

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS**  
**Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel**  
**Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos**



Tese

**Encapsulação do óleo essencial de laranja em  $\beta$ -ciclodextrina: Ação antifúngica e aplicação em bolos**

**Dianini Hüttner Kringel**

Bacharel em Química de Alimentos

Mestre em Engenharia e Ciência de Alimentos

Pelotas, 2019.



**Dianini Hüttner Kringel**

**Encapsulação do óleo essencial de laranja em  $\beta$ -ciclodextrina: Ação antifúngica e aplicação em bolos**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do Título de Doutor em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Comitê de orientação: Prof. Dr<sup>a</sup>. Elessandra da Rosa Zavareze - UFPel  
Prof. Dr. Alvaro Renato Guerra Dias - UFPel  
Prof. Dr. Loong-Tak Lim – University of Guelph (UoG)  
Dr<sup>a</sup>. Martha Zavariz de Miranda (Embrapa-Trigo)

Pelotas, 2019.

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas  
Catalogação na Publicação

K89e Kringel, Dianini Hüttner

Encapsulação do óleo essencial de laranja em  $\beta$ -ciclodextrina: Ação antifúngica e aplicação em bolosolos / Dianini Hüttner Kringel ; Elessandra da Rosa Zavareze, orientador ; Alvaro Renato Guerra Dias, Martha Zavariz de Miranda, coorientadores. — Pelotas, 2019.

176 f.

Tese (Doutorado) — Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, 2019.

1. Encapsulação. 2. Óleo essencial de laranja. 3. Ciclodextrinas. 4. Aspergillus. 5. Bolos. I. Zavareze, Elessandra da Rosa, orient. II. Dias, Alvaro Renato Guerra, coorient. III. Miranda, Martha Zavariz de, coorient. IV. Título.

CDD : 664

Banca examinadora:

Dr<sup>a</sup>. Martha Zavariz de Miranda – Embrapa Trigo

Prof. Dr. Eliezer Ávila Gandra – CCQFA/UFPel

Dr<sup>a</sup> Inajara Beatriz Brose Piotrowicz – DCTA/UFPel

Prof. Dr. Alvaro Renato Guerra Dias – DCTA/UFPel

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Elessandra da Rosa Zavareze – DCTA/UFPel (Orientadora)



## Agradecimentos

À Deus, pelo dom da vida, por iluminar meu caminho com oportunidades e pessoas que permitiram que eu chegasse até aqui, e também pelos obstáculos, que me fizeram crescer.

À minha família, em especial à minha mãe Luciara e ao meu padrasto Luiz, as pessoas mais importantes da minha vida, meus maiores incentivadores, pelo amor, carinho e apoio e por renunciar de tantas coisas para me deixar a maior herança, o estudo. À minha avó Revena (em memória) que hoje cuida de mim lá do Céu, guiando meus passos! Obrigada por todo o amor e por me incentivar a buscar meus sonhos!

Ao meu namorado e grande apoiador Gustavo, por todo o amor, carinho e apoio em todos os momentos, por acreditar em mim mais do que eu mesma, e por tornar meus dias mais felizes.

A minha orientadora Elessandra Zavareze, pessoa por quem tenho grande admiração. Agradeço por todos os ensinamentos, tanto profissionais quanto pessoais, mas acima de tudo agradeço pela confiança depositada em mim. Você é uma pessoa iluminada, que ama o que faz e transmite isso aos seus alunos da melhor forma possível. Ao meu co-orientador Álvaro Guerra Dias, pela confiança e pelos conhecimentos que me transmitiu ao longo do desenvolvimento deste trabalho. Além dos momentos de descontração proporcionados, o que tornou essa caminhada muito mais agradável.

A minha co-orientadora Martha Zavariz de Miranda, da Embrapa-Trigo, pela disponibilidade, atenção e conhecimentos transmitidos.

À minha amiga Shanise Halal, sempre disposta a ajudar, contribuiu muito na realização desse trabalho. Obrigada por estar ao meu lado durante toda essa jornada, compartilhando momentos de alegria e me apoiando nos momentos difíceis, tenho certeza que construímos uma amizade para a vida toda!

À minha amiga Bárbara Biduski, obrigada por todo auxílio na execução deste projeto, mas mais do que isso, obrigada pelo carinho e apoio durante o período em que estive no Canadá. Você e o Augusto foram mais do que amigos, foram minha família lá!

Ao meu amigo Wyller, pela amizade sincera, pelos momentos de descontração, e por alegrar meu dia-a-dia. Obrigada também pela importantíssima ajuda nas tarefas diárias e nos momentos de dificuldade!

À minha amiga Júlia Baranzelli, que me apoiou desde o início deste projeto, seja com o auxílio nas atividades ou com sua motivação diária. Pessoa por quem tenho enorme carinho e agradecimento.

Ao professor Loong-Tak Lim, da University of Guelph, pela oportunidade de fazer meu doutorado sanduíche em seu laboratório, por ter me recebido com tanto carinho e pela orientação neste projeto. Obrigada também a todos os colegas do Packaging Lab, pela paciência comigo no idioma e por todo carinho que me foi concedido. Foi um grande aprendizado em minha vida!

Aos amigos que conquistei no Canadá, dos quais sinto muita saudade e sou imensamente grata por todo carinho: Carla, Art, Gleydson, Juan, Miguel, Flavia e Pedro. Sou eternamente grata à Deus por ter colocado todos vocês no meu caminho!

Às amigas Rosana e Vânia, pela amizade, por toda ajuda neste trabalho e por terem acreditado nele nas vezes em que nada parecia dar certo! Rosana, obrigada pelas ciclodextrinas!

