer a partir do material vegetal ou fabricado sinteticamente, também são classificados como agentes flavorizantes pela Comissão Europeia, e geralmente reconhecidos como seguros pelo FDA.

Os óleos essenciais são formados por vários compostos e sua atividade antimicrobiana não pode ser atribuída apenas à ação de apenas um. Vários pesquisadores propuseram que a ação antimicrobiana dos óleos essenciais deve ser atribuída a sua capacidade de penetrar no interior da célula inibindo algumas propriedades funcionais e lipofílicas da célula (CALO et al., 2015). A interação do óleo essencial com as membranas da célula microbiana resulta na inibição do crescimento de algumas bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (CALSAMIGLIA et al., 2007).

De acordo com Salvia-Trujillo et al. (2015) a ação antimicrobiana dos óleos essenciais tem sido atribuída aos seus compostos fenólicos e sua interação com as membranas da célula microbiana. É caracterizada por penetrar através da membrana celular e

causar a fuga de íons e conteúdo citoplasmático ocasionando a ruptura celular.

Alecsik e Knezevic (2014) relatam que existem seis possíveis mecanismos de ação antimicrobiana: desintegração da membrana citoplasmática, interação com proteínas da membrana (ATPases e outras), perturbações da membrana exterior de bactérias Gram-negativas com a liberação de lipopolissacarídeos, desestabilização da força motriz de prótons com fuga de íons, coagulação do conteúdo da célula e inibição da síntese de enzimas.

Um dos principais problemas no uso dos óleos essenciais é que em sua maioria são altamente voláteis, quimicamente instáveis devido sua oxidação, volatilização ou interações químicas com outros componentes e quando submetidos a elevações de temperatura perdem sua eficiência antimicrobiana (SEO, MIN e CHOI, 2010). São vários os desafios que a indústria precisa superar para que esses compostos possam ser usados em alimentos, pois, mesmo em baixas concentrações, podem alterar drasticamente as propriedades sensoriais, são altamente insolúveis em água devido sua natureza lipofílica e podem ter contato limitado com patógenos presentes em alimentos com alto teor de umidade (HILL, GOMES e MATTHEW TAYLOR, 2013).

Vários óleos essenciais têm efeito antimicrobiano contra vários micro-organismos patógenos de origem alimentar. Dentre estes, destaca-se o óleo de alho e o eugenol, por apresentarem ação antimicrobiana frente a diversos micro-organismos (BURT, 2004; PEREIRA et al., 2008; SANTOS et al., 2011; NORI et al., 2011; HILL, GOMES e MATTHEW TAYLOR, 2013; PINHO et al., 2014).

2.2.1 Óleo essencial de alho

A família *Aliaceae* compreende 450 espécies, sendo estas amplamente distribuídas no hemisfério norte. Entre eles, a cebola (*Allium cepa* L.) e o alho (*Allium sativum* L.) são espécies muito conhecidas e utilizadas na medicina tradicional e na alimentação em muitos países. O alho e seus constituintes possuem atividade antimicrobiana contra importantes bactérias patogênicas, principalmente devido à presença da alicina, responsável em grande parte por essa atividade, além do aroma e *flavor* (ROHANI et al., 2011; WANG et al., 2008).

O alho é uma erva bulbosa, perene, cujo bulbo fornece óleo essencial (0,1 a 0,2%). O princípio ativo, a alicina, encontra-se na droga

fresca sob a forma de um precursor inativo, a aliina. A trituração dos bulbos provoca rápida reação enzimática por ação da enzima aliinase que converte a aliina em alicina, cujo odor característico do alho é imediatamente conhecido (KATZUNG, 2006).

Ankri e Mirelman (1999) relatam que o alho possui atividade antibacteriana, antifúngica, antiparasita e antiviral. Segundo Bakri e Douglas (2005) a alicina e o extrato de alho possuem amplo espectro contra bactérias *Escherichia*, *Salmonella*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Clostridium* e *Mycobacterium*. Além da alicina, o óleo de alho também possui importantes propriedades antimicrobianas, conforme constatado por Indu et al. (2006). Em particular, os autores mostraram que o alho apresentou excelente atividades antibacterianas em diversas concentrações testadas e em diferentes cepas, como por exemplo em *Escherichia coli*, demonstrando seu elevado potencial tecnológico.

2.2.2 Eugenol

De acordo com Escobar (2002) o eugenol tem mostrado atividade bactericida, na medida em que inibe a respiração e a divisão celular. Assim, a parede celular bacteriana é desnaturada pela presença do próton que causa a lise bacteriana. Segundo Boaventura et al. (2006) o mecanismo ocorre em nível de membrana plasmática, juntamente com a inativação de enzimas e/ou no material genético celular. É possível que parte do efeito antimicrobiano do eugenol esteja relacionado com a sua natureza fenólica.

Vários trabalhos mostram que o eugenol apresenta atividade nematicida, inseticida, antiviral, bactericida, fungicida, anestésico e antisséptico, sendo empregado na indústria farmacêutica, alimentícia e química (TIPPAYATUM, 2007; SILVESTRI et al. 2010; SILVA, 2011).

O eugenol é tido como o componente dos óleos essenciais que melhor reduz a atividade bacteriana, inibindo dessa forma o crescimento de *Staphylococcus* sp., *Micrococcus* sp., *Bacillus* sp. e *Enterobacter* sp. (PNR et al. 2005; BURT, 2004). Tippayatum e Chonhenchob (2007) observaram que o eugenol também apresenta atividade inibitória para as bactérias formadoras de esporos, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes* e formadoras de endósporo, *Bacillus cereus*. Trabalhos realizados por Oussalah et al. (2007) e Affonso et al.

(2012) mostraram que o eugenol é efetivo contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.

Tanto o eugenol quanto o óleo de alho são substâncias complexas e propensas a degradação na presença de oxigênio, luz, calor, umidade e outros agentes agressivos, tornando-as instáveis, o que dificulta a sua conservação. Portanto, é necessário o desenvolvimento de técnicas que possibilitem aumentar o tempo de vida útil destes compostos e também a sua estabilidade em diferentes produtos (NORI et al., 2011; HOSSEINI et al., 2013).

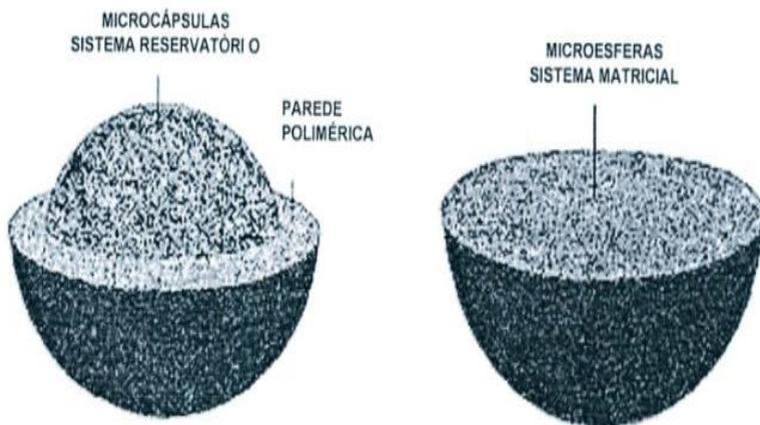
2.3 MICROENCAPSULAMENTO

A técnica de microencapsulamento apresenta um grande potencial de aplicação para o aprimoramento e desenvolvimento de estruturas para a conservação dos produtos naturais. Na última década houve um grande progresso no desenvolvimento de compostos microencapsulados para a indústria alimentícia e farmacêutica, por oferecerem maior resistência à degradação e por se tornarem mais estáveis (CHOI et al., 2009; TIWARI et al., 2010; WU, LUO e WANG, 2012; HOSSEINI et al., 2013; KAMIMURA et al., 2014; PINHO et al., 2014).

O microencapsulamento é um processo pelo qual minúsculas partículas de ingredientes ativos de gás, líquidos ou sólidos são empacotadas em um material. De modo geral, pode-se classificar o processo como: macro ($> 5000 \mu\text{m}$), micro ($0,2$ a $5000 \mu\text{m}$) e nano ($< 0,2 \mu\text{m}$). Quanto à forma, as cápsulas são idealmente esféricas, embora seu tamanho seja influenciado pela estrutura original do ingrediente encapsulado (RISCH e REINECCIUS, 1995).

Quanto à estrutura física, conforme a Figura 1, as micropartículas podem ser classificadas como microcápsulas ou microesferas. As microcápsulas consistem em micropartículas onde o núcleo está envolvido por uma camada ou filme polimérico formando um sistema do tipo reservatório. O material microencapsulado é chamado de núcleo ou fase interna, enquanto a fase externa é chamada de parede, revestimento ou membrana. As microesferas diferem das microcápsulas pelo fato de constituírem um sistema matricial, no qual o polímero forma uma rede tridimensional onde o material a ser microencapsulado pode estar adsorvido, incorporado ou ligado covalentemente à matriz polimérica, formando sistemas de dissolução, dispersão ou sistemas porosos (JÚNIOR, 2005).

Figura 1 – Esquema representativo de microcápsula e microesfera, respectivamente.



Fonte: Júnior, 2005.

O material polimérico usado no encapsulamento pode ser escolhido de acordo com a aplicação das microcápsulas, podendo variar de polímeros naturais, sintéticos ou até mesmo uma combinação desses, dependendo da finalidade de uso. Da Rosa et al. (2013) destacam que a composição do material de revestimento é o principal determinante para as propriedades da microcápsula e pode ser usada para melhorar o desempenho de um composto bioativo.

A finalidade básica da microencapsulação na indústria de alimentos é proteger os ingredientes encapsulados contra a oxidação química ou de fatores do ambiente como a luz, a temperatura, o ar e a umidade, além de protegerem compostos no caso de algumas vitaminas, pigmentos e compostos bioativos, como os óleos essenciais, por suas inúmeras propriedades (RISCH e REINECCIUS, 1995; THIES, 2004; BARROS e STRINGHETA, 2006; TIWARI et al., 2010). Também tem como objetivo o retardamento da evaporação de núcleos voláteis, como alguns óleos essenciais. Em algumas técnicas, a cápsula pode ser projetada para liberar lentamente o produto ou até que determinada condição físico-química seja alcançada (THIES, 2004; BARROS e STRINGHETA, 2006).

Os mecanismos de liberação dos materiais ativos microencapsulados variam de acordo com a natureza do agente encapsulante, sendo que normalmente ocorrem devido a mecanismos

como: variação de temperatura e de pH, solubilidade do meio, biodegradação, difusão, ruptura mecânica, permeabilidade seletiva e gradiente de concentração existente em relação ao meio de liberação (FAVARO-TRINDADE, PINHO e ROCHA, 2008).

A microencapsulação pode manter a bioatividade do composto. No entanto, o grau de proteção oferecido por esta técnica é determinado pela escolha do método de encapsulamento (GOUIN, 2004; DA ROSA et al., 2013). Além disso, a escolha do agente encapsulante depende de vários fatores, entre eles a não reatividade com o material a ser encapsulado, o processo utilizado para a formação da microcápsula e o mecanismo de liberação ideal (FAVARO-TRINDADE, PINHO e ROCHA, 2008).

Para o processo de microencapsulação, a seleção do material encapsulante é uma etapa muito importante. Tal material deve ser escolhido em função das características do composto ativo, da aplicação pretendida e do método de formação das partículas. Diferentes materiais de parede podem ser empregados, como, por exemplo, proteínas e polissacarídeos, derivados do ácido acrílico/metacrílico, lipídeos, açúcares, ácidos orgânicos e ciclodextrinas (RISCH e REINECCIUS, 1995; MATIOLI e RODRIGUEZ-AMAYA, 2003).

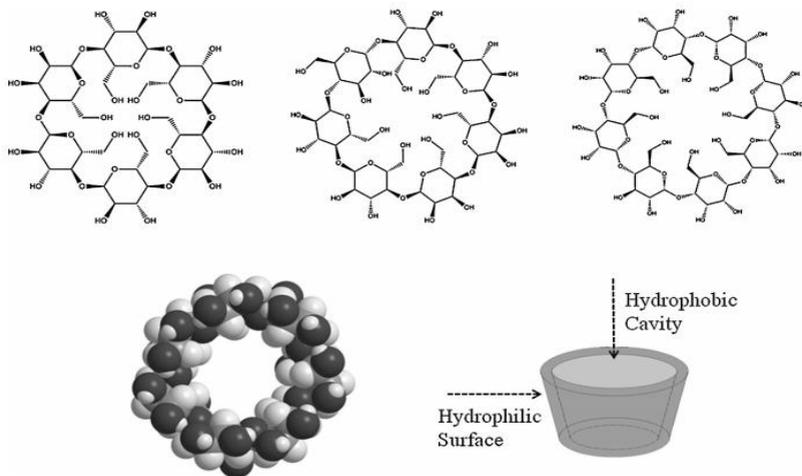
2.4 CICLODEXTRINAS (CD)

As ciclodextrinas são um grupo de moléculas naturais cíclicas constituídas por unidades de glicopiranosas unidas por ligações α -(1,4). Estes oligossacarídeos são obtidos por degradação enzimática do amido sob ação da enzima glicosiltransferase (CGT amilase do *Bacillus macerans*), que produz uma reação intramolecular sem a participação de uma molécula de água (SZEJTLI, 1998).

As ciclodextrinas naturais são macromoléculas contendo um número de unidades de glicose compreendido entre 6, 7 e 8, denominando-se respectivamente, α -, β - e γ -CD (MARQUES, 2010). As Figuras 2 e 3 mostram a representação esquemática das ciclodextrinas mais usuais. Destas, a β -CD é a mais utilizada, pois sua cavidade apolar pode hospedar moléculas de massa molecular entre 100 e 400 g.mol⁻¹, faixa de massa molecular da maioria das moléculas de interesse (WANG et al., 2011). Além disso, o preço razoável desta ciclodextrina também propicia seu uso (AGUIAR et al., 2014). Elas são solúveis em água e possuem a capacidade de formar complexos de inclusão reversíveis com moléculas apolares, incrementando de forma exponencial sua

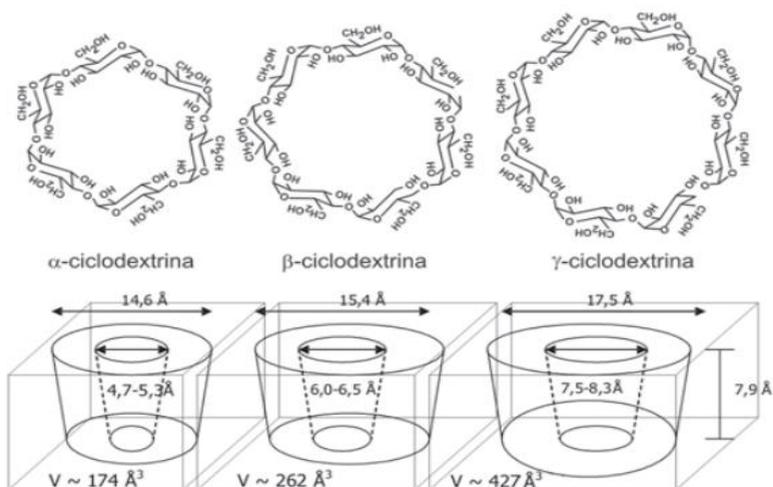
solubilidade em meio aquoso (DAVI e BREWSTER, 2004; AGUIAR et al., 2014).

Figura 2 - Representação esquemática da α , β e γ -ciclodextrina (da esquerda para a direita).



Fonte: Pinho et al. (2014).

Figura 3 – Estruturas da α , β e γ -CD.

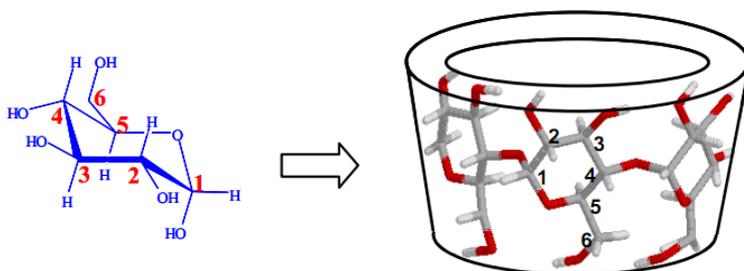


Fonte: Marques, 2010.

Estas moléculas possuem forma assemelhada a um cone, com uma cavidade de 7,9Å de profundidade. Os diâmetros superior e inferior da cavidade das CDs são 4,7 e 5,3Å para a α -CD, 6,0 e 6,5Å para a β -CD e 7,5 e 8,3Å para a γ -CD. As CDs modificadas surgiram a partir da tentativa de alterar ou melhorar suas estruturas a fim de obter complexos de inclusão adequados a vários setores, como industrial, alimentício e farmacêutico, e assim um largo número de CDs modificadas tem sido sintetizado (VENTURINI, 2008).

As unidades de glicopiranosose estão unidas em conformação α -(1,4) glicosídica, estando todos os grupos -OH secundários situados na parte mais larga, enquanto que os grupos -OH primários na parte mais estreita, conforme visualizado na Figura 4. O interior da cavidade está constituído por hidrogênios H₃, H₅ e H₆ e oxigênios glicosídicos. Os pares de elétrons não-ligantes destes oxigênios pertencentes à ligação glicosídica se encontram orientados em direção ao interior da cavidade, o que origina uma alta densidade eletrônica, deixando a molécula com características de base de Lewis (VENTURINI, 2008).

Figura 4 - Estrutura funcional da β -ciclodextrina.



Fonte: Budal (2003).

Os grupos hidroxilas secundários OH (2) e OH (3) estão em posição equatorial, porém com o OH (2) apontando para o interior e o OH (3) para o exterior da cavidade, bem como a hidroxila primária OH (6). Isto faz com que exista o dobro de grupos OH voltados para fora do que para dentro da cavidade, o que leva a um momento dipolar da molécula relativamente grande. Devido à distribuição dos grupos funcionais que formam a ciclodextrina, a parte externa adquire caráter hidrofílico e a interna hidrófoba ou de natureza apolar. O grupo OH (C2) de uma unidade de glicopiranosose pode formar pontes de hidrogênio

com o -OH (C3) da unidade adjacente. No caso da β -ciclodextrina, estas ligações formam um cinturão secundário completo, o que lhe confere uma estrutura bastante rígida. Esta é uma possível explicação da menor solubilidade da β -ciclodextrina com relação às demais. No caso da α -ciclodextrina, o cinturão formado a partir das ligações de pontes de hidrogênio não é completo, pois uma das moléculas das unidades de glicopiranosose está em uma posição distorcida, de maneira que somente quatro das seis possíveis uniões através de pontes de hidrogênio podem ser estabelecidas. No caso da γ -ciclodextrina, esta possui uma estrutura não coplanar, o que a torna mais flexível e, portanto, a mais solúvel das três (SZEJTLI, 1988; BUDAL, 2003).

As ligações entre as moléculas hóspede e as ciclodextrinas não são fixas ou permanentes, o que ocorre é um equilíbrio termodinâmico. A ligação depende da força de complexação entre as moléculas hóspede-hospedeiro e, em específico, das interações locais que ocorrem com os átomos da superfície. A capacidade de formação de complexos de inclusão das ciclodextrinas tornou-as adequadas para diversas aplicações em alimentos, cosméticos, agricultura, indústria farmacêutica, embalagens e têxteis. A complexação pode aumentar consideravelmente a estabilidade, solubilidade e biodisponibilidade da molécula hóspede (ZHAN et al., 2008; SING, SHARMA, BANERJEE, 2002; DEL VALLE, 2004).

Diversos estudos de toxicidade mostram que CDs são atóxicas, ou seja, não oferecem riscos de intoxicação, pois as mesmas não são absorvidas no trato gastrointestinal ou através de membranas biológicas lipofílicas e os mesmos resultados foram obtidos frente a teratogenicidade e mutagenicidade (HIRAYAMA e UEKAMA, 1999; AMERICAN PHARMACEUTICAL ASSOCIATION, 2006; CUNHA-FILHO e SÁ-BARRETO, 2007; GUEDES et al., 2008; EVANGELISTA, 2010). Szente e Szejtli (2004) estudaram a toxicidade das CDs e demonstraram que a administração oral de altas doses de CDs não provoca nenhum dano.

2.5 MÉTODOS DE MICROENCAPSULAMENTO

Existem várias técnicas que podem ser utilizadas para microencapsulação, sendo que a seleção do método é dependente da aplicação que será dada à microcápsula, do tamanho desejado, do mecanismo de liberação e das propriedades físico-químicas, tanto do

material ativo, quanto do agente encapsulante (FAVARO-TRINDADE et al., 2008).

De um modo geral, o princípio básico da microencapsulação é comum a todas as técnicas, iniciando-se com a deposição do agente encapsulante sobre o agente a encapsular, seguindo uma série de etapas. Inicialmente o agente encapsulante é dissolvido ou fundido, encontrando-se no estado líquido. Por sua vez, o agente a encapsular pode estar presente na forma de partículas pequenas (se for sólida) ou em gotas (se for líquido) ou até mesmo na forma de gás. O material a encapsular é colocado em um meio apropriado e, posteriormente, sobre este, deposita-se o agente encapsulante. Por fim, o agente encapsulante sofre solidificação, formando-se as micropartículas (BRASILEIRO, 2011).

Segundo Dalmoro et al. (2012) as etapas fundamentais para cada método de microencapsulação são: incorporação dos compostos bioativos, formação das gotículas, remoção do solvente, coleta das microcápsulas e secagem.

De acordo com a natureza do envolvimento ou aprisionamento entre o agente encapsulante e o material encapsulado, os métodos podem ser divididos em 3 grupos fundamentais: químicos, físicos e físico-químicos (TIWARI et al., 2010). A Tabela 1 traz, de forma resumida, os 3 métodos de encapsulação, bem como o estado físico do material encapsulável e a faixa de tamanho das cápsulas obtidas.

Tabela 1 - Métodos utilizados para encapsulamento estado físico do material encapsulável e faixa de tamanho das cápsulas obtidas.

Métodos de encapsulação	Materiais encapsuláveis	Faixa de tamanho (µm)
MÉTODOS FÍSICOS		
Extrusão estacionária	Líquido/sólido/gás	1.000-6.000
Bocal submerso	Líquido/sólido/gás	700-6.000
Extrusão centrífuga	Líquido/sólido/gás	125-3.000
Bocal vibrante	Líquido/sólido/gás	500-2.000
<i>Spray drying</i>	Líquido/sólido	5-150
Disco rotativo	Líquido/sólido	5-1.000
Suspensão por ar	Sólido	50-10.000
<i>Spray chilling e spray cooling</i>	Líquido/sólido	20-200
Leito fluidizado	Sólido	>100
Co-cristalização	Sólido/líquido	-
Liofilização	Líquido	-
MÉTODOS FÍSICO-QUÍMICOS		
Polimerização interfacial	Líquido/sólido	1-500
Inclusão molecular	Líquido	5-50
Polimerização <i>in situ</i>	Líquido/sólido	1-500
Métodos físico-químicos		
Coacervação simples	Líquido/sólido	20-500
Coacervação complexa	Líquido/sólido	1-500
Lipossomas	Líquido/sólido	0,02-3
Lipoesferas (<i>solid lipid nanoparticles e nanostructured lipid carriers</i>)	Líquido/sólido	0,02-10
Evaporação do solvente	Líquido/sólido	1-5.000

Fonte: Favaro-Trindade et al. (2008).

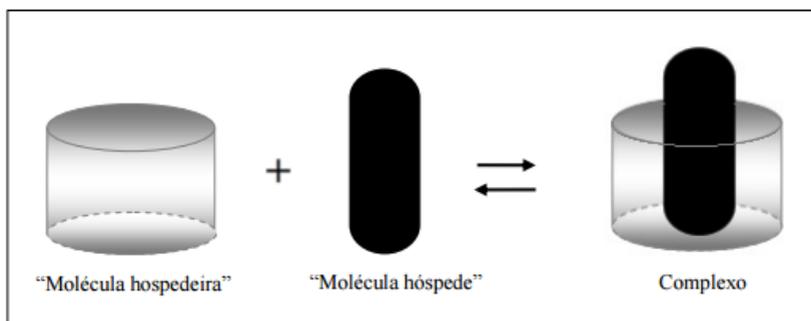
2.5.1 Complexos de inclusão

Este processo ocorre em nível molecular e utiliza normalmente a β -ciclodextrina (β CD) como material encapsulante, sendo um método frequentemente aplicado para encapsular compostos como vitaminas, óleos essenciais, corantes, aromas, etc. (BRASILEIRO, 2011).

A principal força motriz que favorece a encapsulação molecular consiste na substituição das moléculas de água que possuem elevada entalpia por moléculas hóspedes de menor entalpia. Trata-se de um processo energeticamente viável por promover uma alteração favorável de entalpia, aumento de entropia e redução da energia total do sistema, fatores que contribuem para o aumento da estabilidade do complexo formado. Interações eletrostáticas de *Van der Waals*, interações hidrofóbicas e ligações de hidrogênio também contribuem para formação e estabilização dos complexos de inclusão (CIs) (LYRA et al., 2010; EVANGELISTA, 2010).

Devido a sua cavidade hidrofóbica, na qual substratos podem ser “aprimados” para formar complexos de inclusão, as ciclodextrinas podem hospedar distintos compostos, cuja estequiometria mais usual é 1:1. As ciclodextrinas formam complexos de inclusão com substâncias que possuem tamanho, polaridade e forma geométrica compatíveis com a dimensão de sua cavidade. Algumas alternativas para a formação de complexos com moléculas significativamente maiores que sua cavidade podem ser obtidas através de uma interação parcial do hóspede ou mediante a formação de complexos ciclodextrina-hóspede de estequiometria diferente de 1:1, apresentada na Figura 5, que apresenta um esquema ilustrativo da formação do complexo de inclusão (BUDAL, 2003; MARQUES, 2010).

Figura 5 – Esquema ilustrativo da formação do complexo de inclusão.



Fonte: Adaptado de Davis e Brewster (2004).

Quando em uma solução aquosa de ciclodextrina se adiciona um composto de menor polaridade se comparado à água, tendo ambos forma e dimensão compatíveis, as moléculas de água que preenchem a cavidade da ciclodextrina, estando em um estado energeticamente menos favorável, são substituídas pela nova molécula. A cavidade central da ciclodextrina vai atuar, então, como uma molécula “hospedeira”, podendo alojar uma molécula “hóspede” total ou parcialmente, caso haja compatibilidade para formar o complexo de inclusão (SZEJTLI, 1988; BUDAL, 2003).

A formação de complexos de inclusão altera significativamente as características da molécula hóspede. Estas alterações incluem modificações na sua reatividade química, fixação de moléculas muito voláteis, melhoria na solubilidade, estabilização de moléculas sensíveis à luz, calor e oxidação, proteção da degradação por micro-organismos, aumento da solubilidade, redução da volatilidade, mascaramento de corantes ou pigmentos e atividade catalítica com substratos (TAKASCHI, 1998; VENTURINI et al., 2008). As consequências diretas mais importantes da inclusão de um substrato por uma CD em água são relativas ao aumento da solubilidade da molécula hóspede na solução. Ocorrem, ainda, modificações nas propriedades espectrais do substrato e na reatividade do substrato incluído, havendo sua conversão de hidrofóbico para hidrofílico (VENTURINI et al., 2008).

Estudos mostram que as CD não só mascaram o sabor dos óleos essenciais a serem utilizados como agentes antimicrobianos, mas também protegem contra a oxidação causada por altas temperaturas, o que permite o uso destes óleos por manter sua eficácia como agente

antimicrobiano numa ampla variedade de condições ambientais e por longos períodos de tempo (DUCHÊNE, 1987; SZEJTLI, 1998).

Segundo Budal (2003) os princípios ativos ou óleos essenciais, quando presentes em solução aquosa, estão sujeitos muitas vezes a reações de degradação, o que leva a uma diminuição de sua atividade ou mesmo formação de produtos de degradação indesejáveis e prejudiciais à saúde. Quando fazem parte de um complexo de inclusão, poderão estar protegidos das situações de degradação ou instabilidade.

Além disso, supõe-se que a formação de complexos de inclusão em ciclodextrinas leva ao aumento da solubilidade e da velocidade de dissolução de princípios ativos lipofílicos, o que pode refletir em um aumento de sua biodisponibilidade ou em diminuição de seus efeitos secundários (LOFTSSON e BREWSTER, 1996; OTERO et al., 1991; RAJEWSKI e STELLA, 1996, apud BUDAL, 2003). Geralmente, a solubilidade de um composto aumenta com a quantidade de ciclodextrina adicionada. O aumento da solubilidade parece estar relacionado com a solubilidade intrínseca da molécula hóspede, bem como com a habilidade de inclusão da molécula hospedeira em água, sendo que esses fatores refletem na magnitude da constante de estabilidade do complexo (BUDAL, 2003).

A liberação do ingrediente encapsulado depende do tipo de geometria da partícula e do agente encapsulante utilizado para formar a microcápsula. O mecanismo de liberação da substância encapsulada pode ocorrer devido ao efeito do solvente, difusão, degradação ou fratura da partícula (SHAHIDI; HAN, 1995; WHORTON, 1995; PEREIRA, 2007). Pode ocorrer, ainda, através da ruptura mecânica, pela ação da temperatura, do pH e pela solubilidade do meio, podendo ser combinado um ou mais tipos de mecanismos que atuam simultaneamente (WHORTON, 1995; SUAVE et al., 2006).

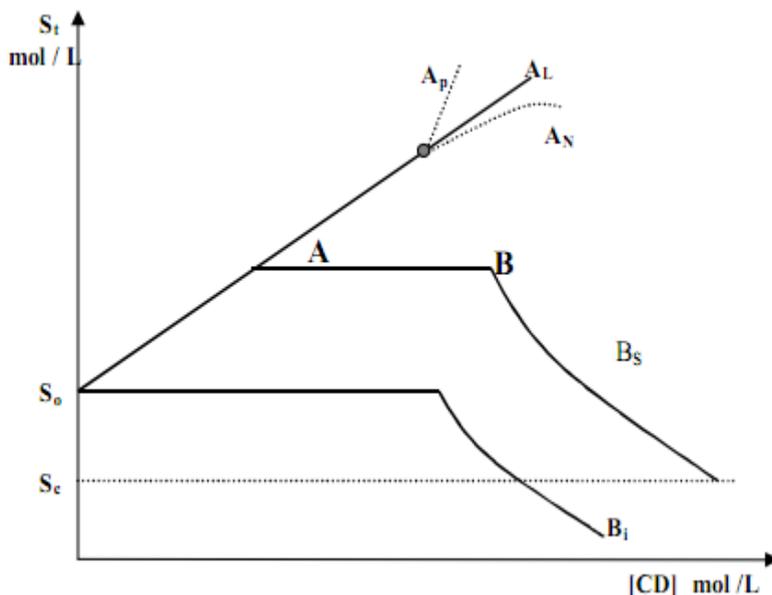
2.6 DIAGRAMA OU ISOTERMA DE SOLUBILIDADE

A maioria dos estudos relacionados com o cálculo da constante de formação do complexo de inclusão se baseia na determinação das mudanças que ocorrem na solubilidade do substrato quando na presença de diferentes concentrações de ciclodextrina. Mediante este procedimento é possível determinar a formação do complexo de inclusão, o tipo de complexo e calcular sua constante (BUDAL, 2003).

Os diagramas de solubilidade, ou ainda, curva de solubilidade de fases, foram propostos por Higuchi e Connors (1965) e consistem em

uma das técnicas de aproximação mais utilizadas na caracterização da formação de complexos de inclusão em solução. São construídos pela representação gráfica da solubilidade da molécula hóspede (substrato), no eixo vertical, com relação à concentração da molécula hospedeira (ciclodextrina), no eixo horizontal (Figura 6). Os complexos de inclusão são preparados adicionando-se uma quantidade em excesso do composto a ser encapsulado, molécula hóspede, às soluções contendo concentrações crescentes de ciclodextrina e a quantificação final do substrato é feita após o equilíbrio (BUDAL, 2003).

Figura 6 - Tipos de diagrama de solubilidade.



Fonte: BUDAL (2003).

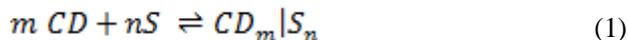
A solubilidade total aparente da molécula hóspede (S_t) aumenta linearmente devido à formação do complexo de inclusão solúvel. No entanto, no ponto A , a solubilidade do complexo alcança seu limite. A S_t da molécula hóspede é constante entre os pontos A e B , já que os três equilíbrios apresentados na Figura 6 se mantêm inalterados nesta região. Depois do ponto B , uma vez que se consumiu todo o substrato sólido com a adição de maior quantidade de ciclodextrina, ocorre diminuição da concentração do substrato não complexado em solução, devido à formação do complexo e precipitação concomitante de complexo

insolúvel. Isto se traduz em uma diminuição da solubilidade até um valor constante que corresponde à solubilidade inerente do complexo de inclusão (S_c) (BUDAL, 2003).

Ainda de acordo com Budal (2003) é possível definir dois grupos principais, A e B, que são, por sua vez, subdivididos em outras categorias: A_p , A_L , A_N , B_S e B_I . Segundo essa teoria, se classificam como perfis do tipo A quando a solubilidade do substrato aumenta com o incremento da concentração de CD.

Quando o complexo é de primeira ordem com respeito à CD (estequiometria 1:1) e de primeira ordem ou superior com respeito ao substrato, um perfil tipo A_L é obtido. Se o complexo formado é de primeira ordem em relação ao substrato, mas de segunda ordem ou superior em relação à CD, o perfil de solubilidade obtido possui um desvio positivo da linearidade, sendo classificado como diagramas do tipo A_p . Perfis do tipo A_N possuem interpretação mais complexa devido à multiplicidade de fenômenos que podem ocorrer. Perfis do tipo B são obtidos com a formação de complexos de baixa solubilidade aquosa, em alguns casos inclusive inferior à da molécula hospedeira e que precipitam à medida que há encapsulação. As curvas B_I são caracterizadas por não apresentarem aumento algum da solubilidade do substrato, originando complexo de inclusão insolúvel, já as do tipo B_S apresentam em concentrações baixas de ciclodextrina um aumento progressivo da solubilidade aparente da molécula hóspede até atingir o ponto máximo de solubilidade (ZORNIO, 2013).

Um parâmetro importante que pode ser extraído a partir de uma curva de solubilidade de fase de um dado sistema ciclodextrina-substrato é a constante de complexação ou estabilidade (K_c) (BUDAL, 2003). Pela consideração teórica, no equilíbrio a reação de formação do complexo de inclusão é dada pela Equação (1), assumindo a formação de um complexo de estequiometria 1:1, ou seja, de primeira ordem:



Sendo que, CD é a ciclodextrina; S é o substrato (molécula hóspede), $CD_m | S_n$ é o complexo de inclusão e m e n representam a estequiometria da reação. Dessa forma, a constante de complexação do complexo de inclusão, K_c , pode ser obtida através da Equação (2):

$$K_c = \frac{[CD_m | S_n]}{[CD]^m \times [S]^n} \quad (2)$$

E, do mesmo modo, tem-se a constante de dissociação K_d :

$$K_d = \frac{[CD]^m \times [S]^n}{[CD_m | S_n]} = \frac{1}{K_c} \quad (3)$$

Para as curvas de solubilidade de fase do tipo **A**, ou **B_s**, Higuchi e Connors (1965) derivaram uma equação que permite calcular a constante de complexação e a inclinação da reta na região em que o complexo de inclusão é solúvel. Portanto, define-se no equilíbrio a concentração de substrato total $[S_t]$ (dada pela soma da sua concentração intrínseca (S_0) e aparente, quando complexado com a ciclodextrina) e a concentração total da ciclodextrina, $[CD_t]$:

$$[S_t] = [S_0] + m[CD_m | S_n] \quad (4)$$

$$[CD_t] = [CD] + n[CD_m | S_n] \quad (5)$$

Rearranjando, tem-se:

$$[CD_m | S_n] = \frac{[S_t] - [S_0]}{m} \quad (6)$$

$$[CD] = [CD_t] - n[CD_m | S_n] \quad (7)$$

Como o equilíbrio é de primeira ordem para a ciclodextrina, chega-se à Equação (8):

$$S_t = \frac{mK_c S_0^m CD_t}{1 + K_c S_0^m} + S_0 \quad (8)$$

Isso permite que o gráfico de $[S_t]$ por $[CD_t]$ tenha como inclinação (α):

$$\alpha = \frac{mK_c S_0^m}{1 + K_c S_0^m} \quad (9)$$

Se for considerada uma estequiometria de complexação de ordem um para ambos os constituintes, m será igual a 1 e define-se a Equação 10:

$$K_c = \frac{\alpha}{S_0(1 - \alpha)} \quad (10)$$

Esta é uma técnica simples que permite a obtenção de várias informações sobre a natureza dos complexos de inclusão, como a solubilidade intrínseca do substrato no meio $[S_0]$, o comportamento do complexo de inclusão ($[CD_m | S_n]$), a estequiometria do equilíbrio em solução (m e n) e constantes de complexação (K_c) e dissociação (K_d). Através dos resultados do K_c pode-se afirmar que a curva de solubilidade de fase de Higuchi e Connors (1965) é uma técnica muito importante para caracterização de um complexo de inclusão.

2.6.1 Aditivos para embalagens poliméricas

Atualmente, a aditivação é o processo de excelência, utilizado pela indústria, na produção de polímeros com elevado desempenho. Grande percentagem dos polímeros produzidos industrialmente usa aditivos nas suas formulações para melhorar uma ou mais das suas propriedades, reduzir o custo de fabrico, melhorar a moldagem ou introduzir uma cor desejada nos polímeros. As principais categorias a que pertencem os aditivos compreendem os antioxidantes, agentes antiestética, corantes, agentes de acoplamento, agentes de cura, retardantes de chama, agentes espumantes/expansão, estabilizantes térmicos, modificadores de impactos, lubrificantes, agentes nucleadores, plastificantes, preservantes, coadjuvantes de processo e estabilizadores de raios ultravioletas (UV) (LOKENS GARD, 2013; BIKIARIS, 2011).

Os aditivos são essenciais ao processo de transformação de embalagens, de modo que resinas puras são raramente processadas. Os aditivos incorporados em uma resina variam conforme o tipo e aplicação. No caso de embalagens antimicrobianas, vários tipos de aditivos podem ser incorporados, sendo esses divididos em orgânicos e

inorgânicos, além da possibilidade da modificação química do polímero para adquirir a propriedade antimicrobiana (MUÑOZ-BONILLA e FERNÁNDEZ-GARCÍA, 2012). Essas possibilidades podem ser via incorporação de um composto inorgânico ou orgânico em um polímero ou ainda via modificação química desse polímero.

Vários agentes antimicrobianos orgânicos têm sido introduzidos nos materiais poliméricos. Dentre eles, pode-se citar o triclosan, que está entre os mais utilizados pela indústria polimérica (MUÑOZ-BONILLA e FERNÁNDEZ-GARCÍA, 2012). Vários outros aditivos orgânicos são utilizados em virtude de sua propriedade antimicrobiana, como os óleos essenciais, que possuem potencial de uso também devido ao fato de serem naturais e considerados seguros pelo FDA, como já citado no decorrer deste trabalho.

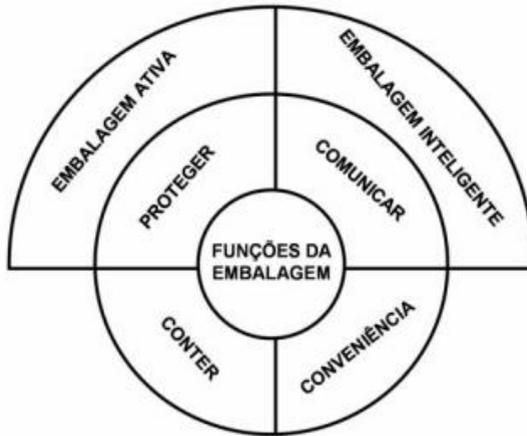
Além disso, tem-se incorporado metais em materiais poliméricos para alimentos micro e nano-estruturados para melhorar as propriedades de barreira e mecânica, bem como para impedir a fotodegradação desses materiais. Os metais pesados são agentes antimicrobianos eficazes e são incorporados para fins de preservação de alimentos e para descontaminar superfícies em ambientes industriais. Nanoestruturas de cobre, zinco, titânio e prata estão demonstrando perspectivas de segurança e tecnologia para os alimentos. A migração de cátions das matrizes poliméricas é o ponto chave para determinar a sua eficácia antimicrobiana. No entanto, essa migração é limitada e, muitas vezes, dificulta sua aplicação em virtude dos limites permitidos pela Anvisa (LLORENS et al., 2012).

2.6.2 Embalagens ativas

A indústria de embalagens constitui-se importante setor da economia mundial, sendo o segmento de alimentos um dos setores que mais investe em tecnologias inovadoras, sempre com objetivo de aumentar a vida de prateleira dos alimentos (*shelf life*). Uma inovação que vem ganhando espaço no segmento alimentício são as embalagens ativas, ou seja, aquelas que interagem de maneira intencional com o alimento, visando melhorar algumas de suas características. A principal função adicional das embalagens ativas é a de proporcionar a migração de moléculas incorporadas a sua estrutura, impedindo ou retardando a deterioração microbiológica dos alimentos, enquanto as embalagens passivas se limitam a proteger os alimentos de condições externas, conforme Figura 7. As embalagens ativas alteram as condições do

produto, aumentando sua vida de prateleira, segurança e qualidade, e/ou melhorando suas características sensoriais (MEDEIROS et al., 2011).

Figura 7 - Funções básicas das embalagens e interfaces de atuação das embalagens ativas e inteligentes.



Fonte: Adaptado de YAM, TAKHISTOV e MILTZ (2005).

A crescente preocupação com a qualidade microbiológica dos alimentos tem aumentado o interesse pelos filmes antimicrobianos. A embalagem antimicrobiana é um tipo promissor de embalagem ativa que apresenta substância antimicrobiana incorporada e/ou imobilizada no material e é capaz de eliminar ou inibir os micro-organismos deterioradores e/ou patogênicos (SOARES, 2009).

Os agentes antimicrobianos podem ser incorporados diretamente à matriz polimérica em rótulos, etiquetas ou estar contidos em sachês (OLIVEIRA e OLIVEIRA, 2004). Sua adição nos filmes poliméricos pode ser feita de duas maneiras: incorporação e imobilização. No primeiro caso, há liberação do agente antimicrobiano para o alimento, enquanto na imobilização o composto atua somente em nível de superfície (HAN, 2005).

O uso de embalagens contendo agentes antimicrobianos tem como vantagem a difusão desses compostos para a superfície do alimento de maneira controlada. Com isso, os aditivos estão presentes em menores quantidades e atendem à demanda atual do consumidor, que é por alimentos livres de conservantes químicos sintéticos e com agentes antimicrobianos apenas na superfície do produto, onde a maior parte das deteriorações por micro-organismos ocorrem. Quando o agente

antimicrobiano é liberado da embalagem, a cinética de crescimento microbiano e a atividade antimicrobiana na superfície do produto podem ser equilibradas. Dessa forma, a atividade antimicrobiana da embalagem pode ser estendida, garantindo a segurança durante a distribuição e consumo dos alimentos (APPENDINI e HOTCHKISS, 1997; QUINTAVALLA e VICINI, 2002; OLIVEIRA e OLIVEIRA, 2004).

Segundo Sung et al. (2014) a embalagem antimicrobiana é mais eficaz que o uso de agentes antimicrobianos diretamente nos alimentos. Isto porque a adição direta nos alimentos pode causar a rápida difusão desses componentes, fazendo com que sua atividade seja rapidamente perdida, pelo processo térmico ou reação com outros componentes. Já a adição de antimicrobianos diretamente na embalagem faz com que a migração para a superfície do alimento seja contínua, mantendo constante a concentração durante longo tempo.

Os óleos essenciais podem ser incorporados aos filmes para melhorar as suas propriedades funcionais, tais como permeabilidade ao vapor de água, bem como atribuir propriedades antimicrobianas e antioxidantes. Esses sistemas ativos controlam a taxa de liberação do agente antimicrobiano, exercendo, assim, efeitos letais ou inibitórios contra os micro-organismos deteriorantes presentes nos alimentos (BALAGUER et al., 2013).

Ainda, alguns fatores podem afetar a efetividade da embalagem antimicrobiana, como as características do antimicrobiano (solubilidade e tamanho da molécula) e do alimento, condições de estocagem e distribuição (tempo e temperatura), método de preparo do filme (extrusão ou *casting*) e interação entre antimicrobiano e polímero (DAWSON et al., 2003; CHA et al., 2003). Desta forma, conhecendo-se os mecanismos de ação deste tipo de embalagem e os mecanismos de ação e estabilidade dos óleos essenciais, pode-se inferir que o mesmo critério poderia ser aplicado para embalagens ativas com óleos essenciais.

2.7 POLI(METACRILATO DE METILA) (PMMA)

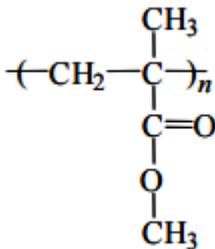
Os polímeros sintéticos fazem parte do nosso cotidiano e representam uma das classes de materiais mais versáteis que existem, apresentando inúmeras aplicações, como na indústria de alimentos, farmacêutica e de cosméticos. Para a escolha do polímero sintético adequado para as diversas aplicações, além das propriedades de cada

material, a característica primordial é o fato de ser atóxico e seguro para os consumidores.

O poli(metacrilato de metila) (PMMA) é o mais importante dos polímeros da família dos acrílicos, pois apresenta boa performance vítrea, resistência a fatores externos como o tempo e excelente estabilidade dimensional (PARRAS et al., 2005). Segundo Canevarolo Jr. (2012) sua resistência ao impacto é baixa quando comparada a muitos outros termoplásticos no mercado, como PE, PP, PVC, etc. De acordo com Rocha (2013), o PMMA é um polímero termoplástico com superfície de brilho intenso e alta transparência. Além disso, possui extraordinária resistência à fotodegradação oxidativa, notável estabilidade à luz solar e resistência ao intemperismo. Pode ser usado em diversas áreas, principalmente em contato com alimentos. Foi o primeiro polímero acrílico a ser utilizado como biomaterial (CHEN et al., 2010).

Tem como monômero o metacrilato de metila (MMA), conforme Figura 8, obtido do processo de polimerização radicalar. O PMMA possui um grupo éster na sua cadeia, tornando-o um polímero mais polar, sendo encontrado apenas na conformação atática e, portanto, é classificado como um polímero amorfo (ALVES, 2015).

Figura 8 - Unidade monomérica do poli(metacrilato de metila).



Fonte: ALVES (2015).

O PMMA não é biodegradável, mas é biocompatível, ou seja, a classe de polímeros pode ser conjugada com proteínas, biomoléculas e ingredientes farmacêuticos ativos, encontrando usos promissores nas áreas de sistemas de liberação de fármacos, culturas de célula, bioprocessos enzimáticos, dentre outros (UCHEGBU e SCHATZLEIN, 2006; MENDES et al., 2012; LORCA et al., 2012; FONSECA et al., 2013; FEUSER et al., 2014; FEUSER et al., 2015). O PMMA possui

biocompatibilidade e podem ser produzidos por polimerizações em emulsão, miniemulsão ou suspensão (MENDES et al., 2012; AIERTZA et al., 2012).

Vários trabalhos são encontrados na literatura com uso de PMMA em microcápsulas, principalmente no que se refere à imobilização de enzimas em suportes poliméricos (DALLA-VECCHIA, 2004) e associação com outros polímeros na preparação de nanopartículas, como o alginato (SAJEESH e SHARMA, 2004) e a quitosana (SAJEESH e SHARMA, 2006). Li et al. (2013), utilizaram PMMA para o encapsulamento de poli(éter amina), que atua como um agente de cura para resinas tipo epóxi, sendo sua escolha devido sua estabilidade química em relação ao agente de cura e, também, por apresentar compatibilidade com epóxi.

No caso de sistemas orais para liberação de fármacos, as matrizes podem ser monolíticas (comprimidos ou cápsulas) ou particuladas (minicomprimidos, grânulos ou *pellets*, incorporados em comprimidos ou cápsulas). Tais sistemas podem ser preparados a partir de polímeros solúveis em água, polímeros insolúveis erodíveis ou polímeros insolúveis inertes. Nas matrizes, o fármaco encontra-se disperso no polímero e o controle da liberação pode ocorrer por um ou mais dos seguintes mecanismos: difusão, dissolução, hidratação, precipitação, erosão e/ou degradação. Dentre os polímeros sintéticos que podem ser usados, o PMMA é um deles (VILLANOVA e ORÉFICE, 2010).

O PMMA apresenta temperatura de fusão de 160°C, enquanto que nos polietilenos a temperatura de fusão é de, aproximadamente, 120°C (CANEVAROLO JR., 2012). O revestimento das microcápsulas de β CD contendo em seu núcleo extratos naturais pode ser uma alternativa importante para a obtenção de um aditivo antimicrobiano dotado de princípios ativos naturais empregados no processo de fabricação de embalagens poliméricas. A escolha de um polímero de revestimento com uma temperatura de fusão pouco acima dos polímeros aplicados na fabricação das embalagens é um fator importante, pois enquanto ocorre a fusão da matriz polimérica as microcápsulas estarão protegidas por apresentarem pontos de fusão superiores.

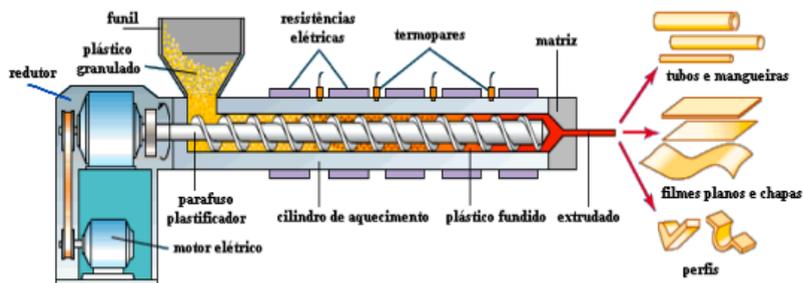
2.8 PROCESSO DE EXTRUSÃO E COEXTRUSÃO DE FILMES POLIMÉRICOS

Existem vários tipos de processamento para polímeros. No caso específico de filmes, pode ser usada a extrusão, laminação ou, ainda, a moldagem por compressão térmica. Entretanto, o mais utilizado industrialmente é o processo por extrusão, seja pela espessura dos filmes, como também pela rentabilidade que representa por ser um processo contínuo. A extrusão pode ser descrita como um processo em que o polímero fundido (plastificado) é moldado, continuamente, fazendo-o passar através de uma abertura (matriz) que possui a forma aproximada da seção transversal do produto desejado (FERREIRA, 2012).

Em termos gerais, a extrusora funciona como uma bomba, sendo que suas funções consistem em transportar um material sólido, plastificar, homogeneizar e transportar o material plastificado, e, por fim, bombeá-lo por uma matriz. Esse bombeamento deve promover um fluxo uniforme e constante do polímero até a saída da matriz. Na matriz, o material é conformado e, logo após, tem sua geometria fixada pelo sistema de resfriamento. Os tipos de extrusora mais comuns são as extrusora de rosca simples e rosca dupla (FERREIRA, 2012; LOKENSGARD, 2013). A Figura 9 apresenta os componentes de uma extrusora.

Durante o processo de extrusão de filmes poliméricos, deve-se considerar duas importantes questões para a manutenção de uma propriedade especial que pode ser agregada ao filme, como para a produção de embalagens antimicrobianas com uso de óleos essenciais: a temperatura usada no processamento do material, bem como o tempo de residência desse material na extrusora e o cisalhamento gerado pela movimentação do material no interior do canhão.

Figura 9 - Componentes de uma extrusora.



Fonte: Adaptado de LOKENSGARD (2013.)

Os óleos essenciais são componentes que possuem baixa estabilidade frente às elevadas temperaturas de processo, que podem chegar a 200 °C. Grande parte desta energia é produzida pelo atrito entre o material polimérico e as superfícies metálicas do equipamento (LOKENSGARD, 2013).

Estas condições são agressivas às moléculas dos óleos essenciais e promovem a rápida degradação térmica e a sua volatilização. Assim, a eficiência de incorporação dos óleos essenciais *in natura* diretamente no processo de extrusão torna-se inviável. Uma pequena fração das moléculas do princípio ativo antimicrobiano resiste aos fatores degradativos e, como consequência, o efeito antimicrobiano agregado na etapa final dos filmes poliméricos é imperceptível. Dessa forma, o microencapsulamento contribui para aumento da estabilidade dos óleos essenciais frente às temperaturas de processo e se destaca como potencial para formação de aditivos antimicrobianos naturais.

3 ESTADO DA ARTE DO MICROENCAPSULAMENTO DE ÓLEOS ESSENCIAS

Vários trabalhos têm sido realizados avaliando a atividade antimicrobiana dos extratos naturais, sobretudo dos óleos essenciais. No entanto, em sua maioria somente avaliam essa propriedade e poucos se dedicam ao estudo de seu uso em aplicações alimentícias. Estudos mais recentes, realizados na última década, têm demonstrado a possibilidade de utilização desses óleos como aditivos alimentares, ou ainda sua incorporação em embalagens de alimentos, demonstrando sua potencial aplicação. Porém, um dos problemas encontrados é que a maioria dos trabalhos utiliza polímeros naturais ou ainda fazem a incorporação direta do óleo essencial ao material da embalagem, o que resulta, possivelmente, na perda de grande parte da atividade em razão da temperatura usada no processamento desses.

Turasan, Sahin e Sumnu (2015) estudaram o encapsulamento do óleo essencial de osmarin. Os autores relatam que a encapsulação é uma das técnicas eficientes que isola e protege o núcleo de fatores ambientais. Também ajuda a “mascarar” o sabor indesejado e o odor do óleo, evitando a evaporação de componentes voláteis.

Pan et al. (2014) estudaram o timol encapsulado em caseinato de sódio e verificaram que o timol encapsulado foi mais eficaz do que o não encapsulado contra patógenos do leite, devido à sua melhor distribuição e maior solubilidade do óleo essencial encapsulado.

Chen, Zhang e Zhong (2015) coencapsularam o eugenol e o timol em nanopartículas de caseína que foram secas por pulverização. Os complexos secos foram reidratados, facilmente produzindo uma dispersão estável. Os óleos essenciais encapsulados mostraram sua liberação controlada em 24 h, sendo que o eugenol encapsulado apresentou taxa de liberação mais elevada do que o timol. Foi observado efeito bactericida e bacteriostático em soro de leite para *Escherichia coli* e *Listeria monocytogenes*, respectivamente.

Giteru et al. (2015) desenvolveram um filme a base de uma proteína do sorgo contendo agente antimicrobiano e antioxidante natural, citral e quercetina. Observaram que os filmes com citral apresentaram elevada atividade antimicrobiana contra *C. jejuni*, *Listeria monocytogenes* e *Pseudomonas fluorescens*. No entanto, ambos os óleos essenciais transmitiram uma cor amarelada aos filmes, reduzindo

significativamente a permeabilidade do oxigênio e alterando também velocidade de transmissão de vapor de água.

Gao, Feng e Jiang (2014) desenvolveram uma embalagem ativa com óleos essenciais de cravo, cinamaldeído e tomilho para evitar a rápida deterioração de cogumelo, pois a sua alta taxa de respiração e natureza delicada contribuíram para o seu escurecimento. Resultados indicaram que todos os óleos usados podem inibir a senescência dos cogumelos, destacando a maior eficiência para o cinamaldeído. Echegoyen e Nerin (2015) observaram o efeito da embalagem ativa com óleo de canela sobre a deterioração pós-colheita de cogumelos. Eles verificaram que a embalagem ativa preveniu a perda de peso e escurecimento quando comparado com embalagens não-ativas.

Emiroglu et al. (2010) estudaram o uso de óleos essenciais como antimicrobianos naturais frente a bactérias deteriorantes em diferentes matrizes alimentares, como carne e derivados cárneos. No entanto, sua aplicação direta requer concentrações elevadas de óleos essenciais, o que pode modificar as características organolépticas desses produtos. O uso de encapsulamento como um sistema de liberação controlada é sugerido como uma alternativa para a aplicação direta de óleos essenciais em alimentos. De acordo com Marques (2010) a β -ciclodextrina é um dos agentes encapsulantes mais utilizados, devido ao tamanho de sua cavidade, que é adequado para óleos essenciais e está contido na lista de ingredientes considerados seguros desde 1998, classificado como um portador de *flavour* e agente protetor.

Uma das limitações do uso de óleo de alho na indústria de alimentos é devida a sua volatilidade, forte odor, insolubilidade em água e baixa estabilidade físico-química. Essas desvantagens podem ser revertidas por complexação com ciclodextrinas em solução aquosa. Os complexos de inclusão com ciclodextrinas podem melhorar a estabilidade dos hóspedes, aumentar a solubilidade em água, proteger contra a oxidação, proteger contra a decomposição induzida pela luz, minimizar os efeitos de temperatura de processo, mascarar ou reduzir os efeitos fisiológicos e reduzir sua volatilidade (Wang et al., 2011).

Quintavalla e Vicini (2002) realizaram um trabalho incorporando óleo essencial de alho em uma embalagem polimérica para carnes e relataram que a eficácia da embalagem antimicrobiana se deve à retenção do composto pelas cadeias poliméricas e que o efeito é prolongado devido à migração lenta e contínua do óleo essencial. Além disso, os autores relataram que o uso do filme antimicrobiano contendo óleo essencial de alho não apresentou efeito significativo na redução de *E. coli*.

De acordo com Sung et al. (2014) a maioria das pesquisas realizadas com filmes antimicrobianos de alho, são focadas no desenvolvimento de filmes comestíveis e nenhuma pesquisa tem relatado o estudo do desenvolvimento de filme polimérico incorporado com óleo de alho via extrusão plana ou extrusão balão. A explicação pode ser porque a alicina, responsável em grande parte pela propriedade antimicrobiana, é muito instável e rapidamente se decompõe em processos que usam altas temperaturas e pressões. Entretanto, segundo alguns autores, essa atividade não é perdida, uma vez que os produtos da degradação da alicina são eficazes contra vários tipos de microorganismos (CORZO-MARTINEZ, CORSO e VILLAMIEL, 2007; SUNG et al., 2014).

Soares et al. (2009) realizaram um estudo com embalagens ativas com filmes de polipropileno (PP) imobilizados com extrato natural de alecrim e testaram suas propriedades antioxidantes em mioglobina pura e bifes de carne bovina fresca. Esse extrato foi usado com objetivo de estabilizar a mioglobina e manter a carne com aspecto mais atrativo.

Sung et al. (2014) estudaram a incorporação de óleo de alho em filmes de polietileno de baixa densidade (PEBD) para inibição de patógenos alimentares em nacos de carne de porco. As concentrações de óleo de alho incorporadas nos filmes foram de 2%, 4%, 6% e 8%. Também foram avaliadas as propriedades de barreira ao vapor de água, estabilidade térmica e o efeito da colagem, influenciadas pela incorporação do óleo de alho. Os resultados mostraram que todas as concentrações de óleo de alho apresentaram resultados frente a *Listeria monocytogenes* após 3, 6, 9 e 15 dias de armazenamento a 4°C. Os filmes que possuíam óleo de alho incorporados apresentaram propriedades de barreira mais fracas. Não houve diferença significativa na estabilidade térmica dos filmes. Os autores observaram também que o óleo de alho não alterou a estrutura do polímero.

Pode-se observar que a ciclodextrina já vem sendo usada como forma de proteção para os compostos com atividade antimicrobiana e antioxidante, conforme observado em outros estudos.

De acordo com Cevallos et al. (2010) do ponto de vista industrial, a tecnologia de encapsulação foi notavelmente desenvolvida nos últimos anos visando o aumento da solubilidade e o controle da liberação dos componentes ativos que são adicionados, sendo aplicada na indústria farmacêutica, cosmética e de alimentos para aumentar a estabilidade e retenção desses componentes. Segundo Szente e Szejtli (2004) dentre as vantagens da utilização da complexação de

biomoléculas lábeis (vitaminas, OE, corantes), é possível evitar a exposição de umidade e condições de temperatura, luz e oxidação, além da proteção da degradação por micro-organismos, que podem levar à degradação das mesmas.

4 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

Nesta etapa serão apresentados os procedimentos experimentais para caracterização microbiológica do eugenol e óleo de alho puros, a obtenção das microcápsulas de β CD-eugenol e de β CD-óleo de alho, a caracterização química, física e microbiológica das microcápsulas obtidas, a síntese do PMMA, a etapa de revestimento das microcápsulas com PMMA e o efeito da secagem em estufa das microcápsulas antes e após o revestimento com PMMA.

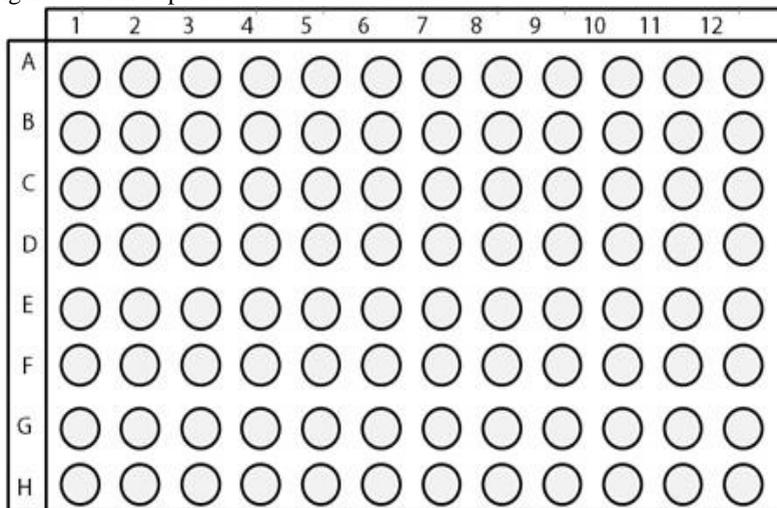
4.1 CARACTERIZAÇÃO MICROBIOLÓGICA DOS COMPOSTOS

4.1.1 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) do eugenol e do óleo de alho

Previamente ao encapsulamento, procedeu-se a determinação da concentração inibitória mínima (CIM) do eugenol e do óleo de alho puros. O objetivo deste teste foi avaliar as concentrações mínimas de cada composto com atividade antibacteriana frente as bactérias *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*.

A CIM foi realizada conforme as recomendações do manual de testes de susceptibilidade de antimicrobianos (CLSI, 2005), com algumas modificações. O eugenol e o óleo de alho, da Marca Laszlo, foram inicialmente ajustadas para uma concentração de $10000 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de dimetilsulfóxido 10% (DMSO), da marca Vetec. O teste de diluição foi realizado em microplacas estéreis de 96 cavidades, conforme Figura 10, com fundo em forma de “U”, contendo 100 μL de caldo BHI (*Brain Heart Infusion*), da marca INLAB.

Figura 10 - Microplacas estéreis de 96 cavidades.



Em seguida, 200 μL das soluções de eugenol e óleo de alho foram adicionadas às cavidades das microplacas. Os testes foram realizados em triplicada e denominado como A1, A2 e A3 para cada composto. Após homogeneização das amostras (linha A), alíquotas de 100 μL foram transferidas para a linha B, e assim sucessivamente, para obter soluções com diferentes concentrações, conforme a Tabela 2.

Tabela 2 - Concentração de eugenol e óleo de alho usadas no CIM.

Linha	Concentração ($\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$)
A	10000
B	5000
C	2500
D	1250
E	625
F	312,5
G	156,25
H	78,125

Nessas soluções foram adicionados 5 μL dos inóculos bacterianos de *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Staphylococcus aureus* ATCC 9763, preparados com uma concentração de 10^4 UFC $\cdot\text{mL}^{-1}$. As colunas 10, 11 e 12 foram usadas para as soluções controle do experimento. A coluna 10 foi usada como controle negativo do solvente DMSO 10% usado no preparo das diferentes concentrações do eugenol e óleo de alho. A coluna 11 foi usada para avaliar a viabilidade bacteriana, sendo definida como controle positivo, contendo apenas o inóculo e o caldo BHI. A coluna 12 foi usada para avaliar a esterilidade do meio, adicionando-se apenas uma solução de Mueller-Hinton. As microplacas foram incubadas em estufa bacteriológica a 35°C por 20 h. Para o óleo de alho os controles foram feitos em microplacas separadas.

Decorrido esse intervalo de tempo, foi acrescido a cada um dos orifícios 20 μL de uma solução aquosa de TTC (Cloreto de Trifenil Tetrazolium), da marca Sigma Aldrich, a 0,5 %, e as microplacas foram novamente incubadas por mais 4 h a 35 °C em estufa bacteriológica da marca Quimis. Após esta última incubação, a presença de uma coloração vermelha nos orifícios indica crescimento bacteriano, enquanto a ausência da coloração vermelha, indica atividade inibitória das concentrações de eugenol e óleo de alho.

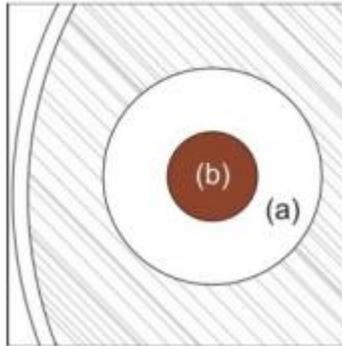
4.1.2 Difusão em Ágar para o eugenol, óleo de alho e β -ciclodextrina puros

O teste de difusão em ágar é muito utilizado para avaliar a atividade antibacteriana dos materiais e compostos. Essa técnica apresenta como vantagem a análise visual da atividade inibitória desses compostos. Esse teste foi aplicado para complementar o CIM e também determinar a área bacteriostática do eugenol, óleo de alho e βCD puros.

Previamente à realização dos ensaios microbiológicos, as cepas bacterianas, de *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Staphylococcus aureus* ATCC 9763, foram ativadas em caldo BHI (*Brain Heart Infusion*) à temperatura de 36 °C por 24 h. Os testes de difusão por poço foram realizados conforme manual de testes de susceptibilidade de antimicrobianos (CLSI, 2005). As placas contendo ágar PCA (*Plate Count Agar*), preparadas antecipadamente, foram retiradas da refrigeração até atingir a temperatura ambiente. Com um *swab* estéril, o inóculo bacteriano com turvação 0,5 da escala de *MacFarland* foi distribuído uniformemente sobre a superfície do ágar, em seguida

deixadas em repouso em temperatura ambiente, por aproximadamente 3 min. Em cada placa foram feitos 2 poços de 6 mm de diâmetro. Em cada poço, devidamente identificado, adicionou-se 0,5 mL de cada composto puro e 0,5 g de β CD. Posteriormente, as placas foram incubadas em estufa bacteriológica, da marca Quimis, à temperatura de 35 ± 1 °C por 24 h. O diâmetro dos halos de inibição foi mensurado e associado diretamente com a ação antibacteriana conforme Fiori (2009), Figura 11.

Figura 11 - Esquema representativo da área biocida: (a) Área biocida e (b) Área da amostra.



$$A_{bio} = A_{ex} - A_{in}$$

Onde A_{bio} é a área biocida e representa a ação biocida do material, A_{ex} é a área de inibição do micro-organismo e A_{in} é a área da amostra.

4.2 OBTENÇÃO DOS COMPLEXOS DE INCLUSÃO β CD-EUGENOL E β CD-ÓLEO DE ALHO

4.2.1 Espectros de UV-visível do eugenol e óleo de alho

Previamente à obtenção das curvas de calibração, realizou-se uma varredura para encontrar o comprimento de onda de absorção máximo para o eugenol e para o óleo de alho, utilizando-se um espectrofotômetro UV-Visível, marca Scinco e modelo SUV 2120, variando entre os comprimentos de onda de 200 a 400 nm, em cubetas de quartzo. Os espectros padrões de UV-visível do eugenol e do óleo de

alho indicaram bandas de absorção máximas em aproximadamente 280 nm para o eugenol e próximas a 217 nm para o óleo de alho.

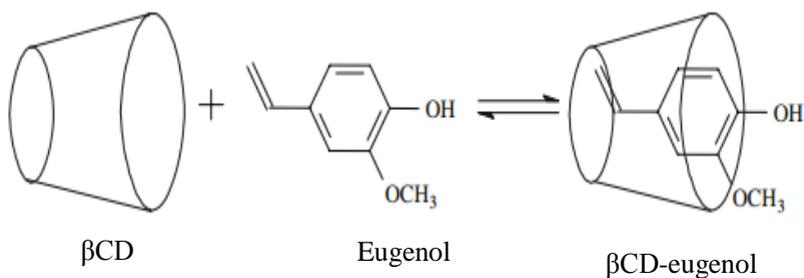
Para a obtenção da curva de calibração do eugenol foram preparadas 8 soluções, nas seguintes concentrações: 0,4; 0,35; 0,30; 0,25; 0,20; 0,15; 0,10; 0,05 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, em água destilada. Para obtenção da curva de calibração do óleo de alho, foram preparadas 9 soluções, nas seguintes concentrações: 0,1; 0,09; 0,08; 0,07; 0,06; 0,05; 0,04; 0,03; 0,02 e 0,01 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, em metanol.

A curva de calibração relaciona a intensidade do principal pico de absorbância no espectro UV-visível com a concentração conhecida de eugenol e de óleo de alho na solução. É importante ressaltar que as curvas de calibração foram obtidas com soluções com concentrações abaixo do limite de solubilidade para cada composto.

4.2.2 Formação dos complexos de inclusão de β CD-eugenol e β CD-alho

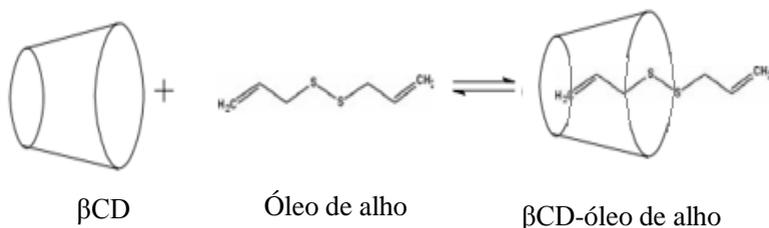
Após definição da CIM do eugenol e do alho, procedeu-se a formação dos complexos de inclusão em β CD, conforme esquema apresentado nas Figuras 12 e 13.

Figura 12 - Formação de complexo de inclusão de β CD-eugenol.



Fonte: Zhan et al., (2008).

Os complexos foram obtidos em solução aquosa e desidratados pela técnica de liofilização.

Figura 13 - Formação de complexo de inclusão de β CD-álho.

Fonte: Adaptado de Zang, Jiang e Li (2007).

Os complexos de inclusão foram preparados conforme descrito por Hill et al. (2013), com algumas modificações. Os diferentes volumes de eugenol e óleo de alho foram misturados em 50 mL de água destilada e em 1 g de β CD. As misturas foram agitadas em erlenmeyers selados, para evitar a perda de compostos voláteis. Estes erlenmeyers permaneceram em agitação em um *Shaker* da marca Dist modelo THOLZ TDH, à temperatura de 25 °C por 24 h. Após este período, as misturas foram congeladas em um congelador doméstico e colocadas em um liofilizador, marca LIOTOP e modelo L101, a -52 °C e pressão de 62 μ Hg, por aproximadamente 72 h, até a remoção total da água.

Tabela 3 - Quantidade de eugenol usada para microencapsulação.

Amostra	Volume de eugenol (mL)	Massa de eugenol (g)	Concentração de eugenol no meio reacional (mmol.L ⁻¹)
8	1,56250	1,65625	201,74
7	0,93750	0,99375	121,04
6	0,62500	0,66250	80,69
5	0,31250	0,33125	40,35
4	0,21875	0,23188	28,24
3	0,15625	0,16563	20,17
2	0,11500	0,12190	14,85
1	0,09375	0,09938	12,10

Tabela 4 - Quantidade de óleo de alho usada para microencapsulação.

Amostra	Volume de óleo de alho (mL)	Massa de óleo de alho (g)	Concentração de óleo de alho no meio reacional (mmol.L⁻¹)
8	1,8	1,908	272,67
7	0,9	0,954	136,33
6	0,6	0,636	90,89
5	0,3	0,318	45,59
4	0,2	0,212	30,30
3	0,15	0,159	22,72
2	0,12	0,127	18,15
1	0,1	0,106	15,15

As amostras liofilizadas foram armazenadas em recipientes adequados para a proteção da luz e absorção de umidade para posterior caracterização.

4.2.3 Curva de solubilidade de fases para determinação da constante de formação ou estabilidade (Kc)

A curva de solubilidade de fases é uma das técnicas mais importantes para caracterizar e identificar a formação de complexos de inclusão. A formação do complexo de inclusão ocorre com a incorporação do substrato insolúvel em água na cavidade hidrofóbica da ciclodextrina, o que permite que a sua disponibilidade em solução aumente e caracterize a solubilização aparente do substrato. Esta curva é uma representação gráfica da solubilidade aparente da espécie receptora em função da concentração de ciclodextrina. Os complexos de inclusão foram preparados adicionando quantidades do substrato às soluções contendo concentrações crescentes de ciclodextrina e a quantificação final do substrato é feita após o equilíbrio (HIGUCHI e CONNORS, 1965).

O procedimento seguiu de acordo com o trabalho realizado por Brandão et al. (2003), com algumas modificações, onde em 200 mL de água destilada acrescentam-se concentrações crescentes de β CD entre 0 e 15 mmol.L⁻¹. Foram mantidas fixas a massa de eugenol em 1,656 g e a

massa de óleo de alho em 1,908 g, relativas às maiores massas de cada composto usadas para formação dos complexos de inclusão. Após 24 h de agitação, as concentrações de eugenol e de óleo de alho na solução foram determinadas, separadamente, a partir dos espectros de UV-visível das curvas de calibração de cada composto. A formação da constante de estabilidade (Kc) foi estimada assumindo a estequiometria de 1:1 para a formação dos complexos de inclusão de β CD-eugenol e de β CD-alho, conforme a equação 11.

$$Kc = \frac{k}{S_0} (1 - k) \quad (11)$$

Onde S_0 (mol.L^{-1}) é a concentração de eugenol e de óleo de alho disperso em água destilada na ausência de β CD e K é a inclinação da curva.

4.2.4 Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

A aplicação da espectroscopia na região do infravermelho (FTIR) é um método indispensável para a caracterização de compostos orgânicos. A técnica permite detectar grupos funcionais característicos de cada composto puro bem como do complexo de inclusão formado.

As amostras de eugenol, óleo de alho, β CD e das microcápsulas de β CD-eugenol e β CD-alho foram caracterizadas por espectroscopia no infravermelho, marca Shimadzu e modelo IR PRESTIGE-21, empregando-se um Espectrofotômetro de Infravermelho com Transformada de Fourier, com transmitância de luz, do Laboratório de Controle de Processos da UFSC. Os espectros de infravermelho foram obtidos na região de 4000 a 400 cm^{-1} , com uma resolução de 4 cm^{-1} . As amostras de β CD e dos complexos de β CD-eugenol e β CD-alho foram moídas e misturadas em KBr em pó, grau espectroscópico. Em seguida, procedeu-se a formação de pastilhas de, aproximadamente, 1 mm de espessura (2 mg de amostra por 200 mg de KBr seco).

4.2.5 Análise Termogravimétrica (TGA)

A análise termogravimétrica é uma técnica que está fundamentada na medida da perda de massa de uma determinada amostra em função da temperatura ou do tempo.

As análises foram realizadas no Laboratório de Polímeros da Universidade de Caxias do Sul (LPol), conforme os procedimentos previstos na norma ASTM E1131-14. As análises foram realizadas em um Analisador Termogravimétrico, Marca Schimadzu e Modelo TGA 50. O ensaio partiu da temperatura ambiente até a temperatura de 810 °C, com taxa de aquecimento de 10 °C·min⁻¹, utilizando atmosfera inerte de nitrogênio de alta pureza com vazão de 50 mL·min⁻¹.

A partir dos resultados das análises termogravimétricas foi possível avaliar a perda de massa do eugenol, do óleo de alho, da β CD e dos respectivos complexos de inclusão de β CD-eugenol e β CD-alho em função da temperatura.

4.2.6 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A técnica de microscopia eletrônica de varredura fornece informações sobre as características morfológicas das microcápsulas, tais como a presença de fissuras e poros, e permite uma análise rápida e direta da eficiência do processo de encapsulação. A presença de fissuras e trincas na superfície das microcápsulas pode comprometer a proteção oferecida ao encapsulado. Além disso, é possível verificar a partir das micrografias a homogeneidade do tamanho das cápsulas formadas (ROSENBERG et al., 1995).

Esta análise foi realizada no Instituto de Nanotecnologia (CEOSP). A amostra foi revestida com ouro, usando um evaporador a vácuo, e analisada com um equipamento da marca CEOSP e modelo JEOL 6390, com diferentes ampliações.

Pode-se avaliar a morfologia interna e externa, porosidade, presença de fissuras e tamanho médio da β CD pura e das microcápsulas de β CD-eugenol e β CD-alho.

4.2.7 Análises Microbiológicas das microcápsulas

4.2.7.1 Difusão em ágar

O teste de difusão em ágar foi realizado conforme descrito no item 4.1.2. Em cada placa foram feitos 3 poços de 6 mm de diâmetro. Em cada poço, devidamente identificado, adicionou-se 0,5 g de cada complexo de inclusão de β CD-eugenol e de β CD-óleo de alho, relativos

às diferentes massas de eugenol e óleo de alho microencapsuladas, especificadas nas Tabelas 2 e 3.

Posteriormente, as placas foram incubadas em estufa bacteriológica, da marca Quimis, à temperatura de 35 ± 1 °C por 24 h. Decorrido este tempo, procedeu-se a medida dos halos de inibição e determinação da área bactericida, conforme especificado no mesmo item.

4.2.7.2 Método de Concentração Inibitória Mínima (MIC)

A CIM foi determinada conforme procedimento descrito no item 4.1.1. A CIM foi realizada para as microcápsulas de β CD-eugenol e de β CD-alho relativas às maiores concentrações de eugenol e óleo de alho microencapsuladas, especificadas nas Tabelas 2 e 3, respectivamente.

Inicialmente, foram preparadas soluções com concentração de $10000 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de microcápsulas de β CD-eugenol e de β CD-alho em dimetilsulfóxido 10% (DMSO), da marca Vetec, e, posteriormente, procederam-se as mesmas diluições realizadas para os compostos puros.

4.3 TRATAMENTO TÉRMICO DOS COMPLEXOS DE INCLUSÃO DE β CD-EUGENOL E DE β CD-ÓLEO DE ALHO

Após a obtenção das microcápsulas liofilizadas, 0,5 g de microcápsulas de β CD-eugenol e de β CD-alho foi tratada termicamente em estufa (marca Quimis) por 1 h. Para o complexo de inclusão de β CD-eugenol, a temperatura empregada foi de 75°C e para o complexo de inclusão de β CD-óleo de alho a temperatura foi de 60°C. As temperaturas foram definidas de acordo com os termogramas obtidos por TGA, considerando valores superiores à temperatura de volatilização dos substratos.

O objetivo dos tratamentos térmicos foi de avaliar se toda massa de eugenol e óleo de alho, especificadas nas Tabelas 2 e 3, foi encapsulada ou se uma fração da massa dos compostos não foi encapsulada e está livre nos compostos. As concentrações de eugenol e de óleo de alho encapsuladas foram determinadas com o auxílio de um espectrofotômetro UV-Visível (marca Scinco, modelo SUV 2120), com leituras no comprimento de onda de 280 nm para o eugenol e de 217 nm

para o óleo de alho. O cálculo da concentração nominal de cada substrato foi obtido através das curvas de calibração dos compostos puros.

Após o tratamento térmico das microcápsulas de β CD-eugenol e de β CD-óleo de alho, foram realizadas as caracterizações por TGA (conforme item 4.2.4), FTIR (conforme item 4.2.3), MEV (conforme item 4.2.5), Difusão em ágar (conforme item 4.1.2) e CIM (conforme item 4.1.1). Esta etapa foi realizada para verificar se a temperatura promoveu alterações e se a atividade antibacteriana das microcápsulas foi alterada.

4.4 REVESTIMENTO DAS MICROCÁPSULAS DE β CD-EUGENOL E DE β CD-ÓLEO DE ALHO COM PMMA

4.4.1 Síntese do PMMA

A síntese do polimetilmetacrilato foi conduzida conforme descrito por Bresolin (2013), com adaptações. O meio reacional foi preparado misturando-se 3 g do monômero metacrilato de metila (MMA) e 0,14 g do iniciador 2,2'-azo-bis-isobutironitrila (AIBN), ambos da Sigma Aldrich, em um reator de vidro. A mistura foi homogeneizada e selada e a reação procedeu-se a 80°C por aproximadamente 3 h.

A solução polimérica foi colocada em placas de Petri para secagem em temperatura ambiente e posterior utilização.

4.4.2 Revestimento dos complexos de inclusão de β CD-eugenol e de β CD-óleo de alho com PMMA

Para a realização do revestimento dos complexos de inclusão de β CD-eugenol e de β CD-óleo de alho com PMMA foi necessário, inicialmente, solubilizar o polímero PMMA em 5 mL de acetona pura (marca VETEC).

Para definição das condições da mistura de acetona, massa de PMMA e massa dos complexos de inclusão, foram misturadas proporções de cada componente. A proporção que melhor se ajustou foi 5,0 : 0,1 : 0,1 (v/m/m).

Para o revestimento dos complexos de inclusão foram adicionados 5 mL de acetona em 2 tubos de ensaio. Em cada um dos

tubos foi adicionado 0,1 g de PMMA. Os tubos foram agitados até a completa solubilização do PMMA e, em seguida, adicionado 0,1 g dos complexos de inclusão de β CD-eugenol e de β CD-óleo de alho, em tubo separados.

Em seguida, procedeu-se a agitação e mistura dos componentes, em um recipiente do tipo borrifador, por, aproximadamente, 15 min. Decorrido esse tempo, a mistura foi borrifada em placas de Petri, em distância entre 25 e 30 cm, aproximadamente.

Durante a aspersão da mistura nas placas de Petri, a acetona evaporou, restando apenas uma mistura sólida sobre a superfície da placa. Para a garantia da evaporação completa do solvente, as placas foram acondicionadas em estufa (marca Quimis) por 5 min a 60 °C para eliminação da acetona remanescente. Após a secagem, as placas foram raspadas com o auxílio de uma espátula de aço inox e as amostras de complexos de inclusão de β CD-eugenol e de β CD-alho revestidos com PMMA foram recolhidos em *ependorfs* e enviadas para caracterização.

4.4.3 Caracterização dos complexos de β CD-eugenol e de β CD-óleo de alho revestidos com PMMA

Os complexos de inclusão de β CD-eugenol e de β CD-óleo de alho revestidos com PMMA foram submetidos aos ensaios de FTIR (conforme item 4.2.3), TGA (conforme item 4.2.4), MEV (conforme item 4.2.5) e Difusão em Ágar (conforme item 4.1.2).

Os ensaios de DSC e TGA foram realizados com o objetivo de verificar se o revestimento dos complexos de inclusão de β CD-eugenol e de β CD-óleo de alho com PMMA aumentou a estabilidade térmica das mesmas. Os espectros de FTIR foram realizados para avaliar as interações intermoleculares entre os materiais, bem como a presença de eugenol e óleo de alho nas microcápsulas revestidas. O MEV teve como objetivo verificar as características de superfície, bem como a forma das microcápsulas. O ensaio de difusão em ágar foi realizado para avaliar se o revestimento de PMMA fixou completamente os substratos ou os complexos de inclusão e evitou a difusão para o meio externo.

4.4.4 Tratamentos térmicos dos complexos de inclusão revestidos com PMMA

Após a obtenção dos complexos de inclusão revestidos, 0,1 g de massa de cada complexo foi colocada em estufa (marca Quimis) por 5 e

10 min em temperatura de 170°C. Após o tratamento térmico, 0,01 g de cada complexo revestido foi solubilizada em acetona e submetida às análises por espectroscopia UV-Visível em comprimento de onda de 280 nm para o eugenol e em 217 nm para o óleo de alho.

Com os valores de absorbâncias e com o auxílio da curva de calibração para cada substrato foi determinada a concentração de cada composto puro presente nos complexos revestidos com PMMA após o tratamento térmico.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nesta seção são apresentados e discutidos os principais resultados obtidos durante a realização deste trabalho. São apresentados resultados e discussões dos compostos empregados para a obtenção dos complexos de inclusão, do tratamento térmico e avaliação da estabilidade térmica dos complexos de inclusão e da obtenção e caracterização do revestimento dos complexos de inclusão com polimetilmetacrilato.

5.1 CARACTERIZAÇÃO DO EUGENOL, DO ÓLEO DE ALHO E DA β -CICLODEXTRINA

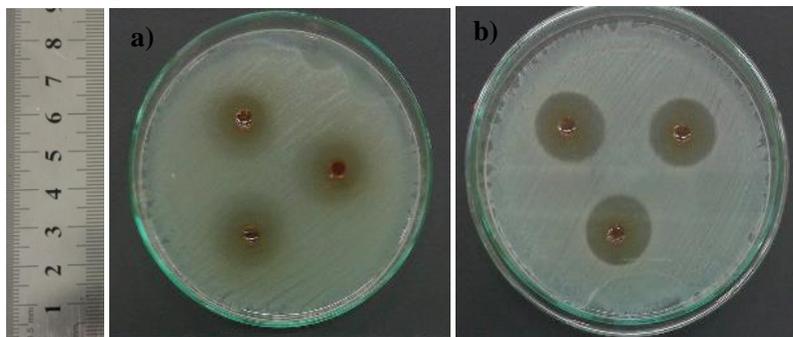
5.1.1 Caracterização microbiológica

As técnicas de caracterização microbiológica de Difusão em Ágar e de Concentração Inibitória Mínima (CIM) foram empregadas para a avaliação da propriedade antibacteriana dos compostos eugenol, óleo de alho e β -ciclodextrina com diferentes tipos de bactérias *Staphylococcus aureus* (Gram-positiva) e *Escherichia coli* (Gram-negativa). A seguir, são apresentados os resultados obtidos.

5.1.2 Testes de Difusão em Ágar para eugenol, óleo de alho e β CD

A Figura 14 apresenta os resultados do teste de difusão em ágar para o eugenol. Os resultados comprovam que o eugenol apresenta a propriedade antibacteriana, com maior atividade para a bactéria *Staphylococcus aureus* do que para a *Escherichia coli*. A presença do halo de inibição no meio de cultura está diretamente associada com a atividade antibacteriana do composto e a coloração escura no halo é característica da presença do eugenol que difundiu no meio de cultura.

Figura 14 – Resultados microbiológicos de difusão em ágar para o eugenol com bactérias do tipo (a) *Escherichia coli* e (b) *Staphylococcus aureus*.



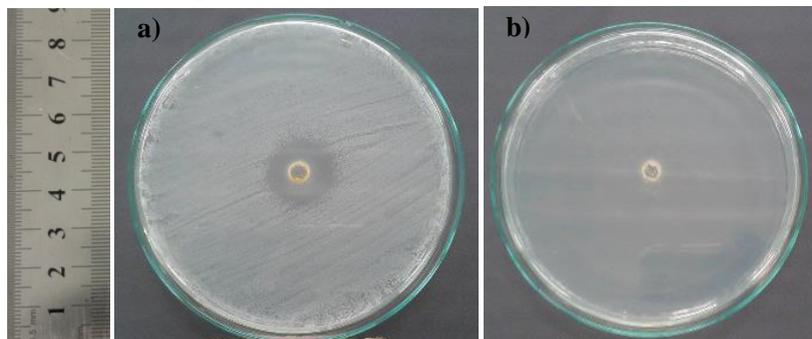
A área de halo antibacteriano formado com a bactéria *Escherichia coli* é de $(3,20 \pm 0,06) \text{ cm}^2$ e para a bactéria *Staphylococcus aureus* de $(3,90 \pm 0,60) \text{ cm}^2$. O menor efeito antibacteriano observado para a bactéria *Escherichia coli* deve-se ao fato da mesma ser Gram-negativa e, por isso, mais resistente aos materiais antimicrobianos (CHORIANOPOULOS et al., 2004; TORTORA et al., 2005).

O eugenol apresenta elevada atividade inibitória para as bactérias que representam as famílias Gram-positivas e Gram-negativas e, por isso, é um composto que tem elevado potencial de uso para a proteção microbiana de alimentos, tanto com a aplicação direta nos alimentos quanto como aditivos aplicados nas embalagens.

Esses resultados corroboram as observações microbiológicas encontradas em trabalhos científicos realizados por outros autores. Silvestri et al. (2010) estudaram a atividade antimicrobiana do eugenol diante de 18 micro-organismos distintos e obtiveram ótimos resultados. Os autores relatam que o eugenol apresenta melhores resultados para as bactérias Gram-positivas. Trajano et al. (2009) entre outros autores relataram que a atividade antimicrobiana do eugenol é atribuída aos grupos fenólicos constituintes da sua estrutura e é eficaz contra uma grande variedade de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, como a *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium* e também diante de diversos tipos de fungos.

A Figura 15 mostra os resultados microbiológicos obtidos com o teste de difusão em ágar para o óleo de alho puro. Com as bactérias do tipo *Escherichia coli*, a área de inibição determinada foi de $(2,50 \pm 0,70) \text{ cm}^2$. Por outro lado, com as bactérias do tipo *Staphylococcus aureus* o óleo de alho inibiu completamente o crescimento bacteriano.

Figura 15 – Resultados microbiológicos de difusão em ágar para o óleo de alho com bactérias do tipo (a) *Escherichia coli* e (b) *Staphylococcus aureus*.



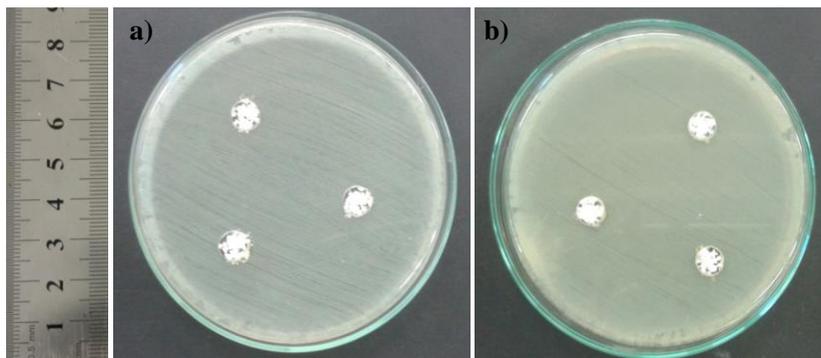
Os resultados comprovaram a excelente atividade antimicrobiana do óleo de alho, especialmente para a bactéria do tipo *Staphylococcus aureus*. Muitos trabalhos que empregaram o óleo de alho relatam que, devido a sua atividade antibacteriana, apresenta grande potencial de aplicação em diversas áreas, porém é pouco estudado como aditivo para embalagens para alimentos, devido ao seu forte odor, instabilidade térmica e baixo ponto de fulgor (Quintavalla e Vicini, 2002; Sung et al., 2014).

Os resultados microbiológicos são satisfatórios e importantes. Tanto o eugenol quanto o óleo de alho apresentam excelente atividade antibacteriana. Ambos compostos são mais efetivos contra as bactérias Gram-positivas devido à presença de interações diretas com a membrana da célula dos micro-organismos (SMITH-PALMER et al., 1998; CHAO e YOUNG, 2000; CIMANGA et al., 2002). A atividade antimicrobiana dos óleos essenciais está relacionada com a sua hidrofobicidade, característica que favorece a interação com os lipídeos das membranas celulares e com as mitocôndrias das células microbianas. Essas interações geralmente alteram a permeabilidade das células bacterianas, causando distúrbios nas estruturas e resultando em fraturas grosseiras que provocam o vazamento de íons, moléculas e conteúdo celular, conduzindo os micro-organismos à morte ou à inibição do seu crescimento (BURT, 2004).

Com base nestas constatações científicas, as células bacterianas Gram-negativas são mais resistentes por possuírem uma parede celular hidrofílica (KIM et al., 2011). A parede hidrofílica dificulta a penetração na célula dos compostos hidrofóbicos, a exemplo dos óleos essenciais (CALSAMIGLIA et al., 2007; RAVICHANDRAN et al., 2011).

A Figura 16 apresenta os resultados microbiológicos obtidos pelo teste de difusão em ágar para a β -ciclodextrina. Conforme esperado, os resultados não indicam a formação de halos de inibição. As moléculas de ciclodextrinas não possuem grupos funcionais antibacterianos na sua estrutura química, logo não é esperada a atividade antimicrobiana.

Figura 16 – Resultados microbiológicos de difusão em ágar para a β -ciclodextrina com bactérias do tipo (a) *Escherichia coli* e (b) *Staphylococcus aureus*.



Da mesma forma, Hanci et al. (2014) realizaram avaliações *in vitro* das propriedades antimicrobianas do composto sugamadex (γ -ciclodextrina modificada) e constataram que a molécula não apresenta ação antibacteriana para os micro-organismos do tipo *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis* e *Pseudomonas aeruginosa*, o que corrobora com os resultados obtidos neste trabalho para a β -ciclodextrina.

Liang et al. (2012) e Ayala-Zavala (2008) avaliaram o efeito das ciclodextrinas na atividade antimicrobiana de óleos essenciais. Constataram que o uso de ciclodextrinas em conjunto com os óleos essenciais aumenta a solubilidade dos óleos em meio aquoso e melhora a atividade antimicrobiana devido ao aumento da disponibilidade dos óleos essenciais.

5.1.3 Ensaios microbiológicos de concentração inibitória mínima (CIM) para o eugenol e para o óleo de alho

Previamente ao processo de encapsulação do eugenol e do óleo de alho em β -ciclodextrina, foram realizados ensaios de concentração inibitória mínima (CIM) para estes compostos com as bactérias *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. A β -ciclodextrina não foi submetida aos ensaios de CIM por não apresentar atividade antimicrobiana, constatada pelos testes de difusão em ágar e por demais trabalhos científicos, como o realizado por Hanci et al. (2014).

A partir dos resultados de CIM foi possível determinar as menores concentrações com que cada composto manifesta a atividade antimicrobiana. Essa informação é de extrema importância para as atividades seguintes de encapsulação do eugenol e do óleo de alho. As concentrações de eugenol e de óleo de alho testadas variaram entre $10000 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ e $78,125 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, para ambos os óleos.

A Figura 17 mostra os resultados de CIM obtidos para o eugenol. Para as bactérias do tipo *Escherichia coli*, as diluições de eugenol nas colunas 1, 2 e 3 apresentaram coloração vermelha a partir da linha E, e ausência de coloração nas linhas A, B, C e D. Esse resultado indica que a concentração inibitória mínima de eugenol é menos que $1250 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ e maior que $625 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (de acordo com a Tabela 2) frente à bactéria *Escherichia coli*. Esses resultados são promissores, pois indicam que o eugenol é efetivo na inibição bacteriana e com baixas concentrações inibe o crescimento dessa bactéria. Desta forma, pode-se observar que, mesmo em baixas concentrações, o eugenol poderá ser aplicado para a proteção dos alimentos, seja pelo contato direto com os alimentos ou em embalagens.

A Figura 18 apresenta os resultados obtidos com os ensaios de CIM frente à bactéria do tipo *Staphylococcus aureus*. A concentração inibitória mínima para o eugenol foi observada na linha C. Essa linha corresponde às soluções contendo a concentração de $2500 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de eugenol. Observa-se que o valor da CIM é menor que $2500 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ e maior que $1250 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de eugenol para esta bactéria.

Segundo Pereira e Maia (2007), o eugenol é reconhecido pela *Food and Drug Administration* (FDA) como um composto seguro em relação a sua toxicidade quando aplicado diretamente em alimentos em concentrações de até $1500 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Assim, os valores determinados com a CIM são interessantes e demonstram que com concentrações similares o eugenol tem atividade antibacteriana.

Figura 17 - Resultados de CIM para o eugenol diluído com a bactéria do tipo *Escherichia coli*. Controle Positivo (coluna 8), Controle Negativo (coluna 10) e Branco (coluna 12). Colunas 1, 2 e 3 contêm eugenol diluído no meio de cultura BHI.

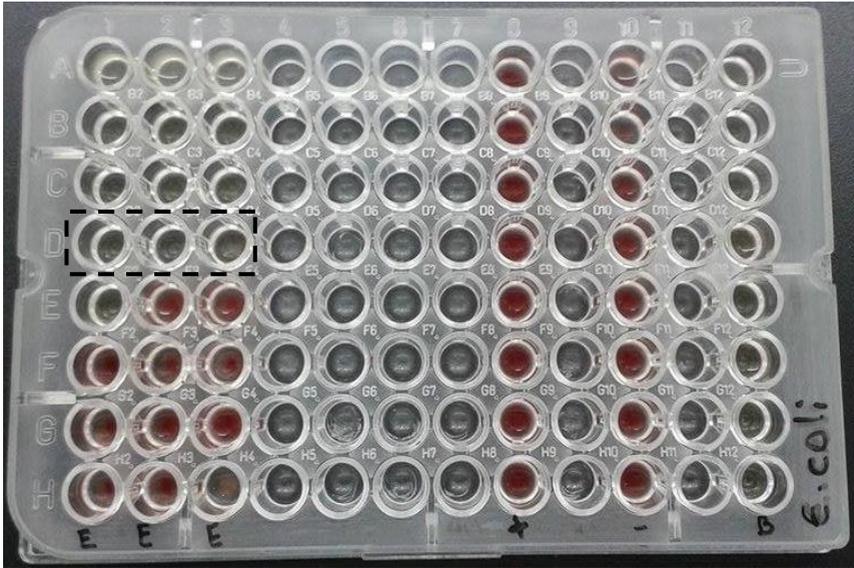
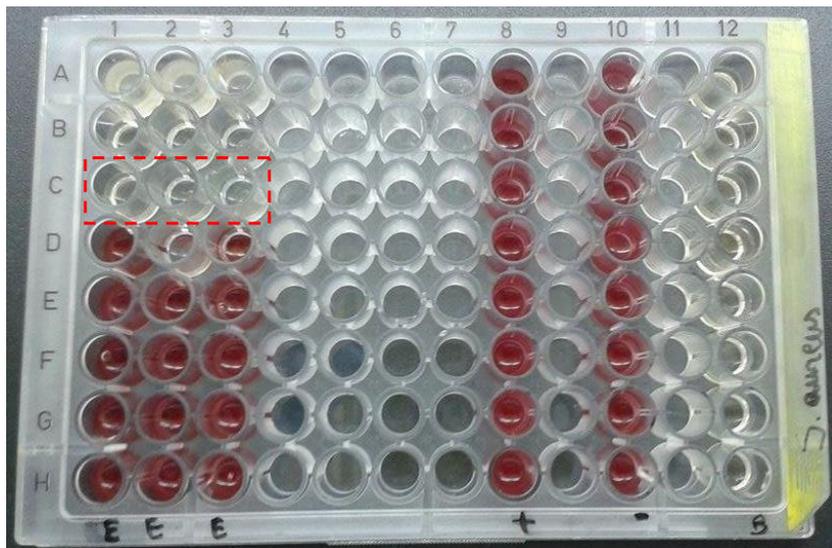


Figura 18 - Resultados de CIM para o eugenol diluído com a bactéria do tipo *Staphylococcus aureus*. Controle Positivo (coluna 8), Controle Negativo (coluna 10) e Branco (coluna 12). Colunas 1, 2 e 3 contêm eugenol diluído no meio de cultura BHI.



As Figuras 19 e 20 mostram os resultados obtidos com os ensaios de concentração inibitória mínima para o óleo de alho, com as bactérias do tipo *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, respectivamente. As amostras controle foram feitas em placas separadas, devido à alta volatilidade do óleo de alho em baixas temperaturas.

Os resultados de CIM indicam que somente na maior concentração de óleo de alho, correspondente a $10000 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, as bactérias são completamente eliminadas, tanto as do tipo *Escherichia coli* quanto as do tipo *Staphylococcus aureus*.

Figura 19 - Resultados de CIM para o óleo de alho diluído com a bactéria do tipo *Escherichia coli*. Colunas 1, 2 e 3 contêm óleo de alho diluído no meio de cultura BHI.

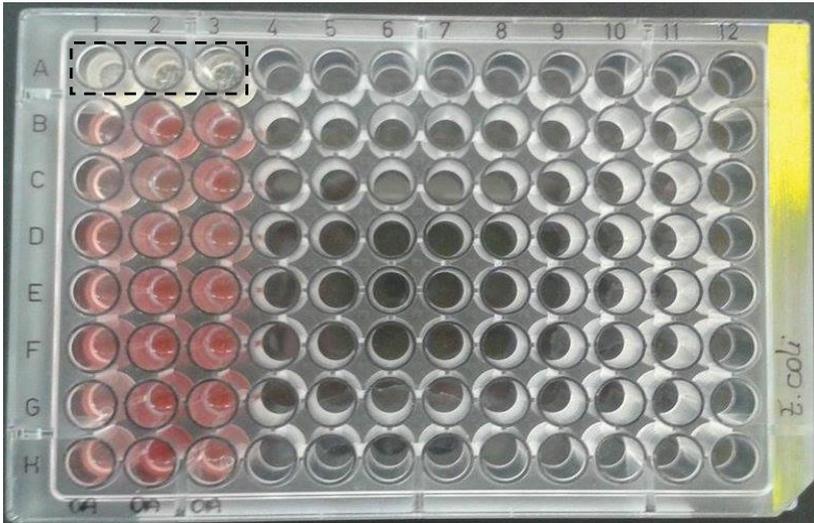
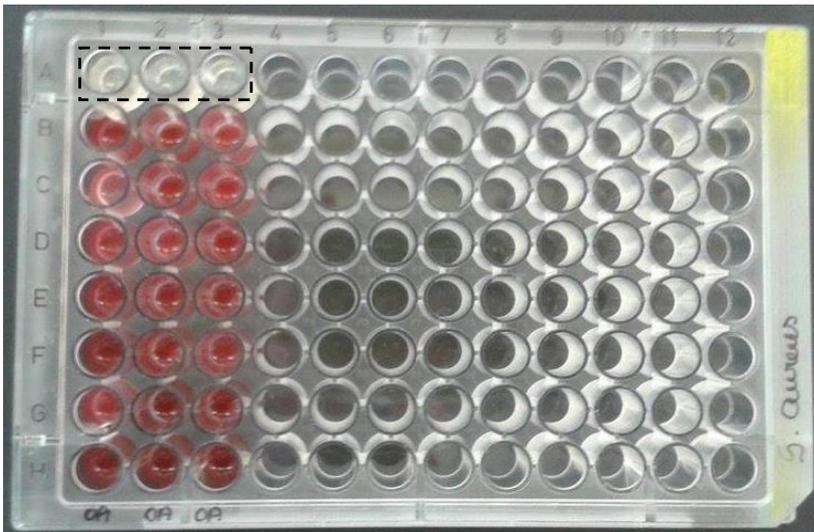


Figura 20 - Resultados de CIM para o óleo de alho diluído com as bactérias do tipo *Staphylococcus aureus*. Colunas 1, 2 e 3 contêm óleo de alho diluído no meio de cultura BHI.



Ankri e Mirelman (1999) estudaram as propriedades antimicrobianas da alicina do alho e observaram importantes características, principalmente o fato de apresentar atividade antibacteriana contra uma grande variedade de bactérias, tanto Gram-positivas quanto Gram-negativas. Na maioria dos casos, as concentrações de alicina para uma dose letal de 50% das colônias bacterianas foram superiores às necessárias para alguns novos antibióticos. Outro aspecto muito interessante, observado por Gupta e Viswanathan (1995), referente à atividade antibacteriana de alicina, é a sua aparente incapacidade de se tornar resistente à maioria das bactérias, pois seu modo de ação é totalmente diferente de outras substâncias antibióticas. Tem sido proposto que o desenvolvimento de resistência a antibióticos beta-lactâmicos é 1000 vezes mais propenso do que o desenvolvimento de resistência à alicina.

Bakkali et al. (2008) afirmam que a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais é atribuída principalmente aos seus compostos majoritários. Entretanto, existem evidências de que componentes minoritários têm importante papel na atividade antimicrobiana do óleo, promovendo ação sinérgica entre os demais (BURT, 2004). Estudos demonstram que os óleos essenciais contendo carvacrol, timol e eugenol possuem maior atividade antimicrobiana que outros óleos essenciais que não possuem esses compostos (OUATTARA et al., 1997). Os resultados obtidos têm coerência com os que foram observados em outros trabalhos científicos e constata-se que o eugenol tem maior efeito antibacteriano que o óleo de alho.

Nesta etapa, foi possível constatar que o eugenol e o óleo de alho apresentam atividade antimicrobiana e são eficientes diante de bactérias do tipo Gram-positivas e Gram-negativas. Da mesma forma, constata-se que a β -ciclodextrina não apresenta a propriedade antimicrobiana.

O eugenol e o óleo de alho serão empregados nas etapas seguintes deste trabalho como substratos, enquanto a β -ciclodextrina como a matriz de encapsulamento. Assim, os complexos de inclusão a serem obtidos deverão apresentar a propriedade antibacteriana devido à atividade microbiológica dos substratos.

5.2 OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS COMPLEXOS DE INCLUSÃO β CD-EUGENOL E β CD-ÓLEO DE ALHO

5.2.1 Análises por espectroscopia de UV-Visível para o eugenol e para o óleo de alho

A Figura 21 mostra os espectros de UV-Visível obtidos para três soluções de eugenol em água destilada nas concentrações de $0,25 \text{ mmol.L}^{-1}$, $1,50 \text{ mmol.L}^{-1}$ e $3,50 \text{ mmol.L}^{-1}$, e a Figura 22 mostra os espectros para as concentrações de $1,95 \times 10^{-3} \text{ mmol.L}^{-1}$, $9,76 \times 10^{-3} \text{ mmol.L}^{-1}$ e $4,88 \times 10^{-3} \text{ mmol.L}^{-1}$ de óleo de alho em metanol. Todos os experimentos apresentam nos espectros de UV-visível bandas de absorção características dos compostos, em 280 nm para o eugenol e em 217 nm para o óleo de alho.

É importante ressaltar que as moléculas de ciclodextrinas não absorvem a radiação ultravioleta e a radiação visível, logo não é possível obter espectros UV-Visível para a β -ciclodextrina (SZEJTLI, 1998).

Figura 21 - Espectros de absorção UV-Visível obtidos para soluções de eugenol com diferentes concentrações em água destilada.

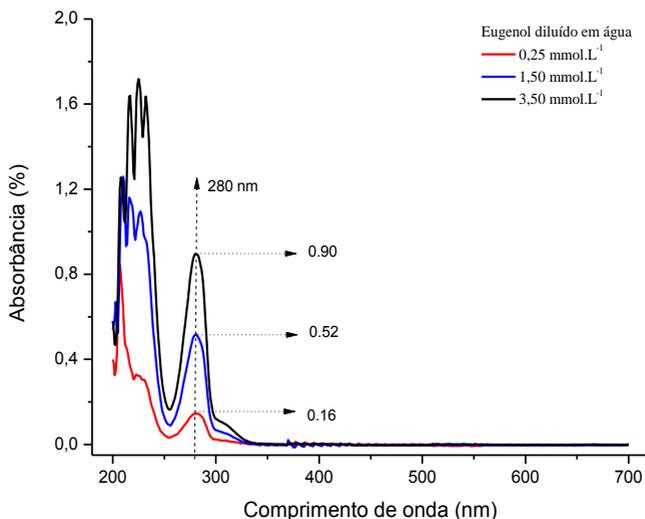
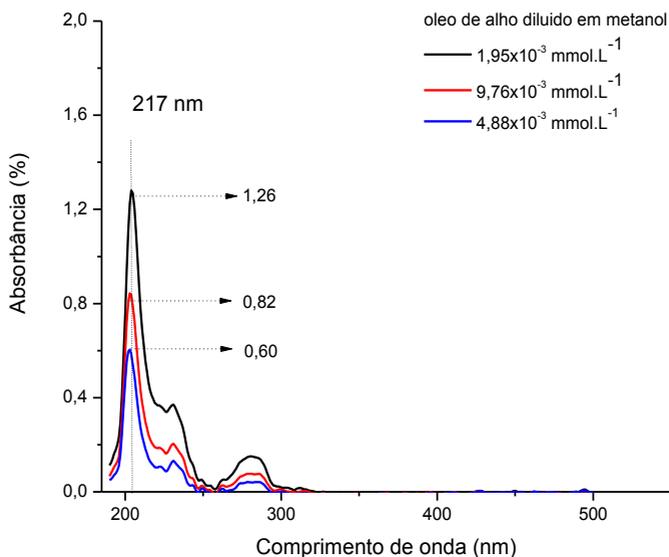
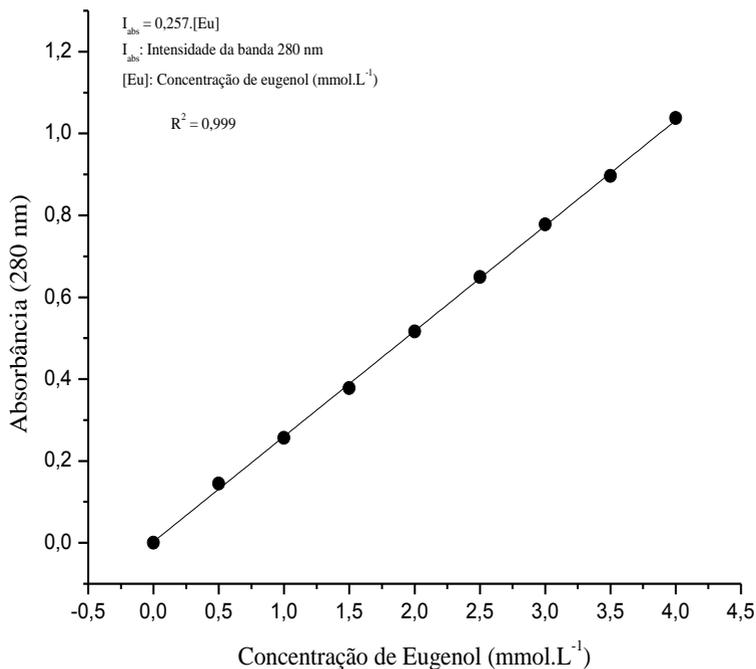


Figura 22 – Espectros de absorção UV-Visível obtidos para soluções de óleo de alho com diferentes concentrações em água destilada.



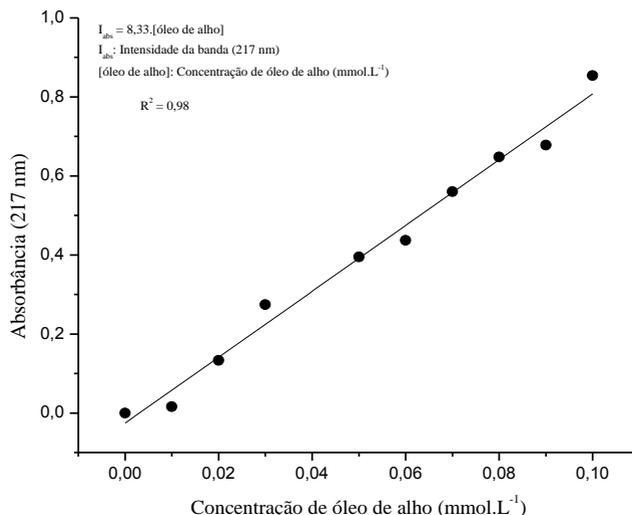
Com o aumento das concentrações de eugenol ou de óleo de alho, a intensidade das bandas de absorção características aumenta, de modo que é possível obter uma correlação linear entre as concentrações de eugenol ou de óleo de alho nas soluções em relação à intensidade das bandas de absorção. Essas correlações lineares são apresentadas nas Figuras 23 e 24 e são denominadas como curvas de calibração.

Figura 23 - Curva de calibração para eugenol disperso em água destilada obtida para a banda de absorção em 280 nm.



As curvas de calibração mostram a relação linear entre os valores de intensidade da banda absorção UV-Visível em 280 nm e em 217 nm. São determinações para a quantificação da concentração de eugenol, ou de óleo de alho, nas soluções que serão empregadas para a obtenção dos complexos de inclusão, bem como para a determinação da quantidade de substrato no complexo de inclusão.

Figura 24 - Curva de calibração para óleo de alho diluído em metanol obtida para a banda de absorção em 217 nm.



5.2.2 Determinação da constante de estabilidade (K_c) do eugenol e do óleo de alho

Uma das técnicas usadas para caracterizar a formação dos complexos de inclusão com β -ciclodextrina é a determinação da solubilidade das fases ou da constante de estabilidade (K_c). Conforme Budal (2003) a formação de complexos de inclusão em ciclodextrina promove o aumento da solubilidade e da velocidade de dissolução de princípios ativos lipofílicos, o que aumenta a sua biodisponibilidade, ou seja, geralmente a solubilidade dos substratos aumenta com o aumento da quantidade de ciclodextrina, até que ocorra a saturação no meio reacional. Segundo o autor, o aumento da solubilidade está relacionado com a solubilidade intrínseca do hóspede e com a habilidade de inclusão da molécula hospedeira em água. Esses fatores e efeitos refletirão na magnitude da constante de estabilidade do complexo.

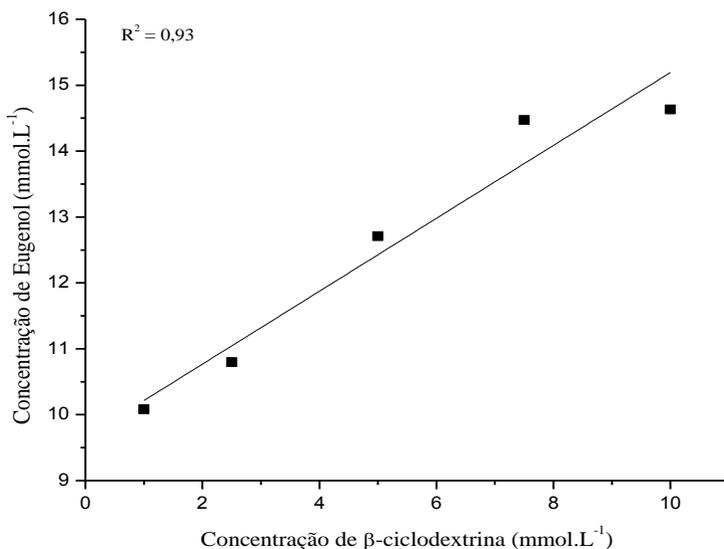
A solubilidade é a propriedade do substrato que é alterada pelo processo de complexação com a matriz de ciclodextrina. Por isso, o método de determinação e avaliação da constante de estabilidade do

complexo é o primeiro a ser utilizado para comprovar a formação do complexo de inclusão (TEIXEIRA, 2012).

A constante de estabilidade (K_c) também é um parâmetro de grande interesse para a caracterização da interação molecular entre os diversos componentes do complexo e da sua viabilidade prática, visto que complexos com elevada constante de estabilidade podem originar complexos muito estáveis (VEIGA, PICORELLI e RIBERIRO, 2006; AGUIAR, 2014).

A Figura 25 mostra a curva de solubilidade do eugenol em função do aumento da concentração de β -ciclodextrina no meio reacional. Observa-se que, mantendo-se constante a concentração de eugenol e aumentando a concentração de β -ciclodextrina no meio reacional, há uma relação linear entre a concentração de eugenol e a concentração de β -ciclodextrina. Esta relação linear comprova que, no intervalo de concentrações estudada, o sistema não está saturado por eugenol e por β -ciclodextrina. Essa condição de aumento da solubilidade é favorecida com encapsulamento do eugenol pelas moléculas de β -ciclodextrina.

Figura 25 - Curva de solubilidade para o eugenol em meio reacional aquoso contendo diferentes concentrações de β -ciclodextrina.



Os parâmetros da correlação linear estão associados com a cinética e com a eficiência de encapsulamento. A partir do parâmetro angular da correlação é determinado o valor da constante de estabilidade (K_c), que está diretamente associado com a eficiência de encapsulamento (HIGUCHI e CONNORS, 1965). Empregando a equação 11 e o respectivo valor do parâmetro angular da curva de solubilidade, o valor determinado para a constante de estabilidade do eugenol foi de $128,16 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}$.

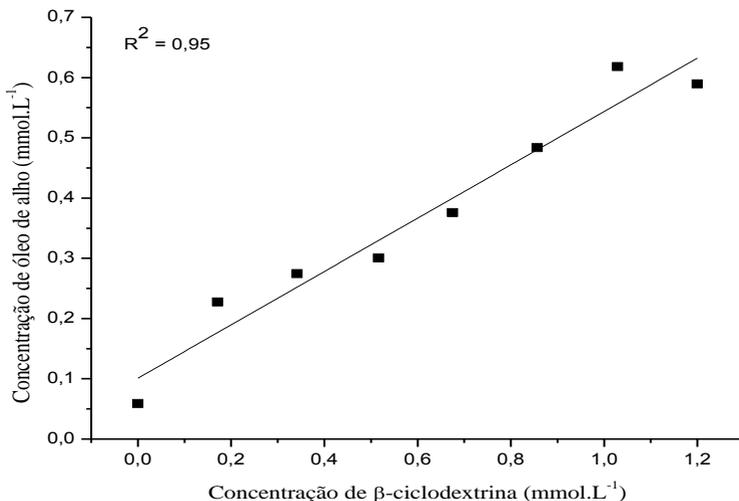
Valores semelhantes para a constante de estabilidade do eugenol foram encontrados por outros autores. Zhan et al. (2008) avaliaram a formação de complexos de inclusão de eugenol e derivados de ciclodextrina e encontraram valores para K_c de $357,46 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}$ a 25°C , $289,59 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}$ a 35°C e $234,78 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}$ a 45°C .

Valores de K_c para sistemas com temperaturas constantes também foram determinados e os estudos mostraram que são dependentes do tipo do substrato empregado (KARATHANOS et al., 2007; TOMMASINI et al., 2004; AYALA-ZAVALA et al., 2008).

Hill, Gomes e Matthew Taylor (2013) determinaram os valores de K_c para o *trans*-cinamaldeído, eugenol, extrato do broto do cravo e extrato da casca de canela. Para o sistema contendo eugenol, os valores de K_c determinados foram de $174,58 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}$ a 25°C e $143,67 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}$ a 45°C , similares aos determinados neste trabalho.

A Figura 26 mostra a curva de solubilidade do óleo de alho.

Figura 26 - Curva de solubilidade para o óleo de alho em meio reacional aquoso contendo diferentes concentrações de β -ciclodextrina.



De forma similar ao sistema contendo eugenol, a concentração de óleo de alho aumenta linearmente com o aumento da concentração de β -ciclodextrina no meio reacional, também favorecendo o encapsulamento do óleo de alho. O valor da constante de estabilidade (Kc) determinada para o óleo de alho é de $253,78 \text{ L.mol}^{-1}$.

Wang et al. (2011) determinaram a constante de estabilidade para o complexo de inclusão de óleo de alho em β -ciclodextrina e obtiveram o valor de 1141 L.mol^{-1} indicando que as interações entre o óleo de alho e a β CD são muito fortes.

Os estudos de solubilidade dos complexos de inclusão são úteis para a comprovação do encapsulamento dos substratos, bem como para avaliar se há o aumento da solubilidade dos substratos na presença do agente encapsulante, sendo o eugenol e o óleo de alho os substratos e a β -ciclodextrina o agente encapsulante.

Os resultados mostraram para ambos os sistemas de encapsulação que a concentração de eugenol e a concentração do óleo de alho têm uma correlação linear com a concentração da β -ciclodextrina no meio reacional. Essas relações favorecem a solubilização dos substratos de eugenol e de óleo de alho e o encapsulamento pela β -ciclodextrina. Os valores obtidos para o Kc indicam que as interações são fortes entre as moléculas de eugenol e as

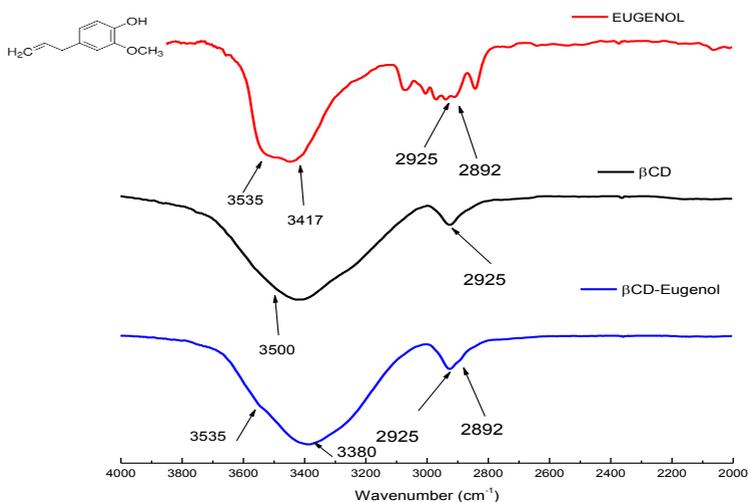
moléculas de óleo de alho com as moléculas de β -ciclodextrina e que o processo de encapsulação ocorre de forma eficiente.

5.2.3 Caracterização por Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier – FTIR dos complexos de inclusão

A formação dos complexos de inclusão pode ser avaliada também com auxílio da técnica de espectroscopia de infravermelho (FTIR). Além disso, a técnica FTIR pode ser empregada para confirmar a presença dos grupos químicos funcionais específicos dos substratos de eugenol ou de óleo de alho, bem como os grupos funcionais específicos da molécula do agente encapsulante (β -ciclodextrina). A partir da análise dos espectros de FTIR obtidos dos complexos de inclusão é possível identificar a presença dos substratos e do agente encapsulante, bem como as possíveis modificações químicas ou físicas ocorridas devido ao processo de encapsulamento.

Os espectros de FTIR obtidos para o eugenol, β -ciclodextrina e para o complexo β CD-eugenol são apresentados na Figura 27 para o intervalo de valores de número de onda de 4000 cm^{-1} a 2000 cm^{-1} .

Figura 27-Espectros de FTIR obtidos para eugenol, β -ciclodextrina e complexo β CD- eugenol. Detalhes na região de 4000 a 2000 cm^{-1} .



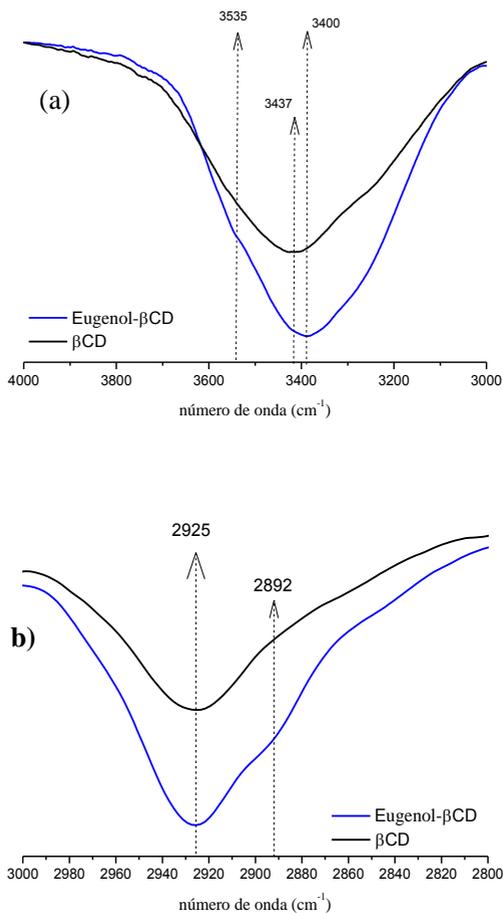
O espectro de FTIR obtido para o eugenol mostra as bandas para os modos vibracionais de alongamento dos grupos OH e dos anéis aromáticos típicos no intervalo de 3100 cm^{-1} a 3600 cm^{-1} . Merece destaque a banda em 3535 cm^{-1} , associada com os modos de vibração do anel aromático, e a banda em 3417 cm^{-1} , associada com os modos de vibração dos grupos OH das moléculas de eugenol. De acordo com Santos (2010), essas bandas são sinais característicos das moléculas de eugenol. O conjunto de bandas próximo de 3000 cm^{-1} corresponde aos modos vibracionais de estiramento das ligações do tipo C-H, presentes nos grupos CH_2 e CH_3 das moléculas de eugenol.

As moléculas da β -ciclodextrina apresentam espectros relativamente simples de FTIR. A estrutura da molécula é constituída apenas por átomos de carbono, hidrogênio e oxigênio, que geram a banda em 3500 cm^{-1} , relativa aos modos vibracionais dos grupos OH, e a banda em 2925 cm^{-1} , relativa aos modos vibracionais dos grupos CH_2 .

Para o complexo de inclusão são observadas características importantes nos espectros de FTIR que corroboram o encapsulamento do substrato pela β -ciclodextrina. Uma das modificações significativas pode ser observada na banda associada com os modos vibracionais dos grupos O-H. A banda associada com os modos de vibração do OH das moléculas de eugenol é apresentada em 3417 cm^{-1} , enquanto que no espectro de FTIR, obtido para o complexo β CD-eugenol, os mesmos modos de vibração são apresentados em 3380 cm^{-1} . A diferença é significativa e igual a 37 cm^{-1} e está relacionada com as alterações da estrutura de hidratação das moléculas de ciclodextrina, Figura 28(a).

É possível considerar que a interação física entre as moléculas de eugenol e as moléculas de β -ciclodextrina modifica as ligações entre as moléculas da β -ciclodextrina e as moléculas de água passivantes ou com os grupos químicos funcionais O-H. Por se apresentarem em números de onda menores, as interações referentes aos complexos com a água têm valores maiores de energia e são um forte indicativo de que a estrutura original da molécula de β -ciclodextrina sofreu modificações com a presença do substrato de eugenol, possivelmente devido ao encapsulamento. Essas modificações são fortes indicadores da eficiência do processo de encapsulamento das moléculas de eugenol pela estrutura da β -ciclodextrina (WANG et al., 2011).

Figura 28 - (a) detalhe do FTIR no intervalo de 3000 cm^{-1} a 4000 cm^{-1} e (b) detalhe no intervalo de 2800 cm^{-1} a 3000 cm^{-1} .



A banda em 2892 cm^{-1} foi originada pelas moléculas de eugenol, enquanto que a banda em 2925 cm^{-1} foi originada pelo eugenol e pelas moléculas de β -ciclodextrina, conforme Figura 28(b). A presença simultânea destes picos, sem modificações significativas, comprova a presença da ciclodextrina e do eugenol na estrutura do complexo de β CD-eugenol. Ainda assim, a magnitude do sinal total é maior do que o

sinal associado a cada tipo de molécula, sugerindo a presença do eugenol e do complexo β CD-eugenol.

A banda em 3535 cm^{-1} está associada com o anel aromático presente nas moléculas de eugenol e a banda em 2927 cm^{-1} com os modos de vibração dos grupos OH presentes no eugenol e nas moléculas de β -ciclodextrina. Um aumento significativo na magnitude do sinal de FTIR também é observado e está associado com a contribuição simultânea de ambos os compostos constituintes do complexo eugenol- β CD.

O espectro de FTIR para as moléculas de β CD mostra uma banda de absorção larga no intervalo de 3100 cm^{-1} a 3600 cm^{-1} , de modo semelhante para as moléculas de eugenol. As moléculas de ciclodextrina possuem elevada quantidade de moléculas de água e de grupos OH na sua estrutura, que são responsáveis por uma larga banda em 3400 cm^{-1} no espectro de FTIR. Zhan et al. (2008), relataram a presença da água em moléculas de ciclodextrina, mesmo após a liofilização.

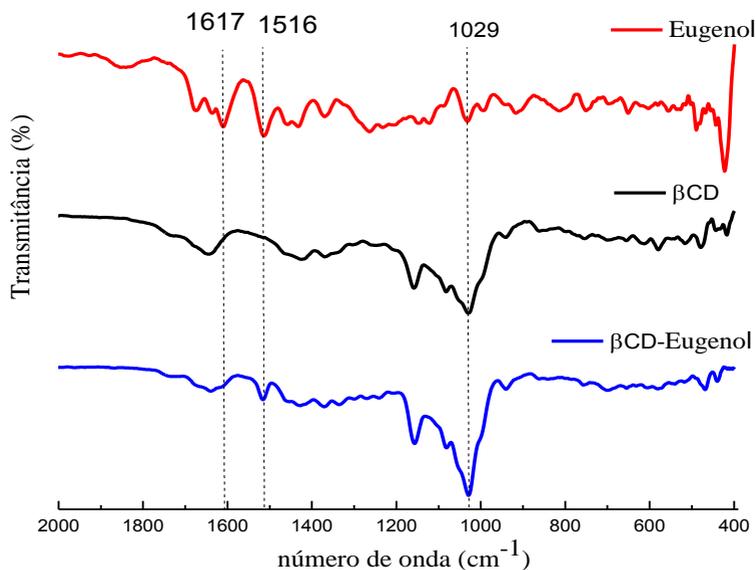
O espectro de FTIR obtido para o complexo de β CD-eugenol é típico de um composto constituído por interações físicas entre o eugenol e as moléculas de β -ciclodextrina. O sinal de FTIR é uma combinação simples entre o espectro obtido para as moléculas de eugenol e o espectro obtido para as moléculas de β CD. Esta informação é importante, pois reforça a possibilidade de interações físicas, e não químicas, entre o substrato e o agente encapsulante. Em um complexo de inclusão são esperadas ligações físicas entre os substratos e os agentes encapsulantes.

Nos espectros de FTIR apresentados no intervalo de 2000 cm^{-1} a 400 cm^{-1} e obtidos para o complexo β CD-eugenol são observadas bandas associadas aos modos vibracionais de grupos funcionais específico das moléculas de eugenol e da molécula de β -ciclodextrina, Figura 29. O espectro mostra, também, bandas de absorção características do eugenol e das moléculas de β -ciclodextrina. As bandas em 1617 cm^{-1} , 1516 cm^{-1} e 1029 cm^{-1} do complexo β CD-eugenol estão associadas aos modos de vibração do eugenol, Figura 31(a).

As bandas em 1516 cm^{-1} , 1269 cm^{-1} e 1240 cm^{-1} estão associadas com o estiramento do grupo $\text{C} = \text{C}$ aromático e com o alongamento dos grupos fenólicos presentes nas moléculas de eugenol. Wang et al. (2011) relataram que não ocorre uma forte interação química entre os grupos funcionais químicos do eugenol e os grupos funcionais químicos de C-C, C-O-C e OH das moléculas de β -ciclodextrina. Essas conclusões sugerem que o complexo β CD-eugenol é formado por interações físicas entre as moléculas de eugenol e as

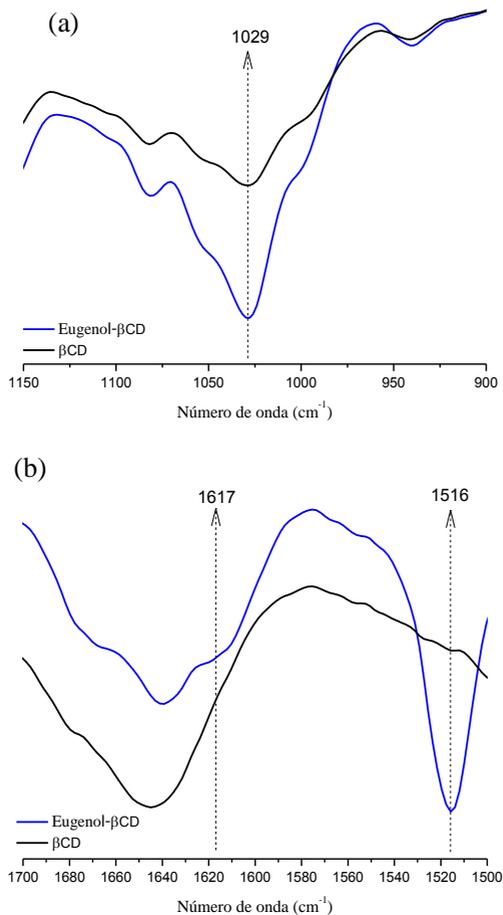
moléculas de β -ciclodextrina e estão de acordo com os resultados de FTIR obtidos neste trabalho.

Figura 29 - Espectro de FTIR para o eugenol, β -ciclodextrina e para o complexo β CD- eugenol. Detalhes na região de 2000 a 400 cm^{-1} .



As bandas em 1516 cm^{-1} e 1617 cm^{-1} no espectro de FTIR do complexo β CD-eugenol estão associadas com as moléculas de eugenol. A banda em 1644 cm^{-1} no espectro de FTIR da β -ciclodextrina está relacionada como os modos de vibração de moléculas de água passando as moléculas de ciclodextrina (ZORNIO et al., 2013), Figura 30(b).

Figura 30 - (a) detalhe do espectro FTIR para o eugenol e para o complexo de inclusão β CD-eugenol no intervalo de 900 cm^{-1} a 1150 cm^{-1} e (b) detalhe no intervalo de 1500 cm^{-1} a 1700 cm^{-1} .

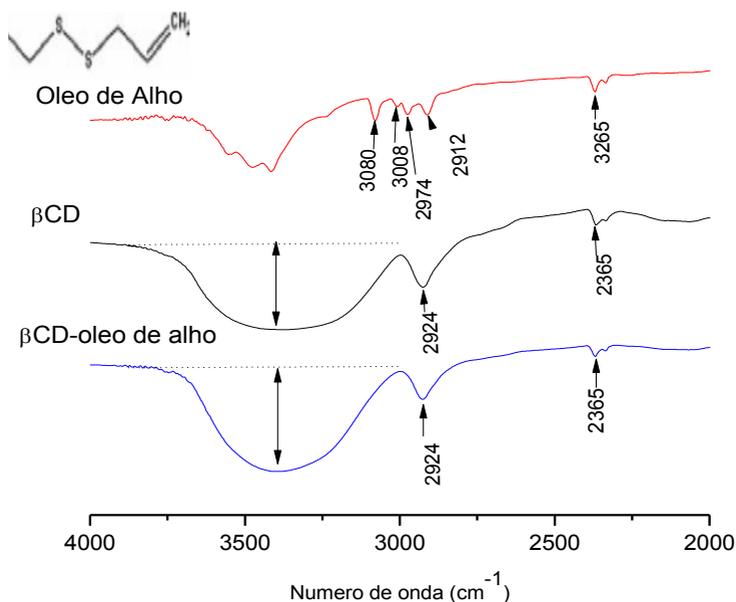


O espectro FTIR mostra uma mudança para menores valores de número de onda para este modo de vibração, de 1644 cm^{-1} para 1638 cm^{-1} . A mudança está associada com as alterações na estrutura da ciclodextrina pela inclusão de moléculas de eugenol devido ao encapsulamento e demonstra que, com o encapsulamento das moléculas

de eugenol, as ligações entre as moléculas de ciclodextrina e as moléculas de água têm maior energia de ligação.

A Figura 31 mostra os espectros de FTIR obtidos para o óleo de alho, para a β -ciclodextrina e para o complexo β CD-óleo de alho, para valores de número de onda entre 2000 cm^{-1} e 4000 cm^{-1} .

Figura 31 - Espectro de FTIR para o óleo de alho, para a β -ciclodextrina e para o complexo β CD-óleo de alho. Detalhes para a região de 4000 cm^{-1} a 2000 cm^{-1} .

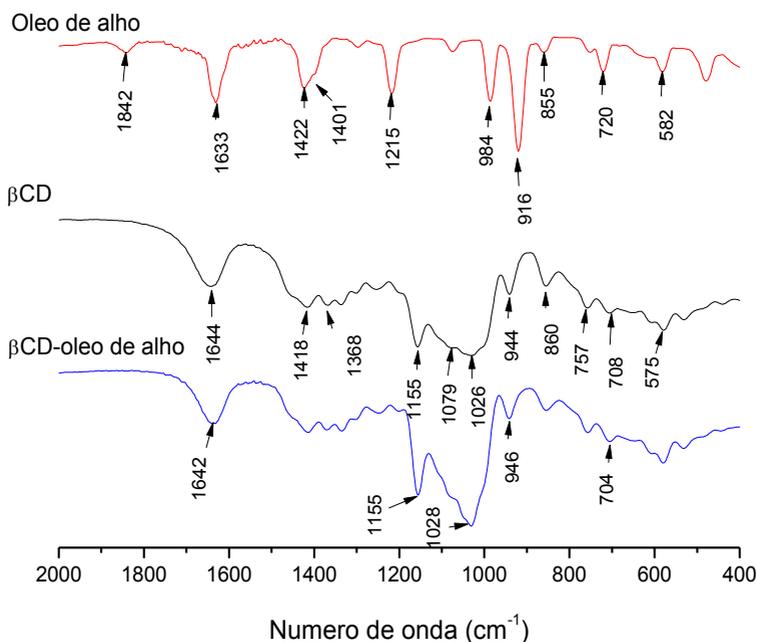


O espectro do óleo de alho apresenta quatro bandas de transmitância características na região de 3100 e 2900 cm^{-1} . A banda em 3080 cm^{-1} corresponde ao modo vibracional de estiramento assimétrico das ligações do tipo $=\text{CH}_2$. A banda em 3011 cm^{-1} corresponde ao estiramento C-H e a banda em 2974 cm^{-1} ao modo vibracional do estiramento simétrico $=\text{CH}_2$. A banda em 2912 cm^{-1} corresponde ao modo vibracional do alongamento das ligações $-\text{CH}_2$ (AYALA-ZAVALA et al., 2008).

No intervalo de 400 a 2000 cm^{-1} , o espectro de FTIR para o óleo de alho apresenta diversas bandas de transmitância, conforme Figura 32. A banda em 1633 cm^{-1} é atribuída ao alongamento C=C do

grupo alilo. As duas bandas em $1422-1401\text{ cm}^{-1}$ são atribuídas ao estiramento do grupo $-\text{CH}_2 - \text{CH}_2 = \text{CH}-$, enquanto que o modo vibracional de alongamento é deslocado para 1215 cm^{-1} . A banda intensa em 916 cm^{-1} é atribuída aos modos vibracionais dos alongamentos das ligações C-S-C (AYALA-ZAVALA et al., 2008; WANG et al., 2011).

Figura 32 - Espectro de FTIR obtidos para o óleo de alho, β -ciclodextrina e para o complexo β CD - óleo de alho. Detalhes na região 2000 cm^{-1} a 400 cm^{-1} .

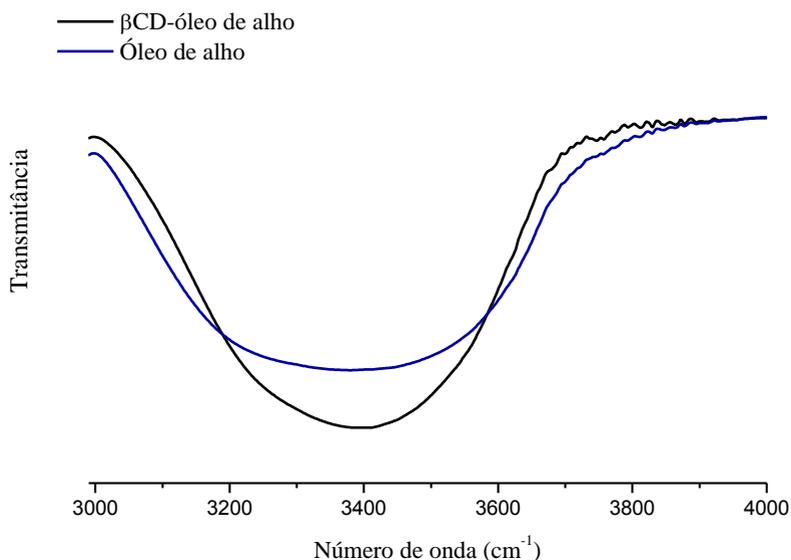


O espectro de FTIR obtido para o complexo de inclusão β CD-óleo de alho mostra poucas mudanças significativas. As bandas características da β -ciclodextrina são mais intensas e sobrepõem os sinais relativos às moléculas do óleo de alho. É possível observar mudanças e um deslocamento na região de 400 a 2000 cm^{-1} .

No entanto, na região de 2000 a 4000 cm^{-1} é possível observar alterações na banda em 3385 cm^{-1} para o complexo β CD-óleo de alho em relação a β -ciclodextrina, Figura 33. A banda sofre um achatamento

no intervalo dos valores de número de onda e um aumento na sua magnitude. Estas alterações estão relacionadas com a formação de pontes de hidrogênio nas ligações intermoleculares entre os grupos funcionais contendo O-H das moléculas do óleo de alho e os grupos funcionais contendo O-H nas moléculas de β -ciclodextrina (AYALA-ZAVALA et al., 2008; WANG et al., 2011).

Figura 33 - Detalhes dos espectros de FTIR na região $4000-3000\text{ cm}^{-1}$ para a β -ciclodextrina e para o complexo β CD - óleo de alho.



Da Rosa et al. (2013) observaram em seus estudos um comportamento semelhante ao encapsular o óleo de alho em β -ciclodextrina. Os espectros de FTIR das misturas físicas não foram diferentes dos obtidos para os componentes individuais, porém apresentaram deslocamentos das bandas e variações de suas intensidades para menores valores.

A partir das análises dos espectros de FTIR é possível identificar nos compostos obtidos pelo processo de encapsulamento a presença das moléculas de eugenol e de óleo de alho na estrutura das moléculas de β -ciclodextrina. Os espectros são característicos de misturas físicas entre os substratos e o agente encapsulante (β -ciclodextrina). Os resultados obtidos por FTIR são fortes indicativos da

encapsulação do eugenol e do óleo de alho na β -ciclodextrina e corroboram as observações obtidas a partir das curvas de solubilização.

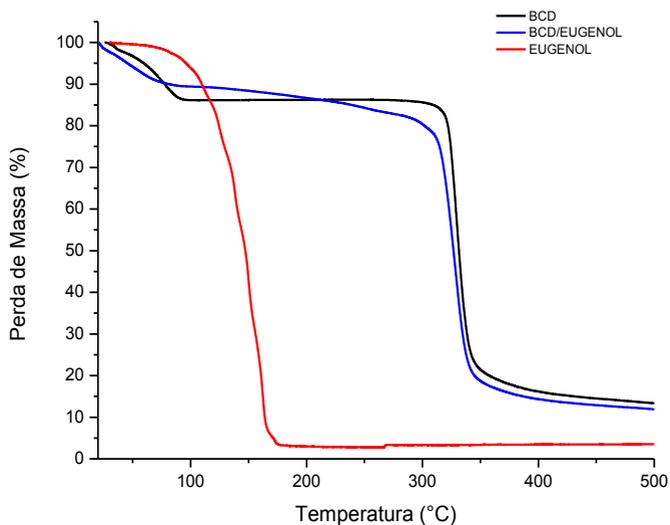
5.2.4 Caracterização por análise termogravimetria (TGA) dos complexos de inclusão

A termogravimetria é uma técnica fundamentada na medida da massa de um composto enquanto ocorre a variação da sua temperatura por um período de tempo. Os termogramas, bem como as curvas originadas pela sua derivada (dm/dT), fornecem informações importantes a respeito da estabilidade térmica e de transições térmicas do material em análise (SKOOG et al., 1991).

Neste sentido, as análises de TGA foram empregadas para avaliar a estabilidade térmica dos complexos de inclusão, bem como para avaliar possíveis mudanças significativas nas suas estruturas devido aos processos de encapsulação.

Os termogramas de TGA obtidos para o eugenol, para a β -ciclodextrina e para o complexo β CD-eugenol são mostrados na Figura 34.

Figura 34 - Termogramas de TGA para o eugenol, para a β -ciclodextrina e para o complexo β CD-eugenol.



O termograma para o eugenol indica na temperatura de 44,3°C o início da perda de massa, correspondente ao início da volatilização e decomposição térmica do composto. A massa residual do processo de decomposição térmica do eugenol é de 3,7% em relação ao conteúdo inicial. A análise térmica mostra que o eugenol tem baixo ponto de fulgor. Se aplicado como aditivo em condições de processamento dos materiais poliméricos, que em geral empregam temperaturas superiores a 150°C, será oxidado e as suas propriedades antimicrobianas serão prejudicadas. Para temperaturas inferiores a 150°C o eugenol se apresentou como um composto termicamente instável. Resultados semelhantes foram encontrados por Monteiro (2008).

Para a β -ciclodextrina, os termogramas indicam a perda de massa de água de 13,8% em temperaturas inferiores a 100°C. A β -ciclodextrina apresenta caráter hidrofílico e está passivada por moléculas de água. A perda de massa em temperaturas baixas refere-se à liberação da água adsorvida na sua estrutura. Além disso, a β -ciclodextrina apresenta-se estável em temperaturas de 100°C até próximas a 300°C. Os termogramas indicam perda de massa expressiva, de 72%, a partir da temperatura de 295°C, referente a sua decomposição térmica, que finaliza com massa residual de 13,19%. Hădărugă et al. (2008) obtiveram valores de massa residual para a β -ciclodextrina muito próximos, de 14,1%. Segundo Wang et al. (2011) o processo de perda de massa pode ser dividido em dois estágios para as ciclodextrinas. O primeiro estágio ocorre no intervalo de temperatura de 25 a 82°C e corresponde à perda de água adsorvida na estrutura da β -ciclodextrina. O segundo estágio inicia próximo a 300°C e corresponde a sua decomposição térmica. Da Rosa et al. (2013) observaram que o termograma da β -ciclodextrina pura apresenta duas transições, sendo uma em 92,9°C, relativa à perda de massa de 11%, e a outra em 303,8°C, com massa residual de 12,4%.

O complexo β CD-eugenol também apresenta perda de massa em temperaturas inferiores a 100°C devido à perda da água adsorvida, porém a perda é menor e corresponde a 9,8% da massa total. O menor percentual de massa de água eliminada é devido à massa total do complexo ser constituída por frações menores de massa de ciclodextrina, devido à presença do eugenol no complexo. Na região de temperatura de 75°C a 284°C ocorre a perda de massa de aproximadamente 10% e observa-se um comportamento diferente em relação à β -ciclodextrina pura, que apresenta perda de massa apenas a partir de 295°C.

Conforme citado, a β -ciclodextrina apresenta-se estável em temperaturas de 100°C até próximas a 300°C, enquanto o complexo

β CD-eugenol apresenta perda de massa contínua nesse mesmo intervalo de temperatura. Essa perda de massa pode estar associada com a decomposição térmica ou volatilização das moléculas de eugenol que não estão complexadas. Porém, de acordo com o termograma, a decomposição térmica das moléculas de eugenol inicia em 44,3°C e as suas moléculas são completamente degradadas até 150°C. Sendo assim, os resultados são evidências da presença de moléculas de eugenol na estrutura da β -ciclodextrina sob duas formas: i) moléculas de eugenol livres adsorvidas sobre a β -ciclodextrina com menor energia de ligação e que são volatilizadas até a temperatura de 250°C e b) moléculas de eugenol encapsulados na β -ciclodextrina e com maior energia de ligação e volatilização ou decomposição térmica em temperaturas próximas de 295°C.

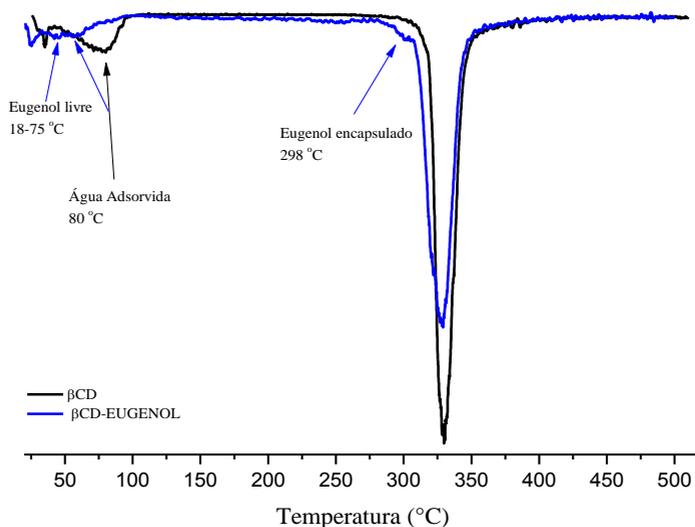
Próximo à temperatura de 300°C é observada a perda de pequena quantidade de massa e, na sequência, a decomposição térmica do complexo com a formação de massa residual de, aproximadamente, 12,0%. A massa residual do complexo é menor que a massa residual da ciclodextrinas pura. Este efeito deve-se ao fato de que, considerando o complexo, além da perda de massa da decomposição da ciclodextrina, ocorre a perda de massa de eugenol encapsulado. A diferença de 1,3% entre as massas residuais pode ser associada com o percentual de eugenol encapsulado.

O diagrama do termograma diferencial para a β -ciclodextrina e para o complexo β CD-eugenol é apresentado na Figura 35, e favorece a identificação das principais características dos termogramas de TGA.

Para as moléculas de β -ciclodextrina observa-se um pico largo próximo de 80°C, referente à volatilização da água adsorvida na molécula, e um pico intenso que inicia em 295°C, associado a sua decomposição térmica. Porém, a curva diferencial obtida para o termograma do complexo β CD-eugenol apresenta maior perda nas regiões de menor temperatura, que pode ser associada com a volatilização das moléculas livres de eugenol e de água adsorvida no complexo de inclusão. Para as temperaturas mais elevadas, a curva diferencial revela um novo e pequeno pico de perda de massa em temperaturas menores que a de decomposição térmica das moléculas de β -ciclodextrina. A presença deste pico pode ser associada com a volatilização ou decomposição térmica das moléculas de eugenol encapsuladas na estrutura da β -ciclodextrina, que estão ligados com as estruturas do complexo e com maior energia de ligação. A decomposição térmica das moléculas de β -ciclodextrina inicia a 295°C e a liberação das moléculas de eugenol encapsuladas inicia em 280°C.

Essa liberação pode ocorrer pela quebra das ligações entre as moléculas de eugenol e a estrutura da ciclodextrina ou pelo rompimento da estrutura do agente encapsulante seguido da liberação do eugenol.

Figura 35 - Diagrama do termograma diferencial de TGA (dm/dT) para a β -ciclodextrina e para o complexo β CD-eugenol.

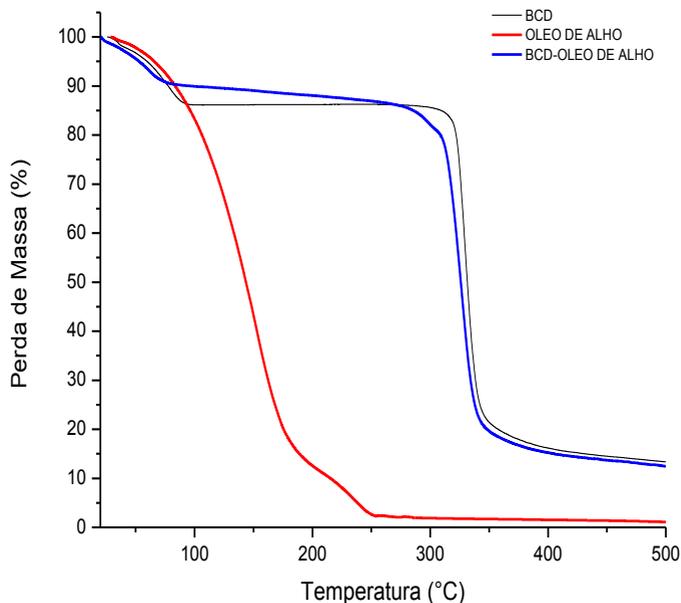


Constata-se, a partir das análises térmicas de TGA, que o complexo β CD-eugenol retém o composto de eugenol e o protege até temperaturas próximas de 280°C. O eugenol puro é completamente instável em temperaturas inferiores a 100. Desta forma, a encapsulação demonstra ser eficiente na proteção térmica do substrato de eugenol encapsulado. De acordo com Wang et al. (2011) a cavidade da ciclodextrina protege e impede que o eugenol volatilize precocemente, uma vez que este volatiliza à temperatura ambiente, sendo que sua encapsulação na cavidade da β -ciclodextrina demonstra o aumento da estabilidade térmica.

A Figura 36 mostra os termogramas de TGA obtidos para o óleo de alho, β -ciclodextrina e para o complexo β CD-óleo de alho. O termograma indica perda de massa em temperaturas próximas de 30°C, correspondente ao início da sua volatilização e da decomposição térmica

do óleo de alho. A massa residual do processo de decomposição térmica do óleo de alho é de 1,3%.

Figura 36 - Análise termogravimétrica para a β -ciclodextrina, para o óleo de alho e para o complexo β CD -óleo de alho.



Para a β -ciclodextrina o termograma indica a perda de 13,8% de massa em temperaturas inferiores a 100 °C, relativa às moléculas de água adsorvidas na estrutura, conforme já observado nos demais experimentos realizados com o eugenol.

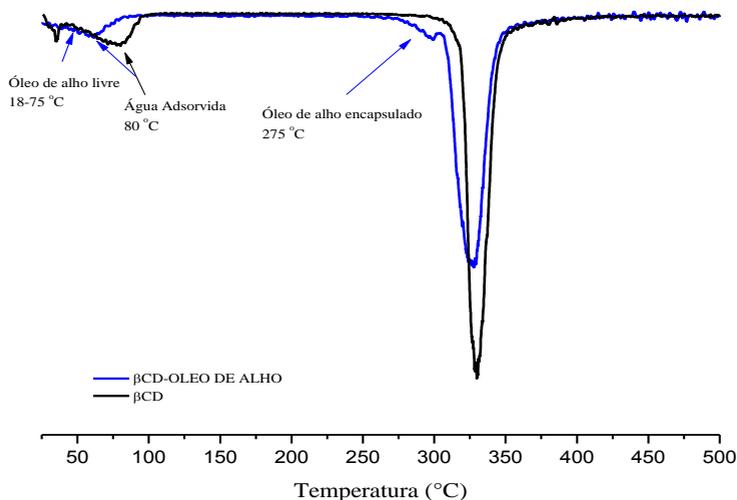
O complexo de inclusão β CD-óleo de alho também apresenta perda de massa em temperaturas inferiores a 100°C, devido à perda de água. Porém, essa perda é menor e próxima a 9,5%. O menor percentual de massa de água eliminado é devido à massa total ser constituída por frações menores de ciclodextrina, devido à presença do óleo de alho no complexo. Na região de temperatura de 65°C a 283°C ocorre perda de massa de, aproximadamente, 7%, o que confirma um comportamento diferente em relação à ciclodextrina pura, a qual exibe perda de massa apenas a partir de 300°C. Logo, esta perda de massa para o complexo de inclusão pode estar associada com a volatilização do óleo de alho livre e adsorvido na β -ciclodextrina, que está ligado à estrutura com menor

energia de ligação e, em temperaturas próximas à decomposição da β -ciclodextrina, das moléculas de óleo de alho encapsulado na β -ciclodextrina e com maior energia de ligação.

Próximo à temperatura de 275°C é observada a perda de pequena quantidade de massa do complexo de inclusão, seguida da decomposição térmica do complexo e a formação de, aproximadamente, 12,6% de massa residual. A massa residual do complexo é menor do que a massa residual da decomposição da ciclodextrina pura. Esse efeito se deve ao fato de que, além da perda de massa com a decomposição da ciclodextrina, também ocorre perda de massa do óleo de alho encapsulado.

O termograma diferencial de TGA, apresentado na Figura 37, revela e confirma as transições relacionadas.

Figura 37 - Diagrama do termograma diferencial de TGA (dm/dT) para a β -ciclodextrina e para o complexo β CD-óleo de alho.



Na temperatura de 275°C o termograma diferencial indica uma transição com perda de massa que pode ser associada ao alho encapsulado na β -ciclodextrina e está presente apenas no termograma do complexo β CD-óleo de alho. Os resultados indicam que a decomposição térmica da ciclodextrina do complexo ocorreu em temperaturas menores

que as da β -ciclodextrina, sendo este um indicador do encapsulamento. Vale ressaltar, ainda, que o óleo de alho apresentou maior instabilidade térmica que o eugenol, sendo este um fator que limita ainda mais a exploração de suas diversas propriedades, sobretudo as antimicrobianas, se aplicado em temperatura elevadas. A proteção térmica proporcionada pela β -ciclodextrina potencializa a diversificação de suas aplicações, principalmente como aditivo para alimentos ou para embalagens antimicrobianas ativas.

Prabu et al. (2015) compararam as temperaturas de decomposição do complexo de inclusão da cafeína em β -ciclodextrina com seus respectivos compostos puros e os resultados indicaram que as propriedades térmicas são alteradas após a formação do complexo de inclusão.

Esses resultados apresentam-se como um forte indicativo da formação do complexo de inclusão de β CD-eugenol e β CD-óleo de alho, pois mudanças nas temperaturas de degradação dos complexos foram observadas em comparação a β -ciclodextrina e os compostos puros. Ainda, verifica-se que houve um aumento da estabilidade térmica dos extratos encapsulados em temperaturas superiores às de processamento das embalagens poliméricas, demonstrando sua viabilização para uso como aditivos poliméricos.

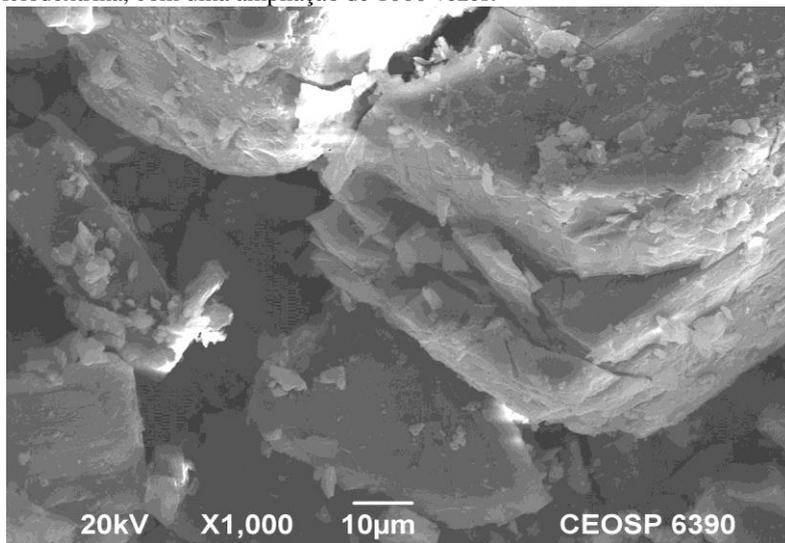
Ao se associar os resultados de TGA com as observações de FTIR, bem como com os valores das constantes de estabilidade, é possível considerar que os substratos de eugenol e de óleo de alho são encapsulados pelas moléculas de β -ciclodextrina e que, com o processo empregado neste trabalho, é possível obter os complexos de inclusão de β CD-eugenol e β CD-óleo de alho.

Os resultados podem ser considerados promissores, pois os complexos de inclusão, como aditivos de materiais poliméricos, devem suportar temperaturas superiores a 150°C. As temperaturas usadas no processamento dos filmes poliméricos utilizados na fabricação de embalagens para alimentos empregam temperaturas menores que 280°C. Os complexos de inclusão de β CD-eugenol e de β CD-óleo de alho proporcionam a proteção dos substratos de eugenol e de óleo de alho e, por isso, se apresentam como promissores aditivos antimicrobianos naturais para a fabricação de embalagens ativas para alimentos.

5.2.5 Caracterização com microscopia eletrônica de varredura da β -ciclodextrina e dos complexos de inclusão de β CD-eugenol e β CD-óleo de alho

A Figura 38 mostra uma imagem obtida por microscopia eletrônica de varredura (MEV) da β -ciclodextrina com ampliação de 1000 vezes. É possível observar a presença de estruturas com geometria regular e foliares típicas de uma estrutura cristalina. As dimensões das estruturas são variadas, da ordem de dezenas de micrômetros, com outras pequenas estruturas adsorvidas na superfície. As dimensões dos cristais são da ordem de 50-100 micrômetros. De acordo com Guo et al. (2011) a β -ciclodextrina apresenta diferentes tamanhos de cristais, com forma retangular, e contém algumas partículas aderidas a sua superfície, de forma similar ao observado neste trabalho.

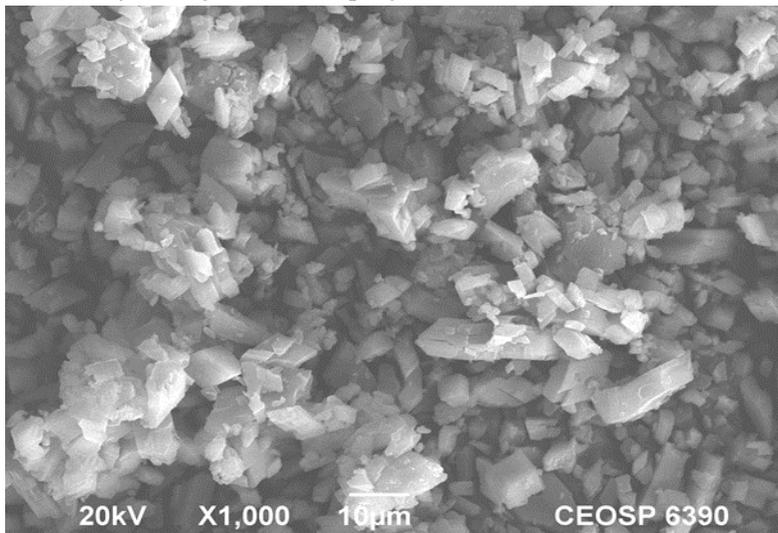
Figura 38 - Imagem obtida com microscopia eletrônica de varredura da β -ciclodextrina, com uma ampliação de 1000 vezes.



A Figura 39 mostra a micrografia obtida do complexo de inclusão de β CD-eugenol. Observa-se que há presença de cristais com tamanhos menores em relação a β -ciclodextrina pura, com dimensões da ordem de 10-20 μ m. Assim, é possível concluir que os complexos de

inclusão são microcápsulas de β -ciclodextrina encapsulando o substrato de eugenol.

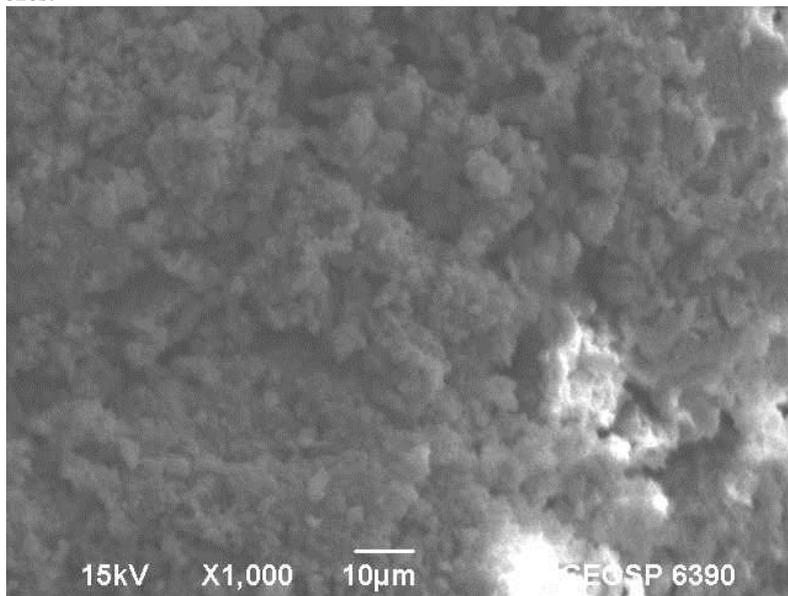
Figura 39 - Imagem obtida com microscopia eletrônica de varredura do complexo de inclusão de β CD-eugenol, com ampliação de 1000 vezes.



A presença de cristais menores indica a formação de complexos de inclusão. O complexo de inclusão apresenta forma áspera e irregular. Resultados semelhantes foram encontrados por Choi et al. (2009). De acordo com Prabu et al. (2015) tamanhos e formas de partículas diferentes indicam a formação de complexos de inclusão.

Para o complexo de inclusão de β CD-óleo de alho, também são observadas superfícies irregulares e diferentes das observadas para a β -ciclodextrina pura, conforme Figura 40.

Figura 40 – Imagem obtida por microscopia eletrônica de varredura do complexo de inclusão de β CD-óleo de alho, obtida com uma ampliação de 1000 vezes.



A imagem revela estruturas menores que as estruturas da β -ciclodextrina pura e dos complexos de inclusão de β CD-eugenol. As dimensões das estruturas formadas pelo complexo de inclusão de β CD-óleo de alho têm valores da ordem de 5-10 μm . Da mesa forma, os complexos de inclusão de β CD-óleo de alho são formados por microcápsulas de β -ciclodextrina encapsulando o substrato de óleo de óleo.

Em função da modificação significativa da morfologia original da β -ciclodextrina é possível concluir que ocorreu a encapsulação do óleo de alho. Wang et al. (2011) ao microencapsular ácido ferúlico na presença de HP- β -CDS, confirmaram a formação das cápsulas, pelo desaparecimento da morfologia original dos compostos individualizados (ácido ferúlico e HP- β -CDS).

Conforme Freitas et al. (2012) a técnica de microscopia eletrônica de varredura permite definir qualitativamente a formação dos complexos de inclusão através da avaliação direta da morfologia e do tamanho das partículas. A análise é feita mediante comparação entre os materiais de partida puros e do complexo de inclusão. Quando esse

último se forma, a imagem deixa de apresentar componentes distintos e passa a apresentar somente um, diferente do original.

As microscopias eletrônicas de varreduras não fornecem informações quantitativas e decisivas para a conclusão a respeito da formação ou não dos complexos de inclusão. Porém, associadas com as demais técnicas de caracterização, contribuem para a conclusão de que ambos os substratos estão sendo encapsulados pelas moléculas de β -ciclodextrina e formam complexos de dimensões micrométricas, ou seja, microcápsulas de β CD-eugenol e microcápsulas de β CD-óleo de alho.

5.3 TRATAMENTO TÉRMICO DAS MICROCÁPSULAS DE β CD-EUGENOL E β CD-ÓLEO DE ALHO

Os procedimentos de tratamento térmico dos complexos de inclusão de β CD-eugenol e de β CD-óleo de alho foram realizados com o principal objetivo de avaliar se o encapsulamento protege termicamente os substratos de eugenol e de óleo de alho quando submetidos a condições de temperaturas superiores a 50°C. Para tanto, os complexos de β CD-eugenol e de β CD-óleo de alho foram submetidos aos tratamentos térmicos após serem obtidos com diferentes concentrações de eugenol e de óleo de alho, com o tempo de exposição de 1 h e com temperaturas superiores ao início da volatilização de cada substrato, 75°C para o eugenol e 60°C para o óleo de alho (definidas a partir das análises térmicas de TGA). Vale ressaltar que os processos de revestimentos com PPMA, por pulverização, propostos por esta tese, deverão aplicar temperaturas superiores a 50°C e, para a viabilidade técnica desta proposta, os complexos de inclusão deverão apresentar, após o tratamento térmico, atividade antimicrobiana, além de estabilidade térmica.

Nesta etapa, os complexos de inclusão foram avaliados quanto a suas atividades antibacterianas antes e após os tratamentos térmicos. Havendo a encapsulação do eugenol e do óleo de alho na matriz de β -ciclodextrina, os complexos devem apresentar atividade antibacteriana com as bactérias empregadas para a caracterização dos substratos puros, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, mesmo após o seu tratamento térmico.

5.3.1 Testes de difusão em ágar dos complexos de β CD-eugenol e de β CD-óleo de alho sem e com tratamento térmico

As Figuras de 41 a 46 apresentam os resultados de difusão em ágar obtidos para os complexos de inclusão de β CD-eugenol, obtidos com diferentes concentrações de eugenol no meio reacional sem e após o tratamento térmico por 1 h em temperatura de 75°C. Os complexos ensaiados correspondem às amostras 6, 7 e 8 detalhadas na Tabela 3.

Os resultados indicam que o tratamento térmico não gerou efeito negativo na atividade antibacteriana dos complexos de inclusão. A difusão em ágar mostra que mesmo após o tratamento térmico os halos de inibição apresentaram praticamente o mesmo diâmetro, comprovando que a propriedade antimicrobiana não foi prejudicada significativamente. Também é possível constatar que o efeito antibacteriano é proporcional à concentração de eugenol usada no encapsulamento, pois os halos aumentam proporcionalmente à concentração empregada para a obtenção dos complexos de inclusão (da amostra 6 para a 8).

Figura 41 - Resultado do ensaio de difusão em ágar para os complexos de inclusão obtidos com 77,32 mmol.L⁻¹ de eugenol (amostra 6) e com a bactéria do tipo *Escherichia coli* - (a) β CD-eugenol sem tratamento térmico e (b) β CD-eugenol com tratamento térmico a 75°C.

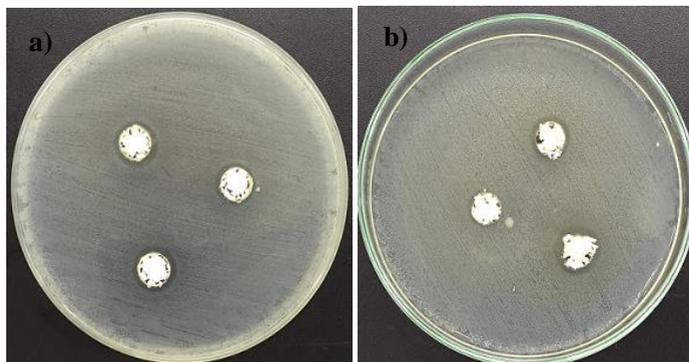


Figura 42 - Resultados do ensaio de difusão em ágar para os complexos de inclusão obtidos com $77,32 \text{ mmol.L}^{-1}$ de eugenol (amostra 6) e com a bactéria do tipo *Staphylococcus aureus* - (a) β CD-eugenol sem tratamento térmico e (b) β CD-eugenol com tratamento térmico a 70°C .

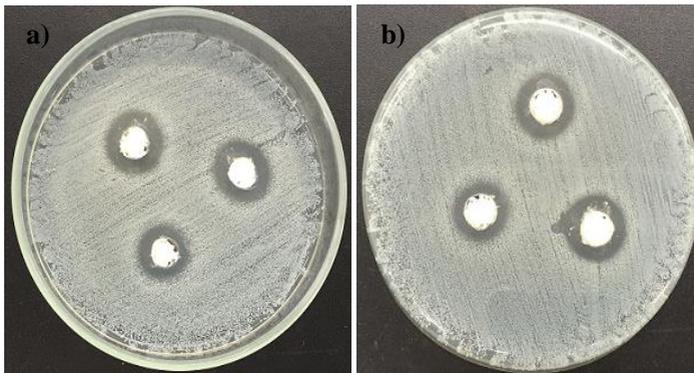


Figura 43 - Resultados do ensaio de difusão em ágar para os complexos de inclusão obtidos com $115,98 \text{ mmol.L}^{-1}$ de eugenol (amostra 7) e com a bactéria do tipo *Escherichia coli* - (a) β CD-eugenol sem tratamento térmico e (b) β CD-eugenol com tratamento térmico a 75°C .

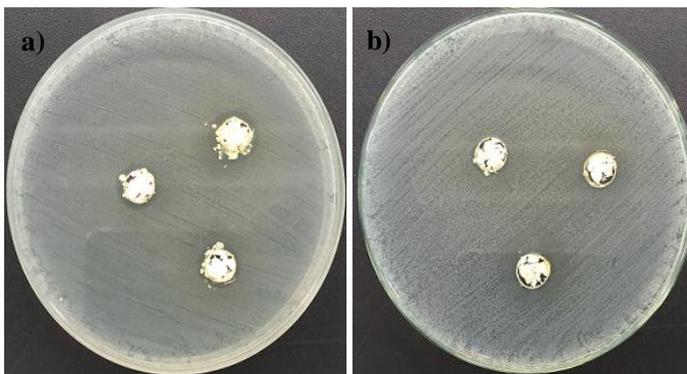


Figura 44 – Resultados do ensaio de difusão em ágar para os complexos de inclusão obtidos com $115,98 \text{ mmol.L}^{-1}$ de eugenol (amostra 7) e com a bactéria do tipo *Staphylococcus aureus*: (a) β CD-eugenol sem tratamento térmico e (b) β CD-eugenol com tratamento térmico a 75°C .

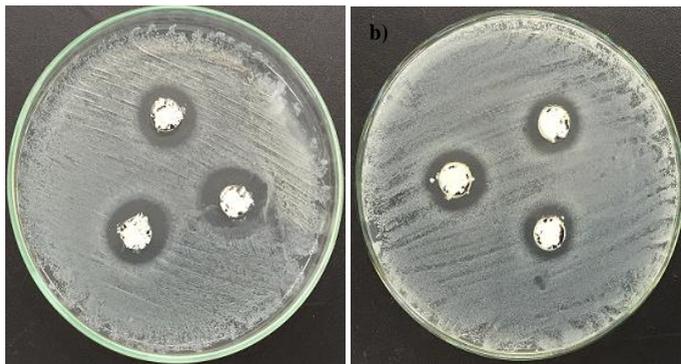


Figura 45 - Resultados do ensaio de difusão em ágar para os complexos de inclusão obtidos com $193,31 \text{ mmol.L}^{-1}$ de eugenol (amostra 8) e com a bactéria do tipo *Escherichia coli* - (a) β CD-eugenol sem tratamento térmico e (b) β CD-eugenol com tratamento térmico a 75°C .

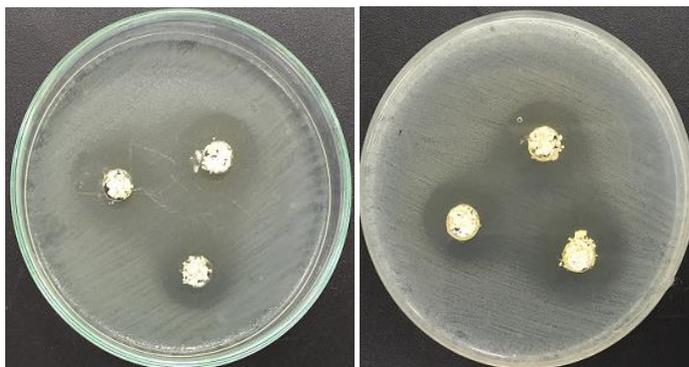
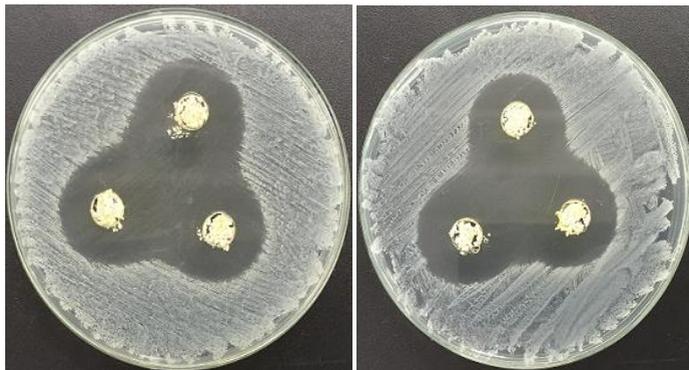


Figura 46 – Resultados do ensaio de difusão em ágar para os complexos de inclusão obtidos com $193,31 \text{ mmol.L}^{-1}$ de eugenol (amostra 8) e com a bactéria do tipo *Staphylococcus aureus*: (a) β CD-eugenol sem tratamento térmico e (b) β CD-eugenol com tratamento térmico a 75°C .



Os resultados microbiológicos podem ser melhor avaliados com a relação entre os diâmetros médios dos halos de inibição e a concentração de eugenol utilizada no processo de encapsulação, Figuras 47 e 48.

É possível confirmar que o tratamento térmico não gera efeitos negativos significativos sobre a ação antibacteriana dos complexos de inclusão. Considerando apenas o substrato eugenol, não ocorrendo a encapsulação, espera-se que o mesmo seja volatilizado durante o seu aquecimento. Porém, os resultados microbiológicos são fortes indicadores da presença de eugenol após o tratamento térmico do complexo. Estas moléculas somente poderão estar presentes se for considerado o seu encapsulamento. Esses resultados são importantes, visto que o encapsulamento pela β -ciclodextrina do eugenol proporcionou o aumento da sua estabilidade térmica e garantiu a sua permanência após o tratamento térmico com temperatura superior à de volatilização (75°C), mantendo, assim, a atividade antibacteriana.

A partir dessas informações é possível confirmar que o processo de pulverização que deverá ser empregado para o revestimento dos complexos de inclusão com PMMA, com temperaturas da ordem de 50°C , em com um tempo médio de 5 minutos, não comprometerá a propriedade antibacteriana do complexo de inclusão de β CD-eugenol. Consta-se que a propriedade antibacteriana do complexo se manteve praticamente inalterada em condições mais críticas, com temperatura de

75°C e 1 h de exposição. Assim, os complexos de inclusão estão aptos a serem empregados nos processos de revestimentos por PMMA.

Figura 47 - Diâmetros médios dos halos de inibição obtidos pelo teste de difusão em ágar para os complexos de inclusão β CD-eugenol obtidos com diferentes concentrações de eugenol no meio reacional. Amostras com e sem tratamento térmico. Testes realizados com a bactéria *Escherichia coli*.

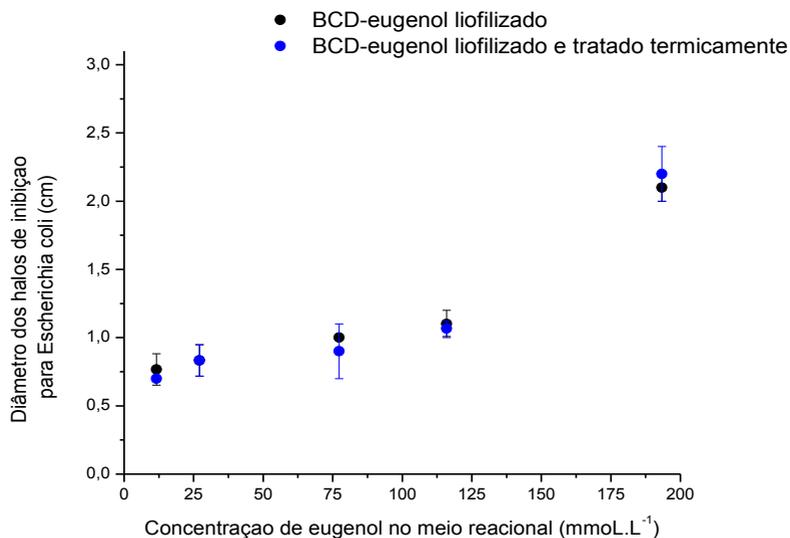
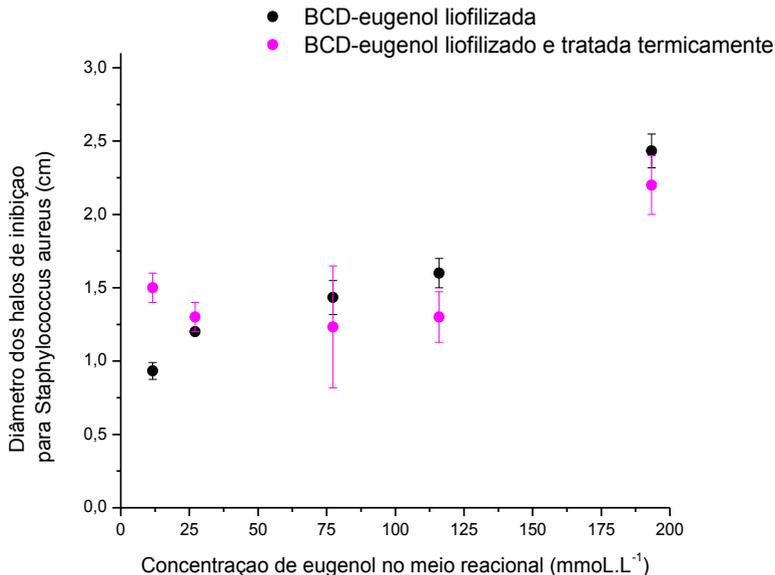


Figura 48 -Diâmetros médios dos halos de inibição obtidos pelo teste de difusão em ágar para os de complexos inclusão de β CD-eugenol obtidos com diferentes concentrações de eugenol no meio reacional. Amostras com e sem tratamento térmico. Testes realizados com a bactéria *Staphylococcus aureus*.



Wang et al. (2011) avaliaram a atividade antibacteriana do complexo β CD-eugenol nas concentrações de 10,0 mg.mL⁻¹; 5,0 mg.mL⁻¹ e de 2,5 mg.mL⁻¹. Os autores também observaram que o β CD não tem atividade antibacteriana. Porém, observaram que o complexo apresentou atividade antibacteriana contra a *Escherichia coli* e não contra *Staphylococcus aureus* e nem contra *Salmonella paratyphi*. Também observaram que para o eugenol, nas concentrações de 1,0; 0,5 e 0,25 mg.mL⁻¹, não apresentaram atividade antibacteriana. Os autores atribuíram duas possíveis causas: i) a água presente no meio de cultura não dissolve o eugenol e dificulta a sua difusão pelo ágar, resultando num baixo efeito na inibição das bactérias e ii) o eugenol volatiliza facilmente quando presente na superfície de água do meio de cultura, o que também dificulta sua difusão no ágar e resulta num baixo efeito na inibição das bactérias. No entanto, quando encapsulado, a solubilidade do eugenol aumenta e o efeito inibitório sobre as bactérias se torna mais pronunciado.

Walsh et al. (2003) observaram que os complexos β CD-eugenol melhoraram a solubilidade em água do composto e a sua eficácia antimicrobiana em menor concentração do que o eugenol puro. Ainda, devido à baixa solubilidade em água do eugenol é necessário que a concentração seja aumentada para garantir a eficiência antimicrobiana, porém isso é um problema devido à rejeição pelo seu forte odor.

Análises similares de difusão em ágar foram realizadas para os complexos de inclusão de β CD-óleo de alho. Os resultados indicam que não houve a formação de halos de inibição para as bactérias do tipo *Escherichia coli*. Os complexos sem e com o tratamento térmico não formaram halos de inibição significativos para este tipo de bactéria, Figuras 49, 51 e 53. Esse resultado mostra que com o encapsulamento a quantidade de óleo de alho presente no complexo de inclusão provavelmente não é suficiente para a formação de halos de inibição para as bactérias *Escherichia coli*. Resultados semelhantes foram observados por Quintavalla e Vicini (2002) que não constataram atividade antibacteriana do óleo de alho na bactéria *Escherichia coli*.

Entretanto, diante das bactérias do tipo *Staphylococcus aureus*, os resultados foram muito promissores, visto que os complexos com e sem o tratamento térmico apresentaram excelente capacidade de inibição destas bactérias, conforme apresentado nas Figuras 50, 52 e 54.

Assim como para o complexo de inclusão de β CD-eugenol, os diâmetros dos halos de inibição foram proporcionais ao aumento da concentração de óleo de alho utilizado na solução do meio reacional de encapsulamento. Um detalhe importante é que o tratamento térmico causou efeitos negativos na atividade antibacteriana, com destaque para os complexos de inclusão correspondentes à amostra 8, com maior concentração de óleo encapsulada, para a qual a difusão em ágar do óleo de alho puro inibiu completamente o crescimento da *Staphylococcus aureus* na placa, mesmo após o tratamento térmico.

As Figuras 49 a 54 apresentam os resultados de difusão em ágar obtidos para os complexos de inclusão de β CD-óleo de alho, considerando diferentes concentrações de óleo de alho no meio reacional sem e após o tratamento térmico por 1 h em temperatura de 60 °C. Os complexos ensaiados correspondem às amostras 6, 7 e 8 detalhadas na Tabela 4.

Figura 49 – Resultados dos ensaios de difusão em ágar para os complexos de inclusão β CD-óleo de alho obtidos contendo $81,73 \text{ mmol.L}^{-1}$ de óleo de alho (amostra 6) e a bactéria do tipo *Escherichia coli* - (a) β CD-óleo de alho sem tratamento térmico e (b) β CD-óleo de alho com tratamento térmico a 60°C .

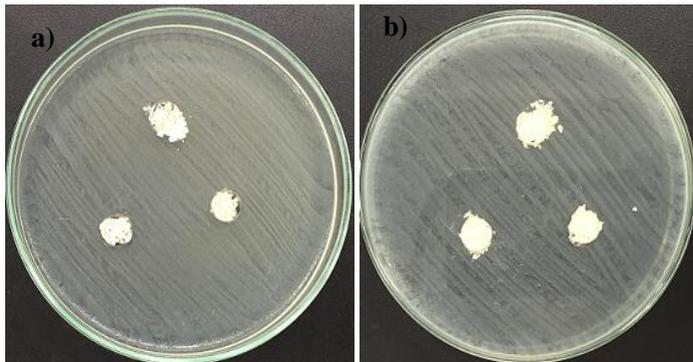


Figura 50 – Resultados dos ensaios de difusão em ágar para os complexos de inclusão β CD-óleo de alho obtidos contendo $81,73 \text{ mmol.L}^{-1}$ de óleo de alho (amostra 6) e a bactéria do tipo *Staphylococcus aureus* - (a) β CD-óleo de alho sem tratamento térmico e (b) β CD-óleo de alho com tratamento a 60°C .

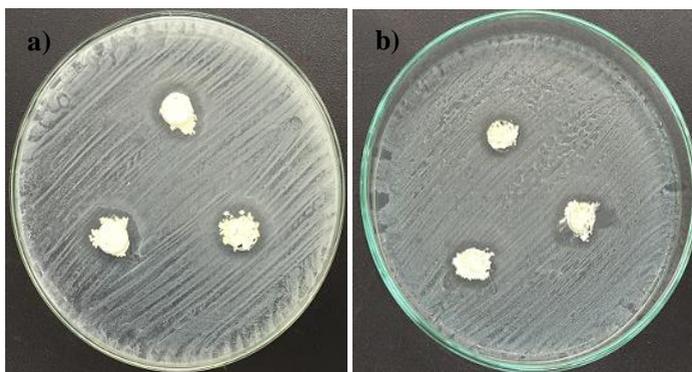


Figura 51 – Resultados dos ensaios de difusão em ágar para os complexos de inclusão β CD-óleo de alho obtidos contendo $122,60 \text{ mmol.L}^{-1}$ de óleo de alho (amostra 7) e a bactéria do tipo *Escherichia coli* - (a) β CD-óleo de alho sem tratamento térmico e (b) β CD-óleo de alho com tratamento térmico a 60°C .

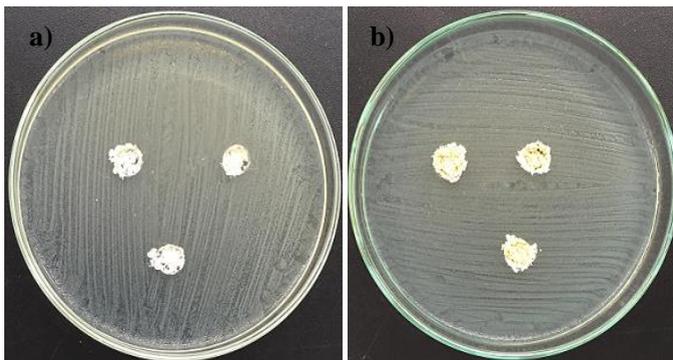


Figura 52 – Resultados dos ensaios de difusão em ágar para os complexos de inclusão β CD-óleo de alho obtidos contendo $122,60 \text{ mmol.L}^{-1}$ de óleo de alho (amostra 7) e com a bactéria do tipo *Staphylococcus aureus* - (a) β CD-óleo de alho sem tratamento térmico e (b) β CD-óleo de alho com tratamento térmico a 60°C .

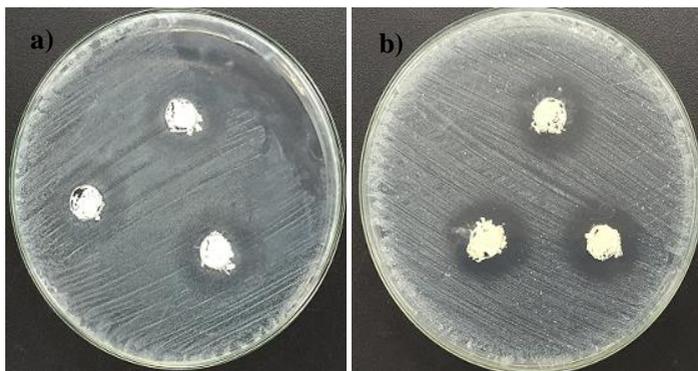


Figura 53 – Resultados dos ensaios de difusão em ágar para os complexos de inclusão β CD-óleo de alho obtidos contendo $245,20 \text{ mmol.L}^{-1}$ de óleo de alho (amostra 8) e a bactéria do tipo *Escherichia coli* - (a) β CD-óleo de alho sem tratamento térmico e (b) β CD-óleo de alho com tratamento térmico a 60°C .

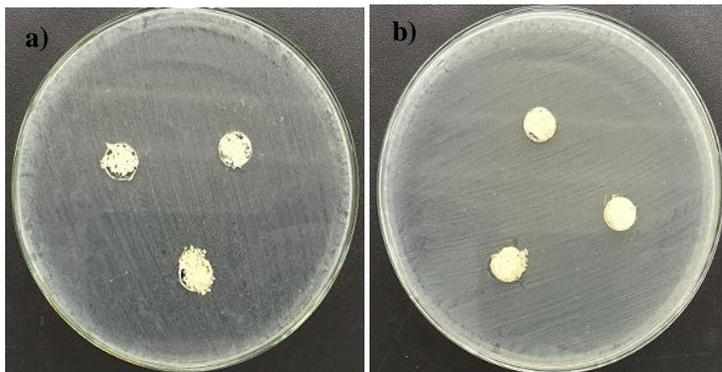
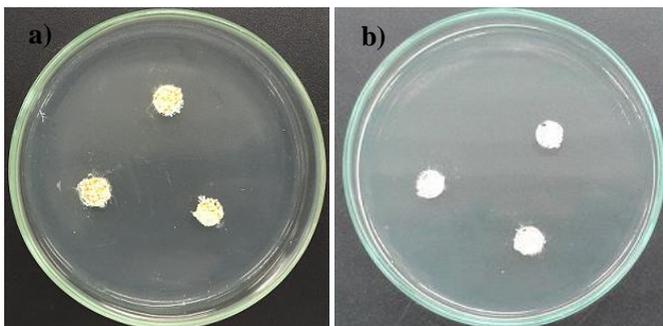


Figura 54 – Resultados dos ensaios de difusão em ágar para os complexos de inclusão β CD-óleo de alho obtidos contendo $245,20 \text{ mmol.L}^{-1}$ de óleo de alho (amostra 8) e a bactéria do tipo *Staphylococcus aureus* - (a) β CD-óleo de alho sem tratamento térmico e (b) β CD-óleo de alho com tratamento a 60°C .



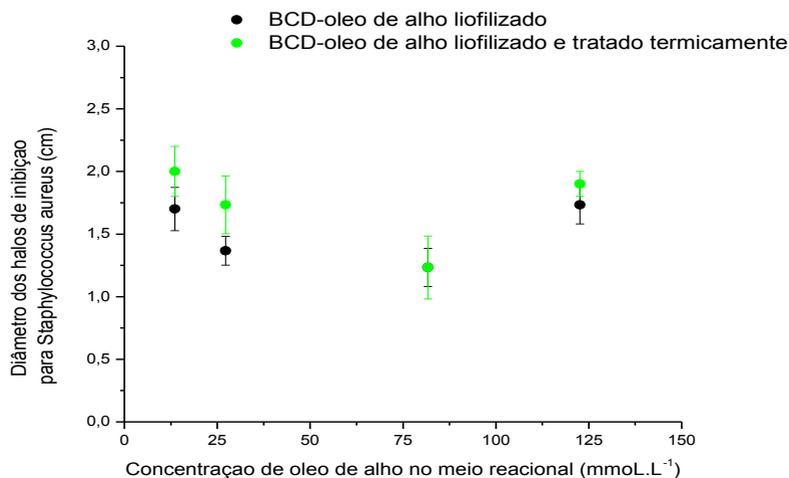
Após o tratamento térmico dos complexos de inclusão com temperaturas superiores à temperatura de volatilização do óleo de alho os mesmos continuam apresentando atividade antibacteriana. A diferença do halo de inibição gerada pelos complexos sem e com o tratamento não é significativa. Como o óleo de alho é volátil em temperatura ambiente é bem provável que todo substrato remanescente no complexo esteja encapsulado, visto que o substrato livre volatiliza

rapidamente em baixas temperaturas. Assim, não são esperadas diferenças significativas na atividade antimicrobiana dos complexos sem e com o tratamento térmico, porém é importante a constatação de que mesmo com temperaturas acima da temperatura de volatilização os complexos ainda mantêm a sua propriedade antibacteriana.

Ross et al. (2001) evidenciaram que a atividade antimicrobiana do óleo essencial de alho, utilizando métodos de difusão em placa, foi insignificante devido à natureza hidrofóbica e volátil desse óleo. Em contrapartida, resultados mostram que exibe considerável atividade antimicrobiana, quando testado em culturas líquidas, especialmente quando as precauções para minimizar as perdas por volatilização são aplicadas, como no caso do encapsulamento.

A Figura 55 relaciona os valores de diâmetros médios dos halos de inibição gerados pelos complexos de inclusão β CD-óleo de alho com a concentração de óleo de alho empregado na solução do meio reacional. A relação é apresentada apenas para as bactérias do tipo *Staphylococcus aureus*, visto que para as bactérias do tipo *Escherichia coli* não foi detectada atividade inibitória.

Figura 55 - Diâmetros médios dos halos de inibição obtidos pelo teste de difusão em ágar para amostras de complexos de inclusão β CD-óleo de alho obtidas com diferentes concentrações de óleo de alho no meio reacional, tratadas e não tratadas termicamente. Testes realizados com as bactérias do tipo *Staphylococcus aureus*.



De modo geral, os resultados indicam que a encapsulação em β -ciclodextrina é uma forma viável para proteger os substratos de eugenol e de óleo de alho contra a degradação térmica e manter a atividade antimicrobiana dos complexos de inclusão mesmo após o tratamento térmico.

5.3.2 Testes de concentração inibitória mínima para os complexos de inclusão de β CD-eugenol e β CD-óleo de alho.

Os testes de concentração inibitória mínima (CIM) foram realizados nos complexos de inclusão com o objetivo de complementar a técnica de difusão em ágar, visto que em muitos casos a atividade antibacteriana é melhor manifestada em meios líquidos.

As análises de CIM foram realizadas apenas com os complexos de inclusão obtidos no meio reacional contendo 1,656 g de eugenol e 1,908 g de óleo de alho (amostras 8). Foram analisados os complexos de β CD-eugenol e de β CD-óleo de alho sem e com o tratamento térmico em 75°C e 60°C, respectivamente, por tempo de 1 h.

A Figura 56 mostra os resultados obtidos para os complexos de inclusão β CD-eugenol sem e com o tratamento térmico, respectivamente, com as bactérias do tipo *Staphylococcus aureus*. Observa-se que o tratamento térmico dos complexos não proporcionou mudanças significativas nos valores de CIM. Para ambas as condições dos complexos de inclusão a concentração inibitória mínima determinada foi menor que 10000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e maior que 5000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de microcápsulas de β CD-eugenol (linha A).

Comparando-se com a CIM do eugenol puro, observa-se que o encapsulamento manteve a atividade antibacteriana do composto, porém em menor intensidade, visto que a concentração de eugenol presente na β CD é menor que a concentração testada para o composto puro. Este resultado é considerado positivo, visto que comprova a presença de eugenol na microcápsula e que esta, além da proteção, controla a liberação do composto.

Resultados microbiológicos com CIM similares foram obtidos com as bactérias do tipo *Escherichia coli*. O valor de CIM determinado foi também menor que 10000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e maior que 5000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de complexo β CD-eugenol para as bactérias do tipo *Escherichia coli*, para o complexo com e sem o tratamento térmico, conforme a Figura 57.

Figura 56 - Teste de concentração inibitória mínima (CIM) para os complexos de inclusão β CD-eugenol com tratamento térmico (S), sem tratamento térmico (NS), Branco (B – coluna 12), Controle Positivo (+), Controle Negativo (-). Bactérias do tipo *Staphylococcus aureus*.

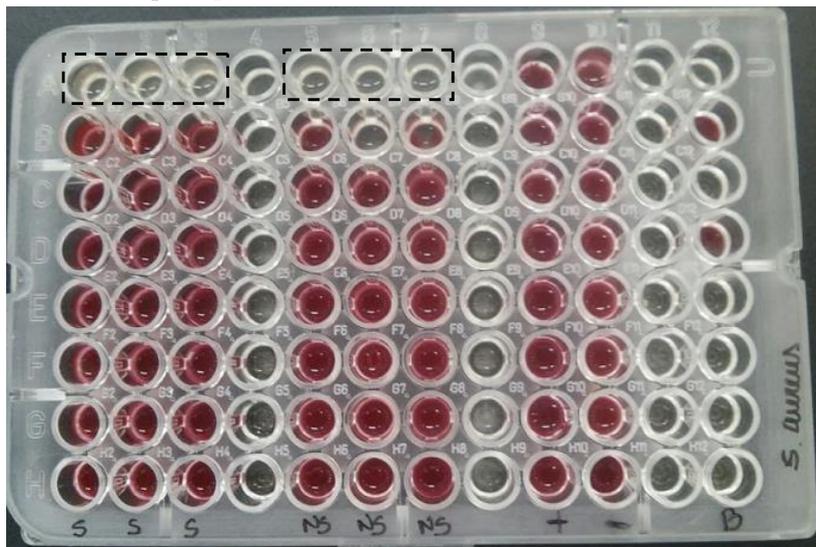
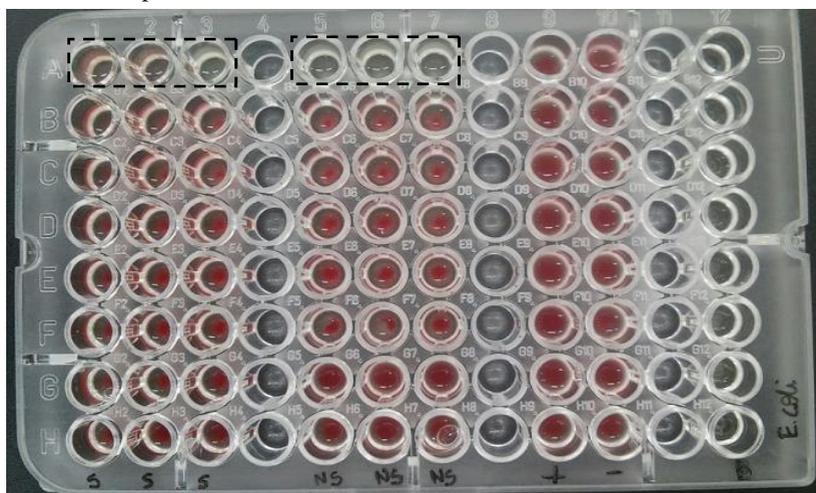


Figura 57 - Teste de concentração inibitória mínima (CIM) para os complexos de inclusão β CD-eugenol com tratamento térmico (S), sem tratamento térmico (NS), Branco (B – coluna 12), Controle Positivo (+), Controle Negativo (-). Bactéria do tipo *Escherichia coli*.



É possível considerar que o encapsulamento aumentou a solubilidade do eugenol. Mesmo com menores quantidades que nos testes de difusão em ágar, o complexo apresentou efeito inibitório. Essas características microbiológicas são bons indicadores de que o encapsulamento mantém o efeito antibacteriano do eugenol e que a presença da β -ciclodextrina potencializa este efeito, devido ao aumento da solubilidade do eugenol nos meios aquosos.

Hill, Gomes e Matthew Taylor (2013) estudaram a atividade antimicrobiana de complexos de inclusão de β -ciclodextrina com diferentes óleos (substratos), como o *trans*-cinamaldeído, eugenol, casca de canela e extrato de broto de cravo. Para o eugenol puro, com bactérias do tipo *Salmonella typhimurium*, o valor da CIM foi maior que $1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$ enquanto que com o complexo β CD-eugenol foi de $693 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Já para a bactéria do tipo *Listeria innocua* a CIM do eugenol puro foi de $2000 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e para o complexo de inclusão foi de $1155 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Os autores relatam que esse comportamento se deve à solubilidade do eugenol ser menor e, portanto, resultar em um menor contato com as bactérias em solução, confirmando que a β -ciclodextrina melhora a solubilidade dos compostos e, conseqüentemente, a eficiência antimicrobiana dos óleos essenciais.

Wang et al. (2011) observaram que o complexo de inclusão de β CD-eugenol foi capaz de inibir o crescimento da *Escherichia coli*, porém não foi eficaz contra a *Salmonella paratyphi* B e *Staphylococcus aureus*, sugerindo que o eugenol é um antimicrobiano seletivo. Kamimura et al. (2014) avaliaram a atividade antimicrobiana e antioxidante do eugenol microencapsulado em HPBCD, e observaram que a MIC do eugenol puro para a *Salmonella typhimurium* e para a *Escherichia coli* foi menor quando o eugenol foi microencapsulado, ou seja, sua eficiência antibacteriana foi melhorada.

Os resultados de CIM para as microcápsulas de β CD-óleo de alho para a bactéria *Staphylococcus aureus* são mostrados nas Figuras 58 e 59. O valor de CIM determinado foi menor que $10000 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e maior que $5000 \mu\text{g.mL}^{-1}$. A mesma CIM foi encontrada para o óleo de alho puro.

Figura 58 - Teste de concentração inibitória mínima (CIM) para os complexos de inclusão β CD-óleo de alho sem tratamento térmico (NS), Branco (B – coluna 12), Controle Positivo (+), Controle Negativo (-). Bactéria do tipo *Staphylococcus aureus*.

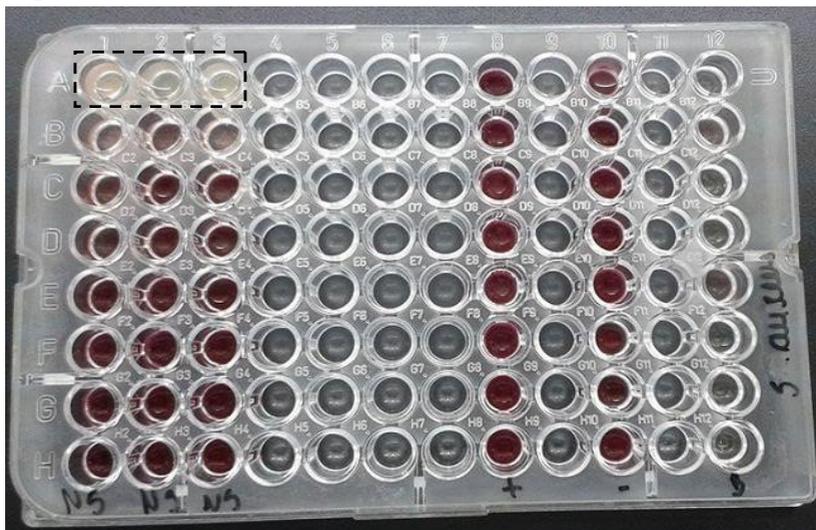
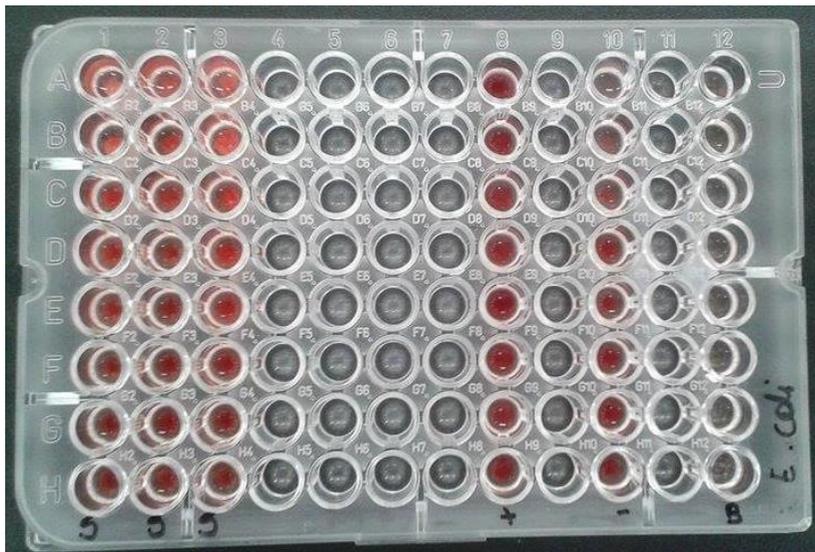


Figura 59 - Teste de concentração inibitória mínima (CIM) para os complexos de inclusão β CD-óleo de alho com tratamento térmico (NS), Branco (B – coluna 12), Controle Positivo (+), Controle Negativo (-). Bactéria do tipo *Staphylococcus aureus*.



Figura 61 - Teste de concentração inibitória mínima (CIM) para os complexos de inclusão β CD-óleo de alho com tratamento térmico (S), Branco (B – coluna 12), Controle Positivo (+), Controle Negativo (-). Bactéria do tipo *Escherichia coli*.

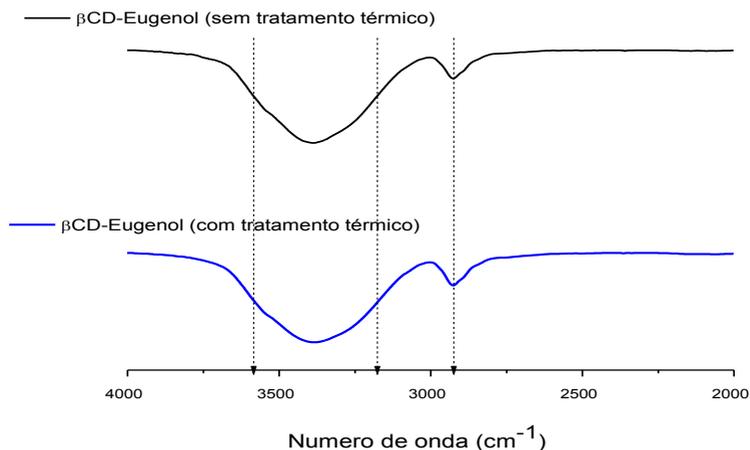


5.3.3 Análises de Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR) para o complexo de inclusão de β CD-eugenol e de β CD-alho

A técnica de FTIR foi empregada para avaliar se o tratamento térmico causou mudanças significativas na estrutura química dos complexos de inclusão de β CD-eugenol e de β CD-óleo de alho.

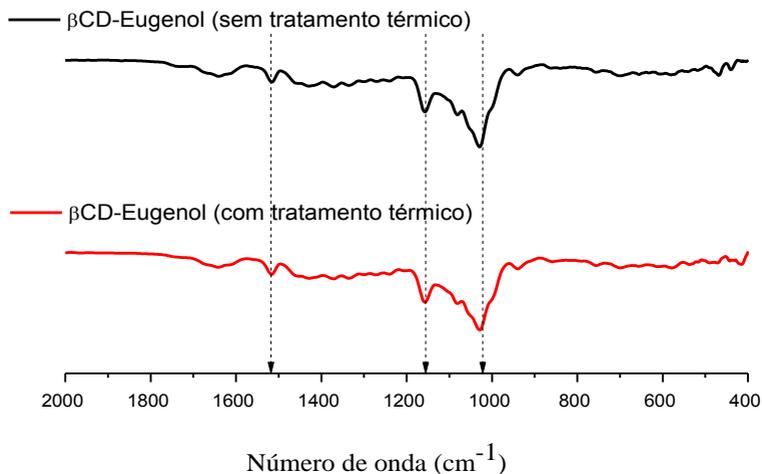
A Figura 62 mostra um comparativo entre os espectros obtidos para o complexo β CD-eugenol sem o tratamento e para o de β CD-eugenol após o tratamento térmico com temperatura de 75 °C por uma hora, com detalhes da região de 4000 a 2000 cm^{-1} .

Figura 62 - Espectro de FTIR obtidos para o complexo β CD-eugenol sem e com o tratamento térmico a 75 °C por uma hora. Detalhes na região de 4000 a 2000 cm^{-1} .



A Figura 63 mostra o espectro de FTIR obtidos para o complexo de inclusão β CD-eugenol com e sem tratamento térmico com detalhes na região de 400 a 2000 cm^{-1} . As principais bandas características do complexo de inclusão permaneceram sem alterações significativas após o tratamento térmico.

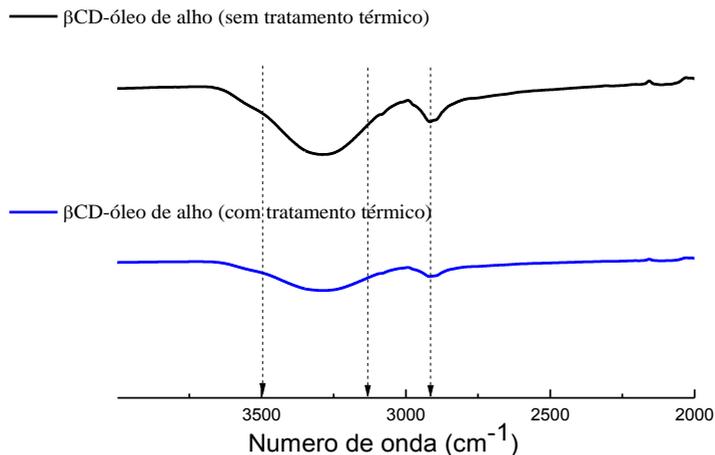
Figura 63 - Espectro de FTIR obtidos para o complexo β CD-eugenol sem e com o tratamento térmico em 75 °C por uma hora. Detalhes na região de 400 a 2000 cm^{-1} .



Os espectros mostram que o tratamento térmico não promove mudanças significativas na estrutura química do complexo de inclusão de β CD-eugenol, visto que não são observadas mudanças significativas nas bandas de absorção de ambos os espectros. Esses resultados corroboram a tese de que a encapsulação é uma forma viável de proteção térmica aos compostos voláteis e instáveis termicamente.

A Figura 64 mostra os espectros de FTIR obtidos para os complexos de β CD-óleo de alho na região de 2000 a 4000 cm^{-1} . Na banda de 3000-3500 cm^{-1} observa-se um achatamento e a diminuição da magnitude. Estas alterações podem estar relacionadas à perda de moléculas de água da estrutura do complexo devido ao tratamento térmico que a microcápsula foi submetida.

Figura 64 - Espectro de FTIR obtidos para o complexo β CD-óleo de alho sem e com o tratamento térmico a 60 °C por uma hora. Detalhes na região de 4000 a 2000 cm^{-1} .

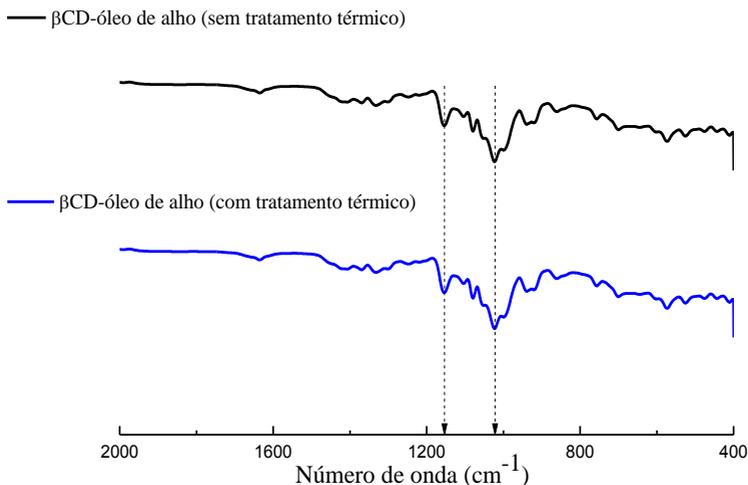


A Figura 65 mostra um comparativo entre os espectros de FTIR obtidos para as microcápsulas de β CD-óleo de alho tratadas termicamente, no intervalo de número de onda de 400 a 2000 cm^{-1} , que não apresenta alterações significativas nas bandas de absorvância. Essas alterações não afetaram as características antibacterianas do óleo de alho, como demonstrado pelos resultados microbiológicos na seção anterior.

Além disso, não foi constatada a formação de novas bandas ou a eliminação de bandas nos espectros de FTIR. Esta constatação confirma que o tratamento térmico não promove alterações na estrutura química do complexo β CD-óleo de alho.

Esses resultados confirmam que as alterações observadas possivelmente se referem à perda de compostos adsorvidos à estrutura do complexo β CD-óleo de alho, a exemplo das moléculas de água de passivação. Porém essas alterações não afetaram as propriedades do complexo, evidenciando, assim, que o encapsulamento é uma forma viável de proteção dos óleos essenciais.

Figura 65- Espectro de FTIR obtidos para o complexo de β CD-óleo de alho sem e com o tratamento térmico em 60 °C por uma hora. Detalhes na região de 400 a 2000 cm^{-1} .



5.3.4 Análise Termogravimétrica (TGA) para os complexos de inclusão de β CD-eugenol e de β CD-alho

Os complexos de inclusão foram avaliados após o processo de tratamento térmico com a técnica de termogravimetria. O principal objetivo foi verificar a presença de substratos remanescentes (encapsulados ou não) após a exposição a temperaturas superiores à de volatilização e por um tempo prolongado.

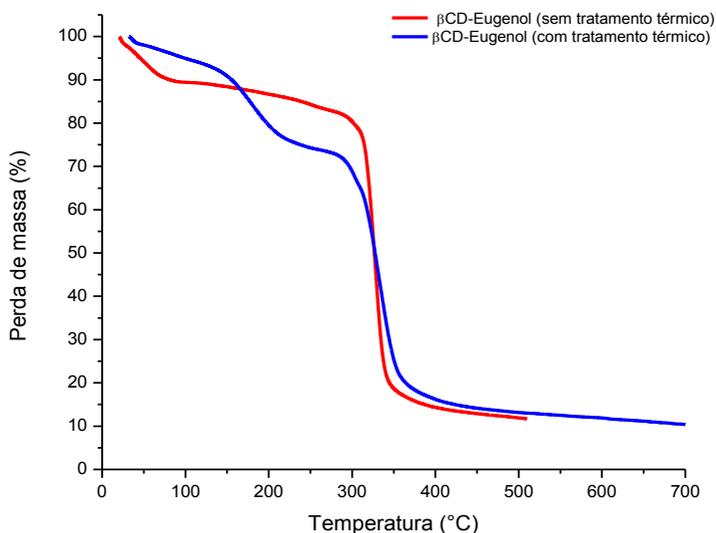
Os termogramas obtidos para os complexos de β CD-eugenol sem e com o tratamento térmico são apresentados na Figura 66.

Com o complexo de inclusão de β CD-eugenol sem o tratamento térmico é observada perda de massa em temperaturas inferiores a 100°C devido à perda de água presente na estrutura da ciclodextrina e também à volatilização das moléculas de eugenol livres. A perda de massa ocorre até temperaturas próximas de 285°C. Próximo à temperatura de 300°C é observada a perda de pequena quantidade de massa e, na sequência, a decomposição térmica do complexo.

Comparando os termogramas, observa-se que o complexo de inclusão β CD-eugenol tratado termicamente apresenta um

comportamento diferente na região de temperaturas menores que a de decomposição da β -ciclodextrina. Em temperaturas menores que 100°C a perda de massa é menor, aproximadamente 4,3%, em relação à perda de água remanescente na estrutura da ciclodextrina. Mesmo após o tratamento térmico a 75°C e por uma hora ainda há eugenol livre adsorvido nas moléculas de ciclodextrina. Essas moléculas são liberadas até a temperatura de 250°C e correspondem à massa de 18,52%.

Figura 66 - Termogramas de TGA obtido para os complexos de inclusão β CD-eugenol com e sem o tratamento térmico 75°C por 1 h.

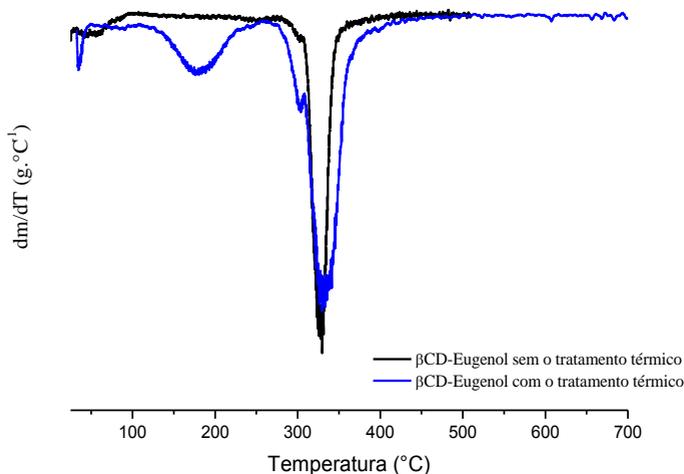


Whorton e Reineccius (1995) estudaram o tempo de estabilidade das microcápsulas de β CD-eugenol e sugerem que a liberação dos compostos aromatizantes encapsulados está diretamente relacionada com a água adsorvida nos materiais de revestimento dessas cápsulas. A água começa a penetrar nas paredes das partículas secas, seguido de fissuras que aparecem na superfície da partícula e promove a liberação do material encapsulado. Uma possível explicação é que o tempo de armazenamento das microcápsulas anterior à análise de TGA pode ter contribuído para alterações promovidas pela umidade, como

fissuras na estrutura da β CD, promovendo uma maior liberação do eugenol microencapsulado.

O diagrama diferencial é apresentado na Figura 67 e este confirma as transições. Observa-se um pico que começa a ser formado em temperatura próxima a 130 °C, que corresponde às alterações observadas no termograma do complexo tratado termicamente.

Figura 67 - Diagrama dm/dT para os complexos de β CD-eugenol sem e com o tratamento térmico com 75°C por 1 h.



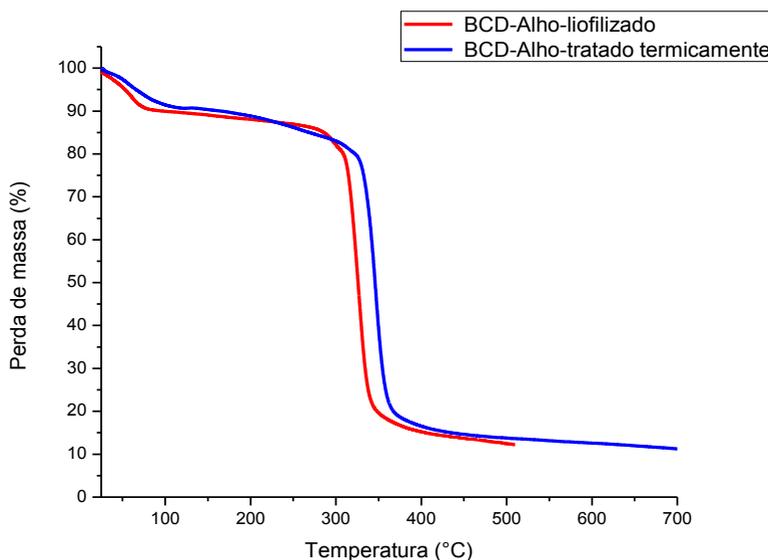
Da mesma forma, o termograma diferencial indica a formação de 2 picos correspondentes à degradação completa dos complexos. Porém, para o complexo de β CD-eugenol tratado termicamente, a temperatura de degradação corresponde a, aproximadamente, 280°C, enquanto que para o complexo sem tratamento térmico a temperatura é pouco superior a 300°C.

Os termogramas para as microcápsulas de β CD-óleo de alho sem e com tratamento térmico são apresentados na Figura 68.

O complexo de β CD-óleo de alho apresenta perda de massa de, aproximadamente, 9,5% em temperaturas inferiores a 100°C devido à perda de água da estrutura da β -ciclodextrina. Na região de temperatura

de 65°C a 285°C ocorre perda de massa de aproximadamente 7% associada com a volatilização do óleo de alho não encapsulado na β -ciclodextrina, porém interagindo com a estrutura das microcápsulas. Próximo à temperatura de 275°C é observada a perda de pequena quantidade de massa e, na sequência, a decomposição térmica do complexo com a formação de massa residual de aproximadamente 12,6 %.

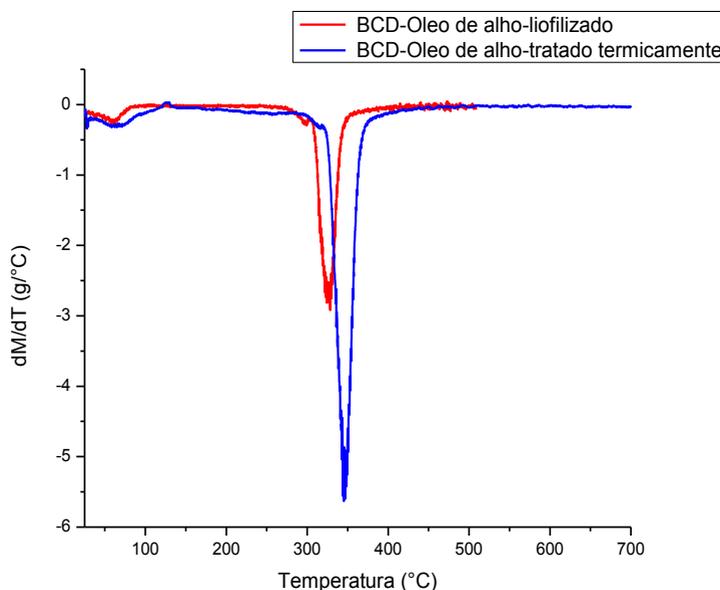
Figura 68 - Termogramas de TGA obtidos para os complexos de inclusão β CD-óleo de alho com e sem o tratamento térmico em 60°C por 1 h.



O complexo de β CD-óleo de alho tratado termicamente apresenta comportamento semelhante, sendo que em temperaturas inferiores a 100°C a perda de água é de, aproximadamente, 8,6% e está associada com a perda de massa de água de passivação da estrutura da β -ciclodextrina. No intervalo de temperatura de 100 a 235°C a perda de massa é de 3,32%, semelhante à perda apresentada pelo complexo sem o tratamento térmico. Consta-se que o início da degradação do complexo β CD-óleo de alho ocorre em 305°C, enquanto que o complexo sem o tratamento térmico é degradado a 275°C.

O diagrama diferencial é apresentado na Figura 69 e confirma as transições verificadas. Em particular, o diagrama da diferencial evidencia que a eliminação do óleo de alho não microencapsulado promove um aumento da estabilidade térmica das microcápsulas, possivelmente porque o eugenol não microencapsulado reage com a estrutura da β CD e o complexo se degrada em temperaturas menores. Aguiar et al. (2013) também observaram que alterações nos picos, como deslocamento de temperatura ou diminuição da intensidade, comprovam um aumento da estabilidade térmica em comparação ao complexo de β CD-óleo de alho não submetido ao tratamento térmico.

Figura 69 - Diagrama dm/dT para os complexos de β CD-eugenol sem e com o tratamento térmico com 75°C por 1 h.



Furuta e Yoshii (2000) avaliaram a taxa de liberação do isotiocianato de alil (AITC) em diferentes temperaturas, 50 °C, 60 °C e 70 °C, e umidade relativa de 50%, 60% e 75% por tempo de até 25 h, para a α -, β - e γ CD. O AITC presente no complexo da α CD apresentou uma liberação controlada. Após 25 h, 60% do composto permaneceu encapsulado a uma umidade e temperatura alta. Por outro lado, o AITC presente na γ CD teve sua liberação no início do teste e posteriormente

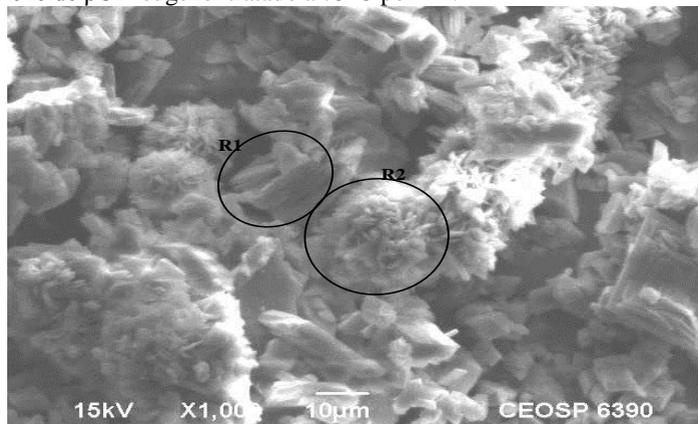
um comportamento semelhante em ambos os casos. Os resultados foram similares nas mesmas condições de tempo e umidade relativa (UR). À medida em que a umidade foi aumentada a liberação do AITC foi muito acelerada, principalmente entre 50 e 60%. Para a β CD, após aproximadamente 1 h a taxa de retenção do AITC foi de 50% considerando umidade relativa de 60%. Já para a temperatura de 75 °C a taxa de retenção foi de 40% para a mesma UR.

5.3.5 Análise por microscopia eletrônica de varredura para as microcápsulas de β CD-eugenol e de β CD-alho após o tratamento térmico

A Figura 70 mostra a imagem obtida por microscopia eletrônica de varredura para o complexo de β CD-eugenol após ter sido submetido ao tratamento térmico a 75°C por 1 h. A imagem mostra uma estrutura cristalina relativa ao complexo β CD-eugenol e algumas estruturas porosas associadas, provavelmente, à β -ciclodextrina ou a regiões onde as moléculas de eugenol livres habitavam antes da sua volatilização durante o tratamento térmico.

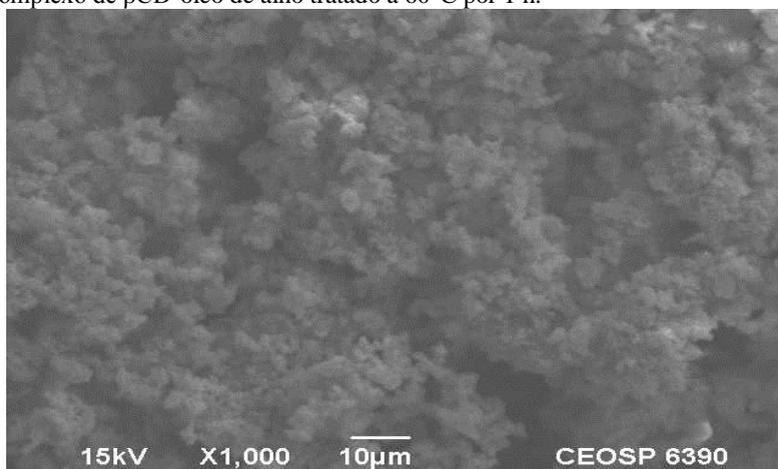
Os poros sobre a estrutura são formados provavelmente devido à volatilização das moléculas de eugenol livres. Por exemplo, na região R1 da imagem há microcápsulas de complexos β CD-eugenol com dimensões de cerca de 12 μ m. Nessa estrutura, as moléculas de eugenol são encapsuladas. Na região R2 é observada uma estrutura constituída por, provavelmente, apenas β -ciclodextrina e por poros que foram gerados pelas moléculas de eugenol livres que foram liberadas durante o tratamento térmico.

Figura 70 - Imagem obtida por Microscopia Eletrônica de Varredura para o complexo de β CD-eugenol tratado a 75°C por 1 h.



A análise em MEV evidência que, após o tratamento térmico, os complexos de β CD-óleo de alho não foram significativamente modificados, Figura 71. A morfologia dos aglomerados (microcápsulas) é semelhante à morfologia do complexo de inclusão sem o tratamento térmico. Esse comportamento é esperado, tendo em vista que o óleo de alho livre, que poderia causar o aumento da porosidade, é volatilizado ainda com a temperatura ambiente.

Figura 71 - Imagem obtida por microscopia eletrônica de varredura para o complexo de β CD-óleo de alho tratado a 60°C por 1 h.



5.4 REVESTIMENTO DOS COMPLEXOS DE INCLUSÃO β CD-EUGENOL E DE β CD-ALHO COM PMMA

Esta etapa foi dedicada aos procedimentos de revestimento dos complexos β CD-eugenol e de β CD-óleo de alho com PMMA por pulverização. Os complexos de inclusão foram revestidos com PMMA solubilizado em acetona a sua estabilidade térmica foi avaliada por análise termogravimétrica. Também foi aplicada a microscopia eletrônica de varredura para avaliar a morfologia dos revestimentos. Os complexos de inclusão revestidos com PMMA foram submetidos ao tratamento térmico com temperatura de 170°C por 5 e 10 minutos, simulando as condições gerais de processamento dos materiais poliméricos na fabricação de embalagens para alimentos.

5.4.1 Revestimento das microcápsulas de β CD-eugenol e de β CD-óleo de alho com PMMA por pulverização

Os complexos de inclusão de β CD-eugenol e de β CD-óleo de alho foram revestidos com PMMA solubilizado em acetona pelo método de pulverização. A Figura 72 mostra as partículas obtidas com o complexo de β CD-eugenol revestido por PMMA e a Figura 73 mostra partículas obtidas com o complexo de β CD-óleo de óleo revestidas por PMMA, ambas em duplicata.

Figura 72 - Microcápsulas de β CD-eugenol após revestimento com PMMA.

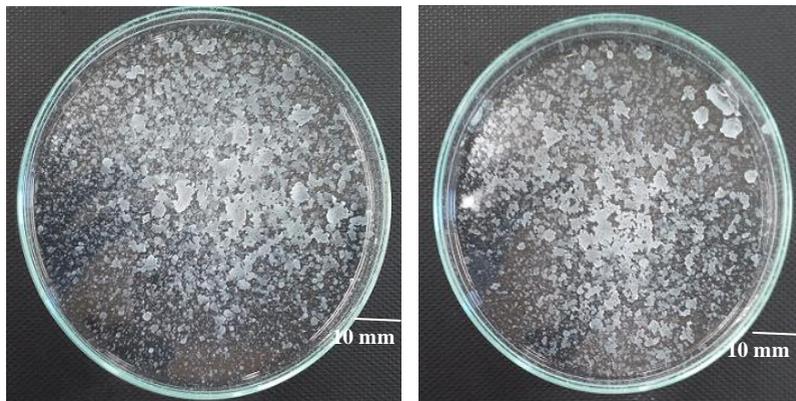
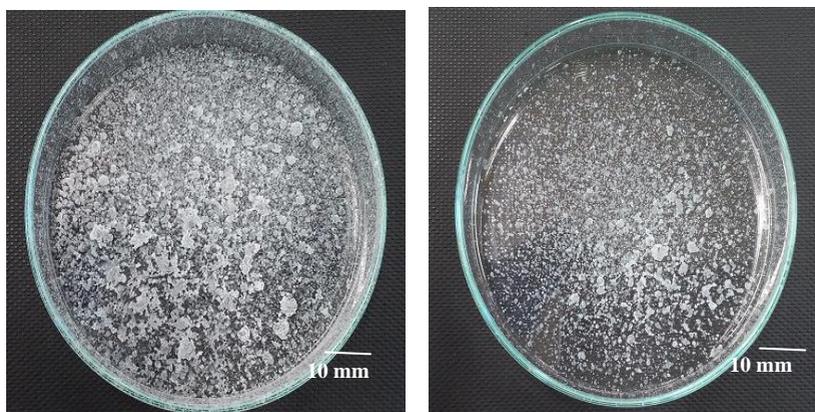


Figura 73 - Microcápsulas de β CD-óleo de alho após revestimento com PMMA.



Considerando que o processo utilizado de pulverização não oferece condições de controle de parâmetros de processo, como velocidade de spray, temperatura de spray, características de feixe, pressão de spray, altura de coluna de resfriamento e outros, observa-se a formação de partículas pequenas, da ordem de 1 μ m, e a formação de aglomerados maiores, constituído pela coalescência das partículas.

Com o controle de processo, ou seja, com a aplicação de sistemas de pulverização projetados especialmente (*spray dryer*), será possível obter partículas constituídas por complexos de inclusão revestidos com PMMA com dimensões da ordem de milímetros.

Os testes de pulverização apresentaram resultados interessantes e promissores para trabalhos futuros de produção dos complexos de inclusão revestidos com PMMA em sistemas de *spray dryer*, capazes de proporcionar melhor controle do processo de revestimento e de secagem.

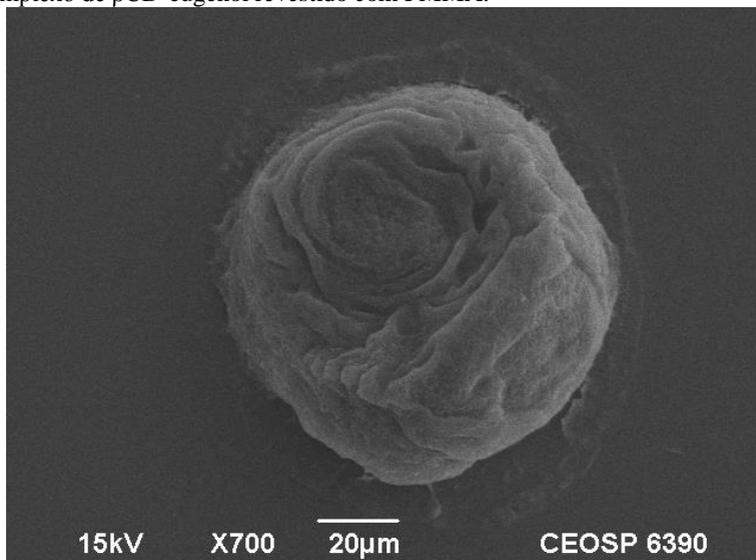
5.4.2 Análise por microscopia eletrônica de varredura dos complexos de inclusão de β CD-eugenol e de β CD-alho revestidos com PMMA

As Figuras 74 e 75 mostram as imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura para as microcápsulas de β CD-

eugenol e de β CD-óleo de alho revestidas com PMMA, respectivamente.

Na Figura 74 observa-se que o diâmetro aproximado é de $100\mu\text{m}$ e o formato é semelhante a uma esfera achatada. O formato esférico é característico do processo de secagem por pulverização quando os componentes são compatíveis e constituem uma mistura homogênea. O aspecto achatado está associado com a velocidade das micropartículas enquanto em fluxo. No processo aplicado a pulverização foi realizada em uma superfície e por isso quando as micropartículas colidem sofrem deformação. Com estudos adequados de ajustes de parâmetros do processo de pulverização é possível prever que as micropartículas terão formato esférico. Por sua vez, não foram observados poros na superfície, o que indica que os complexos de inclusão deverão estar protegidos de processo de difusão para o meio externo ou de difusão de oxigênio, por exemplo, para o meio interno. Estas características são importantes para garantir a proteção dos complexos de inclusão de efeitos térmicos ou químicos.

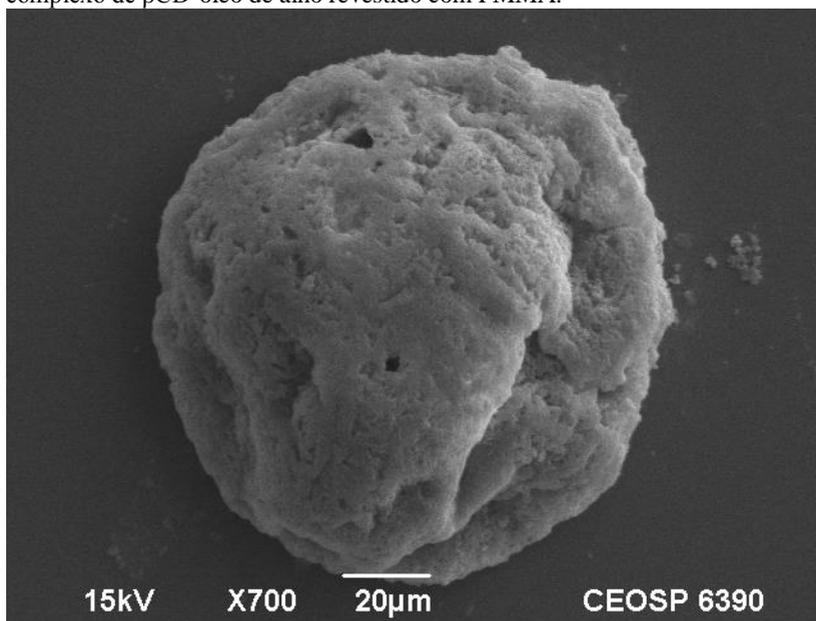
Figura 74 - Imagem obtida por microscopia eletrônica de varredura para o complexo de β CD-eugenol revestido com PMMA.



Observa-se, na Figura 75, que as partículas de β CD-óleo de alho revestidas com PMMA apresentam formato semelhante a uma esfera,

com diâmetro de aproximadamente $120\mu\text{m}$, com rugosidade na superficial não homogênea.

Figura 75 - Imagem obtida por microscopia eletrônica de varredura para o complexo de βCD -óleo de alho revestido com PMMA.



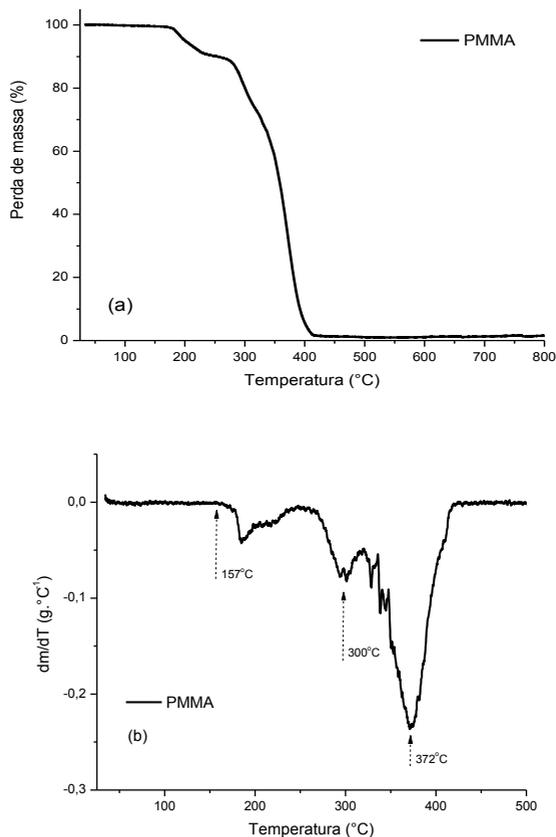
Formatos e diâmetros semelhantes dessas partículas podem ser obtidos através do processo de *spray dryer* projetados especialmente para esta finalidade. Além disso, um estudo otimizando as condições do processo seria indicado para obter as melhores características das microcápsulas formadas.

5.4.3 Análise Termogravimétrica para os complexos de inclusão de βCD -eugenol e de βCD -alho revestidos com PMMA

O revestimento dos complexos de inclusão com PMMA teve como objetivo aumentar a proteção térmica do eugenol e do óleo de alho em condições de temperatura e de tempo similares às condições de processamento dos principais polímeros empregados para a fabricação de embalagens.

A Figura 76 apresenta o termograma por TGA obtido para o PMMA, polímero utilizado para o revestimento dos complexos de inclusão. Os resultados indicam a perda de massa em três estágios de temperatura, Figura 76(a). O primeiro estágio tem início em 157°C e corresponde à evaporação de água desorvida no polímero (El-Zaher, Melegy e Guirguis, 2014). Os demais estágios são melhor revelados no diagrama do termograma diferencial de TGA e correspondem à degradação térmica do PMMA, Figura 76(b). O primeiro estágio da degradação ocorre em 300°C e o segundo em 372°C, corroborando os resultados obtidos por Zhao e Samulski (2006), que relatam que o PMMA puro apresenta duas etapas de degradação: a primeira é atribuída à cisão das partes iniciais da molécula polimérica e das cadeias de vinilideno e a segunda corresponde à cisão interna aleatório da cadeia polimérica.

Figura 76 - (a) Termograma de TGA para o polímero PMMA e (b) diagrama do diagrama diferencial de TGA. Termograma obtido com 10 °C/min e atmosfera de nitrogênio.



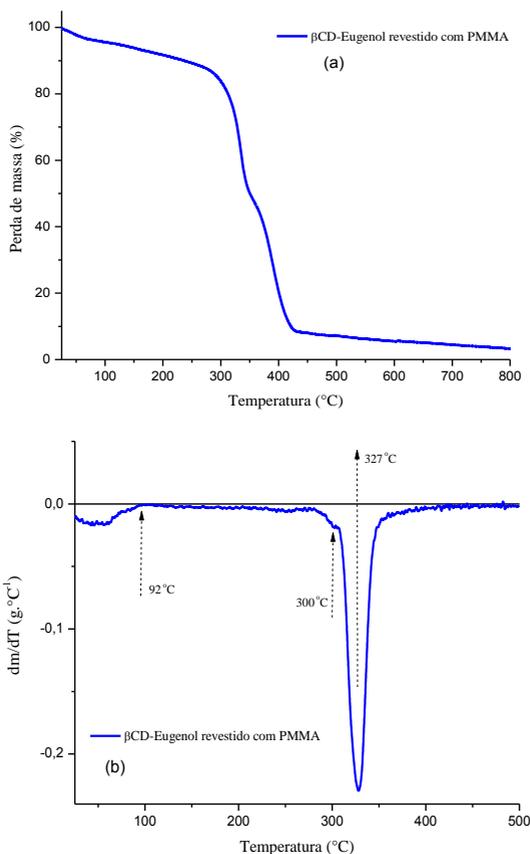
Lucas et al. (1993) relatam que o PMMA apresenta boa estabilidade térmica em temperaturas abaixo de 250°C. Acima desta temperatura o material começa a degradar e ter como produto o monômero de metacrilato de metila (MMA), que é volatilizado.

A Figura 77(a) mostra o termograma de TGA obtido para o complexo de β CD-eugenol revestido com PMMA. O comportamento térmico para o complexo tem diferenças significativas em relação ao polímero PMMA puro. Até temperaturas próximas de 100°C ocorre a liberação da água adsorvida no composto. Após esta temperatura, ocorre a redução gradual de massa que pode estar associada com a água remanescente na estrutura ou com o eugenol livre no complexo β CD-

eugenol. Em temperatura próxima a 300°C inicia o processo de decomposição térmica do PMMA.

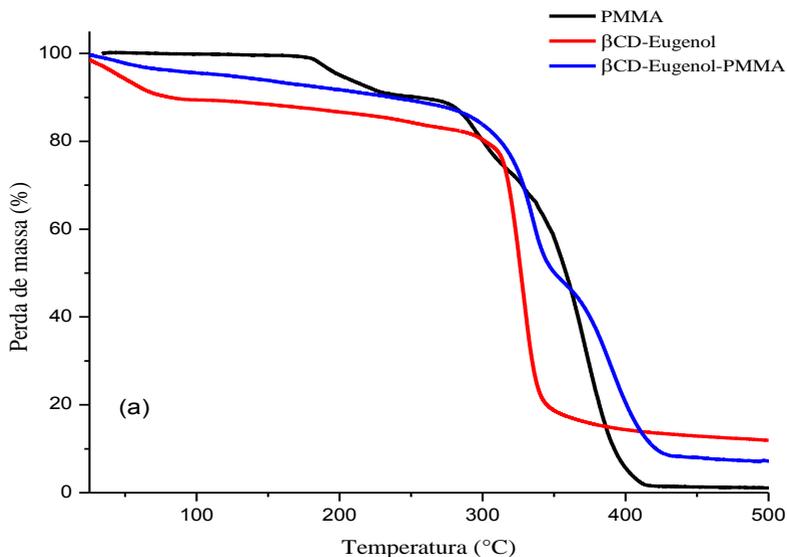
O diagrama diferencial de TGA, Figura 77(b), revela o estágio de liberação da água adsorvida até a temperatura de 92°C. Após essa temperatura ocorre a liberação gradual até a temperatura de 280°C do eugenol livre. Em 300°C e 327°C ocorre o estágio de degradação do revestimento de PMMA.

Figura 77 - (a) Termograma de TGA para o complexo β CD-eugenol revestido com PMMA e (b) diagrama do termograma diferencial de TGA. Termograma obtido com 10°C/min e atmosfera de nitrogênio.



A Figura 78 mostra um comparativo do termograma obtido por TGA para o complexo de β CD-eugenol em relação ao mesmo complexo com o revestimento de PMMA. Os termogramas apresentam diferenças significativas que podem ser melhor avaliadas a partir da comparação entre os diagramas diferenciais do TGA, Figura 79.

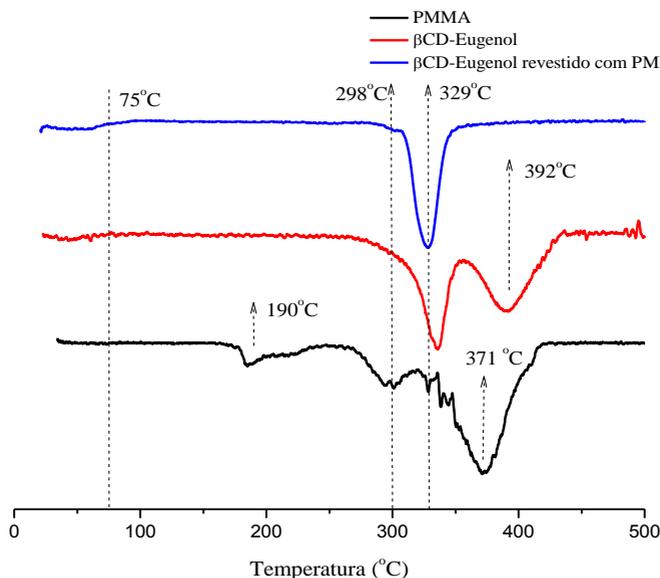
Figura 78 - Comparativo entre os termogramas de TGA para o PMMA, complexo β CD-eugenol e complexo β CD-eugenol revestido com PMMA.



Até a temperatura de 92°C, a maior parte das moléculas de água e das moléculas de eugenol livres adsorvidas na superfície do revestimento são volatilizadas. No complexo revestido é observado a perda contínua de massa até temperaturas próximas de 280°C, correspondentes às moléculas de água que estão adsorvidas pelo PMMA do revestimento e às moléculas de eugenol livres remanescentes. É perceptível que a presença do complexo β CD-eugenol favorece a decomposição do PMMA, reduzindo a temperatura do segundo estágio de degradação térmica do polímero de 372°C para 327°C. Nesta temperatura ocorre, simultaneamente, a decomposição térmica da estrutura da β -ciclodextrina do complexo de inclusão. Assim, a redução da temperatura de decomposição do PMMA pode estar associada com a presença de radicais peróxidos que são gerados na degradação térmica

da estrutura da β -ciclodextrina e que aceleram o processo de oxidação das moléculas do polímero PMMA.

Figura 79 - Comparativo entre os diagramas diferenciais de TGA para o PMMA, complexo β CD-eugenol e complexo β CD-eugenol revestido com PMMA.



O complexo β CD-eugenol, conforme já discutido no item 5.2.4, apresenta perda de massa em temperaturas inferiores a 100°C, relativa à perda de água presente na estrutura da ciclodextrina, de aproximadamente 9,2%, além da liberação do eugenol livre e adsorvido na ciclodextrina. Em seguida, ocorre uma pequena perda de massa de 17,5% em temperatura de até 280°C, relativa à evaporação do eugenol livre e também do eugenol encapsulado interagindo com a estrutura da β CD, enquanto que para o complexo β CD-eugenol revestido com PMMA a perda de massa foi de 12,6% na mesma temperatura.

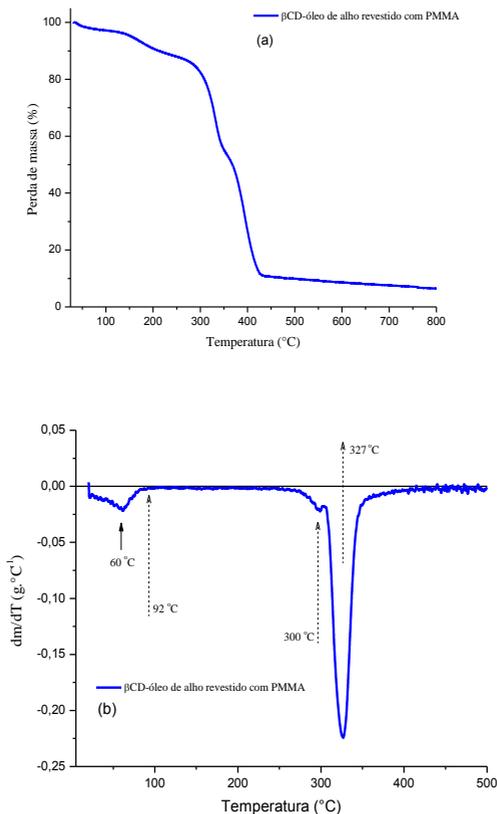
O termograma do complexo de β CD-eugenol revestido com PMMA indica que o revestimento aumentou a proteção térmica do complexo, principalmente em temperaturas até 100°C. A perda de massa do complexo β CD-eugenol a 100°C foi de 10,8%, enquanto que para o complexo β CD-eugenol revestido com PMMA a perda foi de 3,6%. Esses resultados são muito importantes, visto que foi observado no

termograma obtido para o eugenol puro que na temperatura de 100°C inicia a degradação completa do composto.

O complexo β CD-eugenol apresenta um pico menos acentuado em temperaturas menores que 50°C, relativo à volatilização do eugenol livre e uma transição em 270°C, com posterior degradação do complexo. O complexo β CD-eugenol revestido com PMMA, assim como o complexo sem revestimento, apresenta um pico menos acentuado em temperatura menor que 58°C, o que é um indicativo da proteção da β CD e do eugenol não encapsulado. Posteriormente, o complexo revestido apresenta-se estável até a temperatura de 280°C, indicando uma pequena transição, e sua completa degradação inicia em 305°C.

Resultados semelhantes foram obtidos para os complexos de β CD-óleo de alho revestidos com PMMA. A Figura 80 mostra o termograma obtido para o complexo revestido e o respectivo diagrama diferencial para o TGA.

Figura 80- (a) Termograma de TGA para o complexo β CD-óleo de alho revestido com PMMA e (b) diagrama do termograma diferencial de TGA. Termograma obtido com 10°C/min e atmosfera de nitrogênio.



Para o complexo β CD-óleo de alho é possível observar que até a temperatura de 100°C a perda de massa foi de 10,4%, enquanto que para o complexo β CD-óleo de alho revestido com PMMA a perda foi de apenas 3,0%, aproximadamente, comprovando que o revestimento contribui para a estabilidade térmica do complexo. Essa diferença de 7,0% corresponde à massa de eugenol livre que não volatilizou, bem como parte da água presente na β -ciclodextrina.

A diferencial de TGA detalha essas transições. O termograma do óleo de alho puro apresentou menor estabilidade térmica que o eugenol

e, conforme a Figura 80(b), verifica-se que o complexo β CD-óleo de alho apresenta uma transição na temperatura de 30°C, referente à volatilização do óleo de alho livre. Para o complexo de β CD-óleo de alho revestido com PMMA essa transição é observada na temperatura de 60°C, indicando que o PMMA contribuiu para a proteção contra a volatilização do óleo de alho.

Para o complexo de inclusão de β CD-óleo de alho observa-se que a degradação inicia em 265°C, enquanto que para o complexo revestido uma transição é observada em 274°C. Porém, sua degradação ocorre em, aproximadamente, 305°C, comprovando, assim, que o PMMA também apresenta vantagem como forma de proteção dos complexos de β CD-óleo de alho.

As principais vantagens observadas para o revestimento com PMMA, de acordo com os termogramas e suas respectivas diferenciais, é que o eugenol e o óleo de alho puros são completamente degradados ou volatilizados em temperaturas de 159°C e 152°C, respectivamente, ou seja, em aproximadamente 13 minutos a degradação ou volatilização é completa, considerando que a técnica aplica a taxa de aquecimento de 10°C.min⁻¹.

Quando se compara esses resultados com aqueles obtidos com os complexos revestidos com β CD e PMMA, a degradação completa ocorre em temperaturas próximas a 305°C, muito superior às temperaturas de processamento de filmes poliméricos.

Assim, o revestimento com PMMA apresenta-se como uma alternativa interessante para aumentar as possibilidades de aplicação dos complexos de inclusão por proteger da degradação e da volatilização os princípios ativos quando aplicados em temperaturas superiores a 150°C.

A escolha desses sistemas está baseada nas várias aplicações desses materiais, sobretudo em várias técnicas de encapsulamento usadas. Ainda, para a aplicação com maior eficiência destes complexos de inclusão na fabricação de embalagens que empregam o processamento de filmes poliméricos, é importante considerar que a compatibilidade entre os componentes a serem processados é de extrema importância, pois ao se tentar misturar polímeros incompatíveis, não haverá formação de ligações químicas durante o processamento, sendo apenas uma mistura física com elevada tensão interfacial, tendendo à separação de fases. Em caso de incompatibilidade, haverá influência direta nas propriedades físicas e químicas do material resultante.

Além disso, o revestimento das microcápsulas com PMMA as tornará quimicamente compatíveis com as matrizes poliméricas de grande parte dos polímeros empregados na fabricação de filmes e servirá

de camada protetora, ou de sacrifício, enquanto processados em condições de degradação ou na presença de radicais formados durante os processos de degradação das embalagens. Durante seu uso, as embalagens poliméricas são expostas a vários fatores degradativos, como a radiação UV, por exemplo, que desencadeia a formação de radicais reativos e que também podem atacar os extratos naturais.

5.4.4 Tratamento térmico em alta temperatura dos complexos de inclusão de β CD-eugenol e β CD-alho com PMMA.

Os complexos de inclusão de β CD-eugenol e de β CD-óleo de alho revestidos com PMMA foram submetidos ao tratamento térmico com temperatura de 170 °C por 5 min e por 10 min. Vale ressaltar que esta temperatura é superior às temperaturas de fusão do PMMA e de processamentos empregados para a fabricação de embalagens poliméricas. Da mesma forma, os tempos de residência dos materiais poliméricos em um processo de fabricação de embalagens poliméricas são inferiores a 5 min. Desta forma, as condições de temperatura e de tempo foram majoradas.

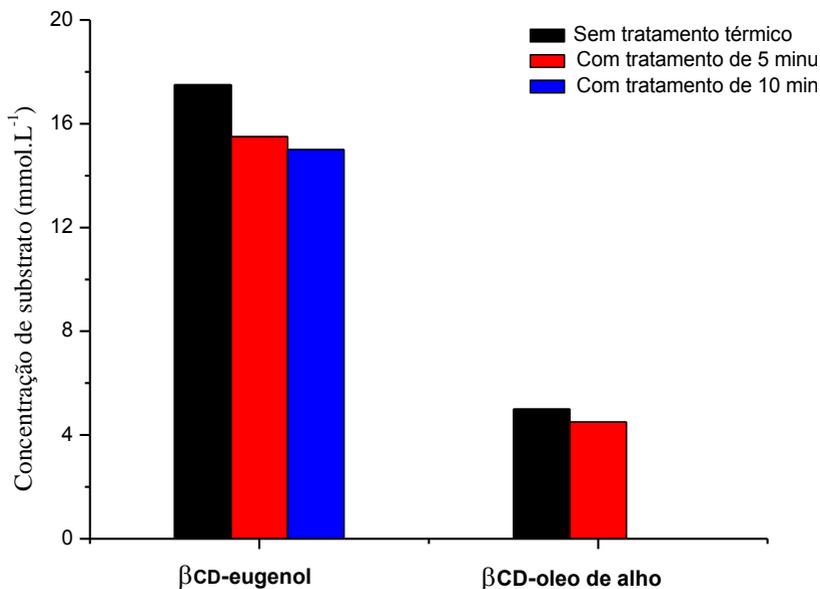
Esta etapa teve como objetivo avaliar se o PMMA auxiliou na proteção térmica dos complexos de inclusão, mantendo a integridade dos substratos de eugenol e de óleo de alho.

Após os procedimentos de tratamento térmico, os complexos de inclusão revestidos com PMMA foram solubilizados em acetona e analisados com espectroscopia de UV-Visível. A partir das retas de calibração (Figuras 23 e 24) foi determinada a concentração de eugenol ou de óleo de alho remanescente nos complexos de inclusão revestidos.

A Figura 81 mostra as concentrações de substratos de eugenol e de óleo de alho nos complexos de inclusão com revestimento determinadas antes do tratamento térmico e após os tratamentos térmicos de 5 min e de 10 min, em temperatura de 170°C.

Os resultados indicam que o tratamento térmico em temperaturas elevadas não proporcionou grandes variações na concentração dos substratos. Mesmo com a exposição em temperatura elevada, muito maior que as temperaturas de volatilização dos substratos, a perda de substrato foi muito pequena. Esta constatação comprova que os complexos de inclusão revestidos com PMMA suportam a exposição pelo menos por tempos próximos a 10 min em temperaturas consideradas elevadas.

Figura 81 - Valores de concentrações de substratos de eugenol e de óleo de alho nos complexos de inclusão com revestimento de PMMA determinadas antes do tratamento térmico e após os tratamentos térmicos de 5 min e de 10 min em temperatura de 170°C. Concentrações determinadas por espectroscopia de UV-Visível.



A presença dos compostos de eugenol e de óleo de alho no complexo de inclusão revestido com PMMA após tratamento térmico, comprova a tese de que os complexos revestidos podem suportar condições de tempo e de temperatura semelhantes às condições empregadas nos processamentos de materiais poliméricos na fabricação de embalagens. Os revestimentos de PMMA têm a função de absorção de calor e, com isso, protegem os complexos de inclusão. Ao mesmo tempo, podem ser interpretados como revestimentos de sacrifício para o complexo de inclusão.

Com estes resultados é possível prospectar um novo conceito de aditivo antimicrobiano, constituído por partículas de complexos de inclusão de βCD-eugenol e de βCD-óleo de alho revestidos com PMMA. São aditivos que encapsulam substratos antibacterianos, com estabilidade diante as condições tradicionais de temperatura e de tempo

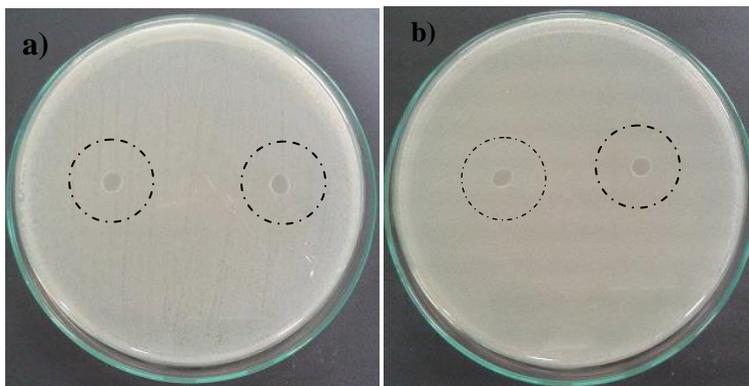
empregadas na fabricação de embalagens e, ao mesmo tempo, atóxicos, por serem constituídos por substratos naturais, já liberados para o uso de mercado.

Vale ressaltar que os substratos de eugenol e de óleo de alho são liberados para o uso em alimentos pela ANVISA e pela FDA. Por sua vez, a β -ciclodextrina é um composto atóxico, bem como o PMMA. Ambos já são utilizados para finalidades farmacêuticas e para a fabricação de produtos de uso hospitalar.

5.4.5 Teste de difusão em ágar para os complexos de inclusão de β CD-eugenol e β CD-óleo de alho revestidos com PMMA

Os complexos de inclusão β CD-eugenol e β CD-óleo de alho revestidos com PMMA foram submetidos ao teste de difusão em ágar para avaliar se apresentavam atividade antibacteriana. Com esses testes não é esperado a constatação da atividade antimicrobiana, tendo em vista que, em tese, o revestimento de PMMA deve estar fixando os substratos de eugenol ou de óleo de alho livres ou encapsulados pela β -CD, e que a migração deverá ter início somente durante o processamento dos filmes poliméricos aditivados com essas microcápsulas revestidas. Assim, durante este processo haverá rompimento parcial e início da liberação do eugenol e do óleo de alho para os filmes. Havendo a formação de halos significa que há liberação do princípio ativo e que o PMMA não está conseguindo manter fixos ou proteger esses substratos e antes mesmo da incorporação dessas microcápsulas nos filmes, estará ocorrendo liberação de eugenol e de óleo de alho e conseqüentemente diminuindo a eficiência antibacteriana dessas microcápsulas. A Figura 82 mostra os resultados do difusão em ágar para o PMMA puro frente às bactérias *Escherichia coli* (a) e *Staphylococcus aureus* (b). A amostra foi colocada sobre a superfície do ágar para facilitar o contato do material com as bactérias e, em caso de difusão de eugenol e óleo de alho, facilitar a observação dos resultados.

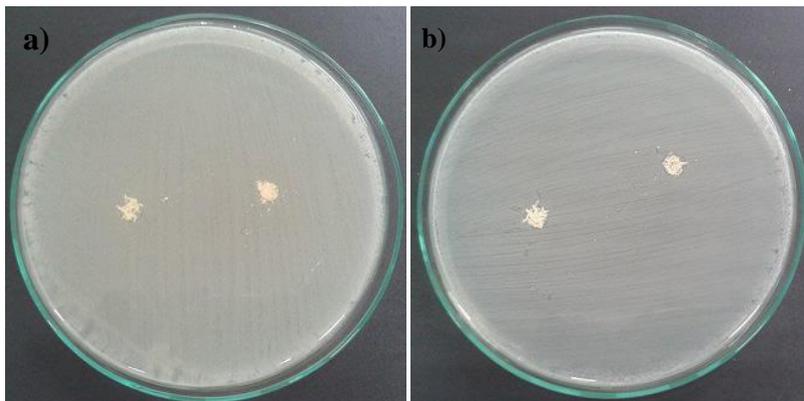
Figura 82 – Resultados da difusão em ágar para o PMMA puro, com as bactérias do tipo (a) *Escherichia coli* e (b) *Staphylococcus aureus*.



As amostras de PMMA não apresentaram atividade antibacteriana para ambos os micro-organismos, visto que não houve formação de halo de inibição. Estes resultados já eram esperados, pois o PMMA não apresenta grupos funcionais antibacterianos na sua estrutura química. Melo (2010) em seu trabalho sobre a produção de filmes híbridos pela técnica de revestimento rotacional de uma solução clorofórmica contendo o polímero PMMA e o lipídeo DODAB, sobre superfícies de silício, observou que o filme obtido tinha atividade inibitória para a *Escherichia coli* e constatou que o efeito é exclusivamente do composto quaternário, visto que o PMMA não apresenta influência na célula microbiana, sendo usado como amostra controle.

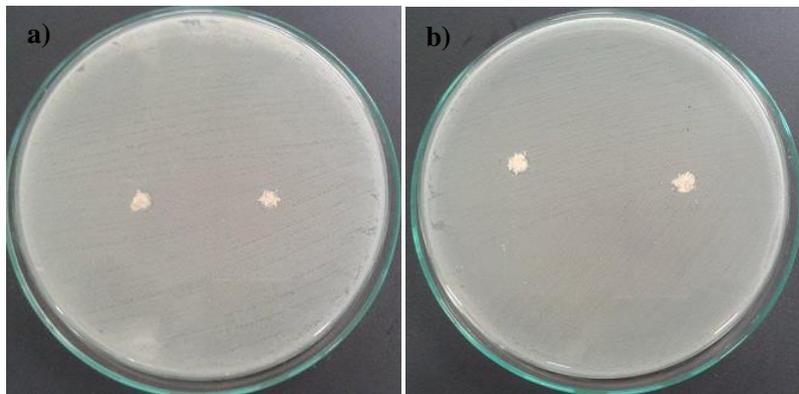
As Figuras 83 e 84 mostram os resultados microbiológicos por difusão em ágar obtidos para os complexos de β CD-eugenol e de β CD-óleo de alho revestidos com PMMA, respectivamente.

Figura 83 – Resultados de difusão em ágar para o complexo β CD-eugenol revestido com PMMA, com bactérias do tipo (a) *Escherichia coli* e (b) *Staphylococcus aureus*.



Observa-se que não houve formação de halos de inibição para as bactérias testadas, nem para as microcápsulas revestidas de β CD-eugenol e nem de β CD-óleo de alho.

Figura 84 – Resultados da difusão em ágar para o complexo β CD-óleo de alho revestido com PMMA, com as bactérias do tipo (a) *Escherichia coli* e (b) *Staphylococcus aureus*.



Esses resultados são considerados satisfatórios, com a tese de que o revestimento de PMMA mantém os complexos de inclusão

fixados, visto que o teste de difusão em ágar é realizado em 24 h e não houve sinais de migração de eugenol e de óleo de alho, devido à ausência do halo inibitório. Constata-se que, embora os complexos de inclusão de β CD-eugenol e de β CD-óleo de alho apresentem atividade antibacteriana, o PMMA serviu como proteção, mantendo os compostos fixados. Esses resultados estão de acordo com o que os termogramas mostraram (item 5.4.3), onde o PMMA protege os complexos de inclusão.

Sendo assim, a liberação dos princípios ativos ocorrerá durante o processamento dos materiais poliméricos quando as partículas dos complexos de inclusão revestidas serão empregadas como aditivos. O revestimento de PMMA, revestimento de “sacrifício”, deverá ser parcialmente rompido e permitirá que o complexo de inclusão de β CD-eugenol e ou de β CD-óleo de alho sejam liberados gradativamente, conferindo, assim, a propriedade antibacteriana ao material polimérico de aplicação.

Os resultados confirmam que o revestimento de PMMA é possível tecnicamente. O processo de pulverização pode ser empregado para o obter o revestimento dos complexos de inclusão. O revestimento de PMMA fixará com eficiência o complexo de inclusão β CD-eugenol e/ou de β CD-óleo de alho e protegerá de condições de alta temperatura e por um tempo. Conforme observado, a β CD e o PMMA protegem o eugenol e o óleo de alho por tempo e temperatura suficiente para o processamento polimérico, aumentando assim, a possibilidade de uso desses compostos em embalagens ativas e, ainda, se mostraram promissores para que outros trabalhos sejam desenvolvidos com outras aplicações desses extratos em alimentos.

6 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste trabalho mostram que o eugenol e o óleo de alho foram encapsulados em β -ciclodextrina. O processo de encapsulamento permitiu proteger os substratos de efeitos de degradação térmica e mantiveram fixas as moléculas de eugenol ou de óleo de alho em condições de temperaturas superiores a temperatura de volatilização.

Os valores de K_c de $128,16 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}$ para o complexo β CD-eugenol e de $253,78 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}$ para o complexo β CD-óleo de alho, bem como os resultados das demais técnicas de caracterização empregadas, comprovaram a formação dos complexos de inclusão de β CD-eugenol e de β CD-óleo de alho. O MEV indicou que ocorreu a formação dos complexos de inclusão devido a mudanças na estrutura da β -ciclodextrina e com a formação de estruturas com dimensões de dezenas de micrometros, o que permite estabelecer a formação de microcápsulas. Os resultados microbiológicos de difusão em ágar e de CIM demonstram que a atividade antibacteriana dos compostos puros é mantida com o encapsulamento, porém em menor intensidade, visto que a β -ciclodextrina, além de proteger, controla a liberação do eugenol e do óleo de alho.

O tratamento térmico realizado nos complexos de inclusão de β CD-eugenol e de β CD-óleo de alho comprovam que a β -ciclodextrina mantém fixada as moléculas de substrato de eugenol e de óleo de alho em condições de temperaturas superiores as suas temperaturas de volatilização. Também comprovam que realizam a proteção térmica dos substratos encapsulados visto que não foram observadas alterações significativas na estrutura dos complexos de inclusão observadas no FTIR após o tratamento térmico.

A partir dos resultados microbiológicos de difusão em ágar e de CIM comprava-se que após tratamento térmico a atividade antibacteriana dos complexos de inclusão é mantida. Assim, o encapsulamento dos substratos protege os grupos funcionais dos substratos responsáveis pela atividade antibacteriana. Os resultados indicam que é possível obter micropartículas de complexos de inclusão de β CD-eugenol e de β CD-óleo de alho revestidas com PMMA a partir da técnica de pulverização. O polímero de revestimento mantém fixados os complexos de inclusão e garante a proteção térmica dos mesmos em condições de exposição a elevada temperatura e tempo, 170°C e acima de 5 minutos.

Estas condições são críticas em relação aos processamentos tradicionais empregados para os materiais poliméricos. Estes resultados sugerem que as microcápsulas revestidas por PMMA poderão ser empregadas como aditivos antimicrobianos naturais em materiais poliméricos por meio de processos tradicionais empregados pela indústria de transformação de polímeros.

7 TRABALHOS FUTUROS

Como continuidade do estudo, são sugeridas algumas pesquisas com vista a aprofundar e melhorar o trabalho, a fim de responder alguns questionamento referente a eficiência destas microcápsulas bem como o mecanismo de liberação do eugenol e do óleo de alho, sendo:

- Estudo da estabilidade das microcápsulas de β CD-eugenol e da β CD-óleo de alho revestidos com PMMA;
- Estudo da cinética de liberação do eugenol e do óleo de alho dessas microcápsulas revestidas.

REFERÊNCIAS

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.

AGUIAR, U.N.; DE LIMA, S.G.; ROCHA, M.S.; DE FREITAS, R.M.; OLIVEIRA, T.M.; SILVA, R.M.; MOURA, L.C.B.; DE ALMEIDA, L.T.G. Preparação e caracterização do complexo de inclusão do óleo essencial de *croton zehntneri* com β -ciclodextrina. **Quim. Nova**, Vol. 37, No. 1, 50-55, 2014.

AIERTZA, M. K., ODRIOZOLA, I., CABAÑERO, G., GRANDE, H. J., LOINAZ, I. Single-chain polymer nanoparticles. **Cell Mol Life Sci.**, v. 69, n.3, p. 337-46, 2012.

ALECSIK, V.; KNEZEVIC, P. Antimicrobial and antioxidative activity of extracts and essential oils of *Myrtus communis* L. **Microbiological Research**. v. 169, p. 240–254, 2014.

ALVES, E.T.S. **Obtenção de nanopartículas poliméricas de PMMA e PU-PMMA pela polimerização em miniemulsão**. Tese de doutorado. Programa de Pós Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2015.

ANKRI, S.; MIRELMAN, D. Antimicrobial properties of allicin from garlic. **Microbes and Infection**, v. 2, p. 125–129. Review. 1999.

APPENDINI, P.; HOTCHKISS, J.H. Immobilization of lysozyme on food contact polymers as potential antimicrobial films. **Packaging Technology and Science**. v. 10, p. 271-279, 1997.

AYALA-ZAVALA, J.F.; SOTO-VALDEZ, H.; GONZÁLEZ-LEON, A.; ÁLVAREZ-PARILLA, E.; MARTÍN-BELLOSO, O.; GONZÁLEZ-AGUILAR, G.A. Microencapsulation of cinnamon leaf (*Cinnamomum zeylanicum*) and garlic (*Allium sativum*) oils in β -cyclodextrin. **J Incl Phenom Macrocycl Chem**. n. 60, p. 359–368., 2008.

BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils – A review. **Food and Chemical Toxicology**, p. 446–475, 2008.

BAKRI, I.M.; DOUGLAS, C.W.I. Inhibitory effect of garlic extract on oral bacteria. **Archives of Oral Biology**. n. 50, p. 645-651, 2005.

BALAGUER, M.P.; LOPEZ-CARBALLO, G.; CATALA, R.; GAVARA, R.; HERNANDEZ-MUNHOZ, P. Antifungal properties of gliadin films incorporating cinnamaldehyde and application in active food packaging of bread and cheese spread foodstuffs. **International Journal of Food Microbiology**. n. 166, p. 369–377, 2013.

BARROS, F.A.R.; STRINGHETA, P.C. Microencapsulamento de antocianinas: Uma alternativa para o aumento de sua aplicabilidade como ingrediente alimentício. **Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento**, n.36, 2006. p.18-24, 2006.

BOAVENTURA, A. O.; CASTRO, A.H.F.; MENDES-COSTA, M.C.; DA SILVEIRA, I.A. **Avaliação das atividades antifúngicas e antibacterianas do cravo-daíndia (*Syzygium aromaticum* L.)**, Anais do CNPq, 20 de Junho 2006, Belo Horizonte-MG;

BRASILEIRO, J.S.L. **Microencapsulação de compostos bioativos: inovação em diferentes áreas**. Mestrado integrado em Ciências Farmacêuticas. Faculdade de Ciências da Saúde. Universidade Fernando Pessoa. Porto, 2011.

BRANDÃO, T.A.S.; MALHEIROS, A.; DAL MAGRO, J.; FILHO, V.C.; YUNES, R.A. Characterization of Sesquiterpene Polygodial-Beta Cyclodextrin Inclusion Complex. **Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry**. n. 46, p.77–81, 2003.

BRESOLIN, C.C. **Modelagem matemática e validação experimental de reações de polimerização em miniemulsão com iniciador organossolúvel**. Programa de Pós Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2013.

BRUGALLI, I. **Alimentação alternativa: a utilização de fitoterápicos ou nutraceuticos como moduladores da imunidade e**

desempenho animal. In: SIMPÓSIO SOBRE MANEJO DE AVES E SUÍNOS, Campinas, p.167-182 2003.

BIKIARIS, D. Can nanoparticles really enhance thermal stability of polymers? Part II: An overview on thermal decomposition of polycondensation polymers. **Thermochimica Acta** 523(1-2), 2011.

BUDAL, R.M. **Estudo de formação de complexos de inclusão em ciclodextrinas.** Tese de Doutorado. Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Santa Catarina, Doutora em Química Orgânica. Florianópolis, 2003.

BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in food – a review. **International Journal of food Microbiology**, v. 94, p. 223-253, 2004.

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

CALSAMIGLIA, S., BUSQUET, M., CARDOZO, P.W., CASTILLEJOS, L., FERRET, A. Invited review: essential oils as modifiers of rumen microbial fermentation. **Journal of Dairy Science**, n. 90, p. 2580-2595, 2007.

CANEVAROLO JR., S.V. **Técnicas de caracterização de polímeros.** 1ª edição. Artliber Editora, São Paulo, 2004.

CEVALLOS, Peggy A.; BUERA, Maria P.; ELIZALDE, Beatriz E. Encapsulation of cinnamon and thyme essential oils components (cinnamaldehyde and thymol) in b-cyclodextrin: Effect of interactions with water on complex stability. **Journal of Food Engineering**. Buenos Aires – Argentina. p. 10-17. 2010.

CHA, D.S.; COOKSEY, K.; CHINNAN, M.S.; PARK, H.J. Release of nisin from various heat pressed and cast films. **Lebensm-Wiss u-Technology**, n. 36, p. 209-213, 2004.

CHAO, S. C., YOUNG, D. G. Screening for inhibitory activity of essential oils on selected bacteria, fungi and viruses. **Journal of Essential Oil Research**, v. 12, 639-649, 2000.

CHAVES, A. V.; HE, M. L.; YANG, W. Z.; HRISTOV, A. N.; MCALLISTER, T. A.; BENCHAAAR, C. Effects of essential oils on proteolytic, deaminative and methanogenic activities of mixed ruminal bacteria. **Canadian Journal of Animal Science**, v. 88, p. 117-122, 2008.

CHEN, F., LOU, D., YANG, J., ZHONG, M. Mechanical and thermal properties of attapulgitic clay reinforced polymethylmethacrylate nanocomposites. **Polymer Advanced Technologies**, v. 22, p. 1912-1918, 2010.

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

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

CHORIANOPOULOS, N.; KALPOUTZAKIS, E.; ALIGIANNIS, N.; MITAKU, S.; NYCHAS, G. J.; end Haroutounian, S. A. Essential oils of *Satureja*, *Origanum*, and *Thymus* species: chemical composition and antibacterial activities against foodborne pathogens. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, n. 52, p. 8261-8267, 2004.

CIMANGA, K., KAMBU, K., TONA, L., APERS, S., BRUYNE, T., HERMANS, N. Correlation between chemical composition and antibacterial activity of essential oils of some aromatic medicinal plants growing in the Democratic Republic of Congo. **Journal of ethnopharmacology**, n. 79, p. 213-220, 2002.

CIOBANU, A.; LANDY, D.; FOURMENTIN, S. Complexation efficiency of cyclodextrins for volatile flavor compounds. **Food Research International**, n. 53 p. 110–114, 2013.

CLSI, Clinical and Laboratory Standards Institute. **Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Test**; Approved Standard-Tenth Edition. Wayne, CLSI document M02-A10, 2009.

CORZO-MARTINEZ, M., CORZO, N., & VILLAMIEL, M. Biological properties of onions and garlic. **Trends in Food Science and Technology**, v. 18, p. 609-625, 2007.

CUNHA-FILHO, Marcílio Sérgio Soares; SÁ-BARRETO, L.C.L. Utilização de ciclodextrinas na formação de complexos de inclusão de interesse farmacêutico. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**. v. 28, n.1, p. 1-9, 2007.

DALMORO, A.; BARBA, A. A.; LAMBERTI, G.; D'AMORE, M. Intensifying the microencapsulation process: Ultrasonic atomization as an innovative approach. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 80, p. 471-477, 2012.

DA ROSA, C.G.; BORGES, C.D.; ZAMBIAZI, R.C.; NUNES, M.R.; BENVENUTTI, E.V.; DA LUZ, S.R.; D'AVILA, R.F.; RUTZ, J.K. Microencapsulation of gallic acid in chitosan, β -cyclodextrin and xanthan. **Industrial crops and products**, v. 46, p.136-148, 2013.

DAWSON, P.L.; HIRT, D.E.; RIECK, J.R.; ACTON, J.C.; SOTTHIBANDHU, A. Nisin release from films is affected by both protein type and film-forming method. **Food Research International**. v. 36, p. 959-968, 2003.

DAVIS, Mark; BREWSTER, Marcus; Cyclodextrin-based pharmaceuticals: past, present and future. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 3, p. 1023, 2004.

DEL VALLE, E.M.M. Cyclodextrins and their uses: a review. **Process Biochem**. 39, p. 1033–1046, 2004.

DELLA-VECCHIA, R. Aplicações sintéticas de lipases imobilizadas em polímeros. **Quím. Nova**, v. 27, n. 4, p.623-630, 2004.

DAWSON, P.L.; HIRT, D.E.; RIECK, J.R.; ACTON, J.C.; SOTTHIBANDHU, A. Nisin release from films is affected by both protein type and film-forming method. **Food Research International**, v. 36, p. 959-968, 2003.

DUCHÊNE, D. **Cyclodextrin and their industrial uses**. Paris: Editions de Santé, 1987.

ECHEGOYEN, Y.; NERIN, C. Performance of an active paper based on cinnamon essential oil in mushrooms quality. **Food Chemistry**, n. 170, p. 30-36, 2015.

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

EL-ZAHER, N.A.; MELEGY, M.S.; GUIRGUIS, O.W. Thermal and structural analyses of PMMA/TIO₂ nanoparticles composites. **Natural Science**, 6, 859-870, 2014.

EMIROGLU, Z. K., YEMIS, G. P., COSKUN, B. K., end CANDOGAN, K. Antimicrobial activity of soy edible films incorporated with thyme and oregano essential oils on fresh ground beef patties. **Meat Science**, v. 86, p. 283-288, 2010.

ESCOBAR, R. G. Eugenol: propiedades farmacológicas y toxicológicas. Ventajas y desventajas de su uso. **Rev. Cub. Estomatol.**, v.39, n.2, p.139-156, 2002.

EVANGELISTA, B.A.L. **Caracterização, análise físico-química e estabilidade térmica do complexo de inclusão clicodextrina-17-valerato de betametasona**. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Farmácia. São Paulo, 2010.

FAVARO-TRINDADE, C.S.; PINHO, S.C.; ROCHA, G.A. Revisão: Microencapsulação de ingredientes alimentícios. **Braz. J. Food Technol.**, v. 11, n. 2, p. 103-112, 2008.

FIORI, M. A.; PAULA, M. M. S.; BERNARDIN, A. M.; RIELLA, H. G. e ANGIOLETTO, E. **Materials Science and Engineering C** , p. 1–5, 2009.

FEUSER, P.E., GASPAR, P.C., NELE, M., TEDESCO, A.C., SILVA, M.C.S., RICCI, E., SAYER, C., ARAUJO, P.H.H. Synthesis and characterization of poly(methyl methacrylate) PMMA and evaluation of

cytotoxicity for biomedical application. **Macromol. Symp.**, v. 343, p. 65–6, 2014.

FEUSER, P.E., BUBNIAK, L. S., SILVA, M.C.S., VIEGAS, A.C., FERNANDES, A.C., RICCI, E., NELE, M., TEDESCO, A.C., SAYER, C., ARAUJO, P.H.H. Encapsulation of magnetic nanoparticles in poly(methylmethacrylate) by miniemulsion and 175 evaluation of hyperthermia in U87MG cells. **Eur. Polym. J.**, v. 68, p. 355–365, 2015.

FOLCH-CANO, C., GUERRERO, J., SPEISKY, H., JULLIAN, C.; OLEA-AZAR, C. NMR and molecular fluorescence spectroscopic study of the structure and thermodynamic parameters of EGCG/-cyclodextrin inclusion complexes with potential antioxidant activity. **Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry**. v. 78, p.287-298, 2013.

FONSECA, L. B., NELE, M., VOLPATO, N. M., SEICEIRA, R. C., PINTO J. C. Production of pmma nanoparticles loaded with praziquantel through in situ miniemulsion polymerization. **Macromol. React. Eng.** v. 7, p. 54–63, 2013.

FREITAS, M. R; ALBUQUERQUE, M.M.; ROLIM, L.; SOBRINHO, J.L.S. Inclusion complex of methyl- β -cyclodextrin and olanzapine as potential drug delivery system for schizophrenia. **Carbohydrate Polymers**, v. 89, p.1095-1100, 2012.

FURUTA, T.; YOSHII, H. Release characteristics of allyl isothiocyanate encapsulated in cyclodextrins. Proceedings of 10th International Cyclodextrin Symposium, Michigan, p. 553-558, 2000.

GAO, M. S.; FENG, L. F.; JIANG, T. J. Browning inhibition and quality presser vation of button mushroom (*Agaricus bisporus*) by essential oils fumigation treatment. **Food Chemistry**, v. 149, p. 107-113, 2014

GITERU, S. G., COOREY, R., BERTOLATTI, D., WATKIN, E., JOHNSON, S., end FANG, Z. X. Physicochemical and antimicrobial properties of citral and quercetin incorporated kafirin-based bioactive films. **Food Chemistry**, v. 168, p. 341-347, 2015.

GOUIN, S. Microencapsulation: industrial appraisal of existing technologies and trends. **Trends Food Sci. Technol.**, v. 15, p.330–347, 2004.

GUEDES, Francimary de Lima; ALVES, Geisiane Maria Cavalcante; SANTOS, Fabiana Lícia Araújo dos; LIMA, Larissa Fantini de; ROLIM, Larissa Araújo; NETO, Pedro José Rolim. Ciclodextrinas: como adjuvante tecnológico para melhorar a biodisponibilidade de fármacos. **Revista Brasileira de Farmacologia**. n. 89, v. 3, p. 220-225, 2008.

GUO, P.; SU, Y.; CHENG, Q.; PAN, Q.; LI H. Crystal structure determination of the β -cyclodextrin–p aminobenzoic acid inclusion complex from powder X-ray diffraction data. **Carbohydr Res**. v. 346, p. 986–90, 2011.

GUPTA, K.C.; VISWANATHAN, R. Combined action of streptomycin and chloramphenicol with plant antibiotics against tubercle bacilli. I. Streptomycin and chloramphenicol with cepharanthine. II. Streptomycin and allicin, **Antibiot. Chemother**. v. 5, p. 24–27, 1995.

HAN, J.H. **Antimicrobial food packaging**. In: Ahvenainen R (Ed.) *Novelfood packaging techniques*. Washington, CRC Press. p. 69-89, 2003.

HANCI, Volkan; VURAL, Ahmet; HANCI, Sevgi Yilmaz; KIRAZ, Hasan Ali; OMUR, Dilek; UNVER, Ahmet. Avaliação in vitro das características antimicrobianas de sugamadex. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, 64 (2), p.105-108. 2014.

HĂDĂRUGĂ, N.G.; HĂDĂRUGĂ, D.I.; BANDUR, G.N.; RIVIS, A.; PÂRVU, D.; LUPEA, A.X. Protection and controlled release of fatty acids and essential oils by nanoencapsulation in cyclodextrins (a review). *Journal of Agroalimentary Processes and Technologies*, 14(2), p. 381-389, 2008.

HIGUCHI, T.; CONNORS, K. A. **Phase-solubility techniques**. In: *Advances in Analytical Chemistry and Instrumentation*. New York: Wiley, v.4, p.117-212, 1965.

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

HIRAYAMA, F.; UEKAMA, K. Cyclodextrin-based controlled drug release system. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 36. n.1, p. 125-141, 1999.

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

INDU, M. N.; HATHA, A. A. M.; ABIROSH, C.; HARSHA, U.; VIVEKANANDAN, G. Antimicrobial activity of some of the South-Indian spices against serotypes of *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Listeria monocytogenes* and *Aeromonas hydrophila*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 37, n. 2, p.153-158, 2006.

JÚNIOR, A.A.S. **Micropartículas biodegradáveis para liberação prolongada intraocular de fármacos**. Dissertação de mestrado. Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, Araraquara, 2005,

KAMEL, C. A novel look at a classic approach of plants extracts. **Feed Mix**, v.9, n.6, p. 19-24, 2000.

KAMIMURA, J.A.; SANTOS, E.H.; HILL, L.E.; GOMES, C.L. Antimicrobial and antioxidante activities of carvacrol microencapsulated in hidroxypropyl-beta-ciclodextryn. **Food Scienc and Technology**, v. 57, p. 701-709, 2014.

KARATHANOS, V. T., MOURTZINOS, I., YANNAKOPOULOU, K., ANDRIKOPOULOS, N. K. Study of the solubility, antioxidant activity, and structure of inclusion complex of vanillin with beta-cyclodextrin. **Food Chemistry**, 101(2), p.652-658, 2007.

KATZUNG, B.G. **Farmacologia: básica e clínica**. 9ª. Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. 1068 p.

KIM, J.M.; MARSHALL, M.R.; WEI, C.I. Antibacterial activity of some essential oil components against five foodborne pathogens. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 43, n.11, p.2839-2845, 1995.

LI, Q., MISHRA, A.K., KIM, N.H., KUILA, T., LAU, K.-T., LEE, J.H. Effects of processing conditions of poly(methylmethacrylate) encapsulated liquid curing agent on the properties of self-healing composites. **Composites Part B: Engineering**, v.49, n.0, p.6-15, 2013.

LIANG, H.; YUAN, Q.; VRIESEKOOP, F.; LV, F.. "Effects of cyclodextrins on the antimicrobial activity of plant-derived essential oil compounds". **Food Chemical**. n.135, p. 1020-1027, 2012.

LYRA, M.A.M.; ALVES, L.D.S.; FONTES, D.A.F.; SOARES-SOBRINHO, J.L.; ROLIM-NETO, P.J. Ferramentas analíticas aplicadas à caracterização de complexos de inclusão fármacociclodextrina. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, 31(2), p.117-124, 2010.

LOFTSSON, T.; BREWSTER, M. E. Pharmaceutical Applications of Cyclodextrins. Drug Solubilization and Stabilization. **J. Pharm. Sci.**, v. 85, n. 10, p.1017-1025, 1996.

LOKENS GARD, E. **Plásticos industriais: Teoria e aplicações**. São Paulo: Cengage Learning, 2013.

LORCA, B.S.S., BESSA, E.S., NELE, M., SANTOS, E.P., PINTO, J.C. Preparation of PMMA Nanoparticles Loaded with Benzophenone-3 through Miniemulsion **Polymerization**. **Macromol. Symp.**, v. 319, p. 246–250, 2012.

LLORENS, A.; LLORET, E.; PICOUET, P.A.; TRBORJEVICH, R.; FERNANDEZ, A. Metallic-based micro and nanocomposites in food contact materials and active food packaging. **Trends in Food Science & Technology**, v. 24, n.1, p. 19-29, 2012.

LUCAS, E.F.; OLIVEIRA, C.M.F.; PORTER, R.S. Estudo da degradação térmica de copolímeros graftizados de poli (metacrilato de

metila) e poli (óxido etileno-b-óxido de propileno). **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, 1993.

MARQUES, H.M.C. A review on cyclodextrin encapsulation of essential oils and volatiles. **Flavour and Fragrance Journal**. v. 25, p. 313-326, 2010.

MARTINS, E.R.; CASTRO, D.M.; CASTELANI, D.C et al. **Plantas medicinais**. Viçosa, MG: UFV, 2000. 220p.

MANRICH, S. **Processamento de termoplásticos: rosca única, extrusão e matrizes, injeção e moldes**. São Paulo: Artliber Editora, 2005.

MATIOLI, G.; RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. Microencapsulação do licopeno com ciclodextrinas. **Ciênc. Tecnol. Aliment**, v. 23, p.102-105, 2003.

MENDES, A. N., HUBBER, I., SIQUEIRA, M., BARBOSA, G. M., MOREIRA, D. L., HOLANDINO, C., J. C., PINTO, NELE, M. Preparation and cytotoxicity of poly(methylmethacrylate) nanoparticles for drug encapsulation. **Macromol. Symp**. v. 319, p.34–40, 2012.

MENDES, A.N. **Avaliação das propriedades físico-químicas e interfaciais de biossurfactantes para aplicação de formulação de nanoemulsões**. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ, Rio de Janeiro, 2012.

MELO, A.A.M. **Efeito do filme ativo incorporado com óleo essencial de alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) na conservação de carne resfriada de frango**. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Universidade Federal de Goiás, 2010.

MAHMOUD, S. S.; CROTEAU, R. B. Strategies for transgenic manipulation of monoterpene biosynthesis in plants. **Trends in Plant Science**, v.7, p.366-373, 2002.

MONTEIRO, O.S. **Caracterização do óleo essencial da Pimenta dioica LINDL e sua aplicação como atrativo de abelhas *Euclossina***. Tese de doutorado. (Doutorado em química orgânica). Universidade Federal da Paraíba. João Pessoa: PB, 2008.

MORAIS, S. M.; CAVALCANTI, E. S. B.; COSTA, S. M. O.; AGUIAR, L. A. Ação antioxidante de chás e condimentos de grande consumo no Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, p.315-320, 2009.

MUNOZ-BONILLA, A.; FERNANDEZ-GRACIA, M. Polymeric materials with antimicrobial activity. **Progress in Polymer Science**. v. 72, p. 281-339, 2012.

National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Information supplement 15th M100-S15. Wayne. PA: NCCLS/CLSI, 2005/CLSI, 2005.

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

OETTING, L.L. **Extratos vegetais como promotores do crescimento crescimentos de leitões recém-desmamados.** Tese de doutorado em Agronomia. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, São Paulo, 2005.

OLIVEIRA, L.M.; OLIVEIRA, P.A.P.L.V. Revisão: Principais agentes antimicrobianos utilizados em embalagens plásticas. **Brazilian Journal of Food Technology**, p. 161-165, 2004.

OTERO, ESPINAR, F.J.; ANGUIANO IGEEA, S.; BLANCO MENDEZ, J.; VILA JATO, J.L. Reduction in the ulcerogenicity of naproxen by complexation with β -cyclodextrin. **Int. J.Pharm.**, v.70, p.35-41, 1991.

OUSSALAH, M.; CAILLET, S.; SAUCIER, L.; LACROIX, M. Inhibitory effects of selected plant essential oils on the growth of four pathogenic bacteria: *E. coli* O157:H7, *Salmonella Typhimurium*, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*. **Food Control**. v. 18, p. 414-20, 2007.

PAN, K., CHEN, H., DAVIDSON, P. M., ZHONG, Q. Thymol nanoencapsulated by sodium caseinate: physical and anti-listerial properties. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 62, p. 1649-1657, 2014.

PARRAS, C., GONZALES, G., ALBANO, C. Synthesis of PMMA by high frequency ultrasound. **Microscopy and Microanalysis**, v. 11, p. 2040-2041, 2005.

PEREIRA, C.A.M.; MAIA, J.F. Estudo da atividade antioxidante do extrato e do óleo essencial obtidos das folhas de alfavaca (*Ocimum gratissimum* L.). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.27, n.3 p.624-632, 2007.

PEREIRA, A.A.; CARDOSO, M.G.; ABREU, L.R.; MORAIS, A.R.; GUIMARÃES, L.G.L.; SALAGADO, A.P.S.P. Caracterização química e efeito inibitório de óleos essenciais sobre o crescimento de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 32, p. 887-893, 2008.

PINHO, E.; GROOTVELD, M.; SOARES, G.; HENRIQUES, M. Cyclodextrins as encapsulation agents for plant bioactive compounds. **Carbohydrate Polymers**, v.101, p.121–135, 2014.

PNR, N.; HENRY, S.; CANO, V.; VERA, J. Microbial status of apical root canal system of human mandibular first molars with primary apical periodontitis after “one-visit” endodontic treatment. **Oral Surg. Med. Path. Radiol. Endodont.** v.99 p.231-252, 2005.

PRABU, S.; SWAMINATHAN, M.; KRISHNAMOORTHY, S.; SIVAKUMAR, K.; RAJAMOCHAN, R. Preparation, Characterization and molecular modeling studies of the inclusion complex of Caffeine with Beta-cyclodextrin. **Journal of Molecular Structure**. 2015.

OUATTARA, B.; SIMARD, R. E.; HOLLEY, R. A.; PIETTE, G. J.-P.; BÉGIN, A. Antibacterial activity of selected fatty acids and essential oils against six meat spoilage organisms. **International Journal of Food Microbiology**, v. 37, p. 155-162, 1997.

QUINTAVALLA, S.; VICINI, L. Antimicrobial food in meat industry. **Meat Science**, v. 62, p.373-380, 2002.

RAJEWSKI, R.A.; STELLA, V.J. Pharmaceutical Applications of Cyclodextrins. In Vivo Drug Delivery. **J. Pharm. Sci.**, v.85, n.11, p.1142-1168, 1996.

RAVICHANDRAN, M.; HETTIARACHCHY, N. S.; GANESH, V.; RICKE, S. C.; SINGH, S. Enhancement of antimicrobial activities of naturally occurring phenolic compounds by nanoscale delivery against *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* Typhimurium in broth and chicken meat system. **Journal of Food Safety**, v.31, p.462-471, 2011.

RISCH, S.J.; REINECCIUS, G.A. Encapsulation and controlled release of food ingredients. Washington, DC: **American Chemical Society (ACS)**, 1995, 214 p.

ROCHA, M. V. J. **Propriedades estruturais e térmicas do híbrido orgânico/inorgânico PMMA-óxido de ferro: um estudo teórico e experimental**. Tese (Doutorado em Agroquímica) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2013.

ROHANI, S.M.R.; MORADI, M.; MEHDIZADEH, T.; SAEI-DEHKORDI, GRIFFITHS, M.W. The effect of nisin and garlic (*Allium sativum* L.) essential oil separately and in combination on the growth of *Listeria monocytogenes*. **LWT - Food Science and Technology**, v. 44, p. 2260-2265, 2011.

ROSS, Z. et al. Antimicrobial properties of garlic oil against human enteric bacteria: evaluation of methodologies and comparisons with garlic oil sulfides and garlic powder. **Appl Environ Microbiology**, v. 67, n. 1, p. 475-80, 2001.

SAJEESH, S.; SHARMA, C. P. Poly (metacrylic acid)-alginate semi-IPN microparticles for oral delivery of insulin: a preliminary investigation. **J. Biomat. Appli.** v. 19, p.35-45, 2004.

SAJEESH, S.; SHARMA, C. P. Interpolymer complex microparticles based on poly (metacrylic acid)-chitosan for oral insulin delivery. **J Appli. Poly. Sci.**, v. 99, p. 506-512, 2006.

SALVIA-TRUJILLO, L.; ROJAS-GRAÜ, A.; SOLIVA-FORTUNY, R.; MATÍN-BELLOSO, O. Physicochemical characterization and antimicrobial activity of food grade emulsions and nanoemulsions incorporating essential oils. **Food Hydrocolloids**, v. 43, p. 547-556, 2015.

SANTOS, J. C. **Avaliação do efeito antimicrobiano de óleos essenciais sobre micro-organismos patogênicos em vôngole (*Anomalocardia brasiliana*)**. Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos da Universidade Federal da Bahia. Dissertação de Mestrado. 2010.

SANTOS, J. C.; CARVALHO FILHO, C. D.; BARROS, T. F.; GUIMARÃES, A. G. Atividade antimicrobiana in vitro dos óleos essenciais de orégano, alho, cravo e limão sobre bactérias patogênicas isoladas de vôngole. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 32, n. 4, p.1557-1564, 2011.

SEO, E.; MIN, S.; CHOI, M. Release characteristics of freeze-dried eugenol encapsulated with beta-cyclodextrin by molecular inclusion method. **Journal of Microencapsulation**, v. 27, n.6, p.496-505, 2010.

SINGH, M.; SHARMA; R.; BANERJEE, U.C. Biotechnological applications of cyclodextrins. **Biotechnol Adv.** 20, p. 341–359, 2002.

SILVA, T. C.; OLIVEIRA, J.R.; SOUZA, S.J.O. Extração de Eugenol a Partir do Cravo da Índia e Produção de Sabonetes Aromatizados. **Revista Crase.edu: A revista do e-Tec Brasil**, v. 1, n. 1, 2011.

SILVESTRI, J.D.F.; PAROUL, N.; CZYEWski, E.; LERIN, L.; ROTAVA, I.; CANSIAN, R.L.; MOSSI, A.; TONIAZZO, G.; OLIVEIRA, D.; TREICHEL, H. Perfil da composição química e atividades antibacteriana e antioxidante do óleo essencial do cravo-da-Índia (*Eugenia caryophyllata* Thunb.). **Revista Ceres**. v. 57, n.5, p. 589-594, 2010.

SHAHIDI, F.; HAN, X.Q. Encapsulation of food ingredients. **Critical reviews and Food Science and Nutrition**, v. 33, n.6, p. 501-547, 1995.

SKOOG, D. A., WEST, D. M., HOLLER, F. J., **Fundamental of Analytical Chemistry**, 6ª ed., Forth Worth: Saunders College, 1991.829 p.

SMITH-PALMER, A.; STEWART, J.; FYFE, L. Antimicrobial properties of plant essential oils and essences against five important food-borne pathogens. **Letters in Applied Microbiology**, v. 26, p. 118-122, 1998.

SOARES, N.F.F.; SILVA, W.A.S.; PIRES, A.C.S.; CAMILLOTO, G.P.; SILVA, P.S. Novos desenvolvimentos e aplicações de embalagens de alimentos. **Revista Ceres**, n.54, v.4, p.370-378, 2009.

SOARES, Lillian Amélia. **Preparação e caracterização do complexo de inclusão do 4-nerolidilcatecol de Pothomorphe umbellata (piperaceae) em 2-hidroxipropil-B-ciclodextrina**. Dissertação de mestrado. Programa de pós-graduação em ciências farmacêuticas - Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Goiás, 2007.

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

SUNG, S.Y. SIN, L.T.; TEE, T.T.; BEE, S.T.; RAHMAT, A.R.; RAHMAN, W.A.W.A. Control of bacteria growth on ready-to-eat beef loaves by antimicrobial plastic packaging incorporated with garlic oil. **Food Control**, v. 39, p. 214-221, 2014.

SZEJTLI, J. Introduction and General Overview of Cyclodextrin Chemistry. **In: Chem. Rev.**,v. 98, p. 1743-1753, 1998.

TAKAHASHI, Keiko. Organic reactions mediated by cyclodextrins. **Chemical Reviews**, Japan, v. 98, n. 5, p. 2013-2034.

TEIXEIRA, B.; MARQUES, A.; PIRES, C.; RAMOS, C.; BATISTA, I.; SARAIVA, J.A.; Nunes, M.L. Characterization of fish protein films incorporated with essential oils of clove, garlic and origanum: Physical, antioxidant and antibacterial properties. **LWT - Food Science and Technology**, v. 59, p. 533-539, 2014.

THIES, Curt. How to make microcapsules. Combined lecture and laboratory manual. **This Technology**, 20044.

TIWARI, S.; GOEL, A.; JHA, K.K.; SHARMA, A. Microencapsulation techniques and its application: a review. **The Pharma Research**, v. 3, n.12, p. 112-116,

TIPPAYATUM, P.; CHONHENCHOB, V. Antibacterial activities of thymol, eugenol and nisin against some food spoilage bacteria. **National Science**. v. 41, p. 319-23, 2007.

TOMMASINI, S., RANERI, D., FICARRA, R., CALABRO, M. L., STANCANELLI, R., Ficarra, P. Improvement in solubility and dissolution rate of flavonoids by complexation with cyclodextrin. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, 35, p. 379-387, 2004.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B.R.; CASE, C.L. **Microbiologia**. 8. Ed.: Porto Alegre: Artmed, 2005. 894 p.

TRAJANO, V.N.; LIMA, E.O.; SOUZA, E.L.; Travassos, A.E.R. Propriedade antibacteriana de óleos essenciais de especiarias sobre bactérias contaminantes dos alimentos. **Ciência e Tecnologia Alimentar**, v. 29, n.3, p. 542-545, 2009.

TURASAN, H.; SARIN, S.; SUMNU, G. Encapsulation of rosemary essential oil. **LWT - Food Science and Technology**, v. 64, p. 112-119, 2015.

UCHEGBU, I. F., SCHATZLEIN, A. G. **Polymers in drug delivery. Selecting the right polymer for biomaterial application**. 1ª ed. CRC Taylor e Francis Group, 2006.

VEIGA, F.; PECORELLI, C.; RIBEIRO, L.; As ciclodextrinas em tecnologia farmacêutica, **Minerva Coimbra**: Coimbra, 2006.

VILLANOVA, J. C. O.; ORÉFICE, R. L.; CUNHA, A. S. Aplicações farmacêuticas de polímeros. **Polímeros**, v. 20, n. 1, p.51-64, 2010.

ZHAN, Q.F.; JIANG, Z.T.; LI, R. Complexation of allyl isothiocyanate with β -cyclodextrin and its derivatives and molecular microcapsule of allyl

isothiocyanate in β -cyclodextrin. **Eur Food Res Technol**, v. 413, p. 407–413, 2007.

ZHAN, H.; JIANG, Z.T.; WANG, Y.; LI, R.; DONG, T.S. Molecular microcapsules and inclusion interactions of eugenol with β -cyclodextrin and its derivatives. **Eur Food Res Technol**, v. 227, p. 1507–1513, 2008.

ZORNIO, Clarice Fedosse. **Preparação e caracterização do complexo de inclusão beta-ciclodextrina/(Z)-jasmona e da fibra de algodão enxertada com beta-ciclodextrina**. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Físicas e Matemáticas, Programa de Pós-graduação em Química. Florianópolis, 2013.

ZHAO, Q.; SAMULSKI, E.T. A comparative study of poly(methyl methacrylate) and polystyrene/clay nanocomposites prepared in supercritical carbon dioxide. **Polymer**, v. 47, p.663–671, 2006.

WALSH, S. E., MAILLARD, J. Y., RUSSELL, A., CATRENICH, C., CHARBONNEAU, D.; BARTOLO, R. Activity and mechanisms of action of selected biocidal agents on Gram-positive and -negative bacteria. **Journal of Applied Microbiology**, v. 94, n. 2, p. 240-247, 2003.

WANG, T.; LI, B.; SI, H.; LIN, L.; CHEN, L. Release characteristics and antibacterial activity of solid state eugenol/ β -cyclodextrin inclusion complex. **J Incl Phenom Macrocycl Chem**, v. 71, p.207–213, 2011.

WANG, J.; CAO, Y.; SUN, B.; WANG, G. Physicochemical and release characterisation of garlic oil- β -cyclodextrin inclusion complexes. **Food Chemistry**, v. 127, p.1680–1685, 2011.

WHORTON, C. **Factors influencing volatile release from encapsulation matrices**. In: Encapsulation and Controlled Release of food Ingredients. Risch, S. J. And Reineccius, G. A., Eds., American Chemical Society, Washington, DC, p.134 – 142, 1995.

WHORTON, C., REINECCIUS, G.A. Evaluation of the mechanisms associated with the release of encapsulated flavor materials from maltodextrin matrices. **ACS Symp.** v.590, p. 143–160, 1995.

WU, Y.; LUO, Y.; WANG, Q. Antioxidant and antimicrobial properties of essential oils encapsulated in zein nanoparticles prepared by liquid-liquid dispersion method. **Food Science and Technology**, v. 48, p. 283-290, 2012.

YAM, K.L.; TAKHISTOV, P.T.; MILTZ, J. Intelligent packaging: concepts and applications. **Journal of Food Science**, v.70, n.1, p. R1-R10, 2005.

YE, C.H.; DAI, D.H.; HU, W.L. Antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil from onion (*Allium cepa* L.). **Food Control**, v. 30, p.48-53, 2013.