Aos demais colegas do LabGrãos e aos estagiários, em especial ao João, Thauna e Maiara, pela ajuda, amizade e momentos divertidos que compartilhamos.

Ao professor Roger Wagner e a doutoranda Bruna Klein, do Laboratório de Cromatografia da UFSM, pela imprescindível ajuda nas análises de voláteis e pelo carinho com que me receberam. A Jéssie Schöffner, pela fundamental ajuda na análise cromatográfica das ciclodextrinas. À Juliana Lemões e a Nathalie Lopes pelo “transporte” das amostras inúmeras vezes para Porto Alegre. À Stefanie e a Márcia do Centro de Diagnóstico e Pesquisa em Micologia Veterinária, pela ajuda nas análises de atividade antifúngica do OEL.

Ao pesquisador da Embrapa, Roberto Pedroso de Oliveira, pelas amostras de laranja concedidas e pela disponibilidade em participar deste projeto.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, pela colaboração e oportunidade concedida.

Ao Projeto CAPES-Embrapa pelo apoio financeiro indispensável para a execução do projeto.

## Resumo

Kringel, Dianini Hüttner. **Encapsulação do óleo essencial de laranja em  $\beta$ -ciclodextrina: Ação antifúngica e aplicação em bolos**. 2019. 176 f. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, 2019.

Este trabalho foi dividido em cinco estudos. Com o primeiro estudo objetivou-se estabelecer as melhores condições na formação e estabilidade de complexo de inclusão entre ciclodextrinas (CDs) e óleo essencial de laranja (OEL) pela técnica de co-precipitação, utilizando a  $\beta$ -ciclodextrina comercial ( $\beta$ -CD). Os complexos de inclusão foram avaliados quanto à sua composição química, morfologia, estabilidade térmica e análise de compostos voláteis. A perda lenta dos compostos voláteis do óleo essencial, quando complexado com  $\beta$ -CD, mostrou maior estabilidade em comparação com sua mistura física e com a sua forma livre. Portanto, os resultados mostraram que o uso da  $\beta$ -CD na formação de complexos de inclusão com óleo essencial de laranja pode expandir para potenciais aplicações em alimentos. No segundo estudo objetivou-se produzir CDs a partir de amido de trigo germinado e não germinado, para encapsulação de OEL e avaliar a estabilidade térmica do complexo de inclusão formado. O complexo de inclusão formado entre CDs/OEL melhorou a estabilidade térmica do OEL, promovendo sua proteção em altas temperaturas. Apesar do resultado promissor, a dificuldade em separar as ciclodextrinas e os açúcares redutores da solução e o baixo rendimento obtido, inviabilizou a utilização destas nas seguintes etapas. Sendo assim, optou-se por utilizar a ciclodextrina comercial, que apresentou resultados satisfatórios no primeiro estudo. Com o terceiro estudo objetivou-se avaliar o efeito do processo utilizado (*electrospinning* ou *electrospraying*) na eficiência de encapsulação do OEL. O processo de *electrospinning* mostrou-se mais eficiente para a encapsulação do OEL, com alta eficiência de encapsulação (75-90%). No quarto estudo, foi avaliada a atividade antifúngica *in vitro* do OEL contra seis isolados de *Aspergillus* spp. bem como a atividade antifúngica *in situ* do OEL, na forma livre e encapsulada, em bolos. Os resultados mostraram que o OEL aumentou a estabilidade microbiológica de bolos, atrasando a contaminação fúngica de 30 para 150 dias. No último estudo, o OEL na forma livre e encapsulado em  $\beta$ -ciclodextrina foi aplicado em pré-misturas de bolo, as quais foram armazenadas por 6 meses. Os bolos obtidos a partir destas pré-misturas foram avaliados no tempo zero e após 3 e 6 meses de armazenamento. O bolo com  $\beta$ -CD/OEL apresentou maior volume após armazenamento da respectiva pré-mistura por 6 meses; menor dureza e menor percentual de amido hidrolisado após digestibilidade *in vitro*. Por outro lado, na análise sensorial, o bolo com OEL livre foi o preferido por 60% dos julgadores.

**Palavras-chave:** encapsulação, óleo essencial de laranja, ciclodextrinas, *Aspergillus*, bolos.



## Abstract

Kringel, Dianini Hüttner. **Encapsulation of orange essential oil in  $\beta$ -cyclodextrin: Antifungal action and application in cakes.** 2019. 176 f. Thesis (PhD degree in Food Science and Technology) – Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, 2019.

This work was divided into five studies. The first study was performed to establish the best conditions in the formation and stability of inclusion complex between cyclodextrins (CDs) and orange essential oil by the co-precipitation technique, using the commercial  $\beta$ -cyclodextrin ( $\beta$ -CD). Inclusion complexes were evaluated for their chemical composition, morphology, thermal stability and analysis of volatile compounds through the headspace technique. The slow loss of the essential oil volatile compounds, when complexed with  $\beta$ -CD, showed greater stability compared to its physical mixture and its free form. Therefore, the results showed that the use of  $\beta$ -CD in the inclusion complexes with orange essential oil formation can expand to potential applications in foods. In a second study, the objective was to produce CDs from germinated wheat starch for encapsulation of orange essential oil and evaluation of the thermal stability of the inclusion complex formed. The germination increased the enzymatic activity of all the samples, as well as a greater production of cyclodextrins. In addition, the inclusion complex formed between CDs/OEL significantly improved the thermal stability of the orange essential oil, promoting its protection at high temperatures. Despite the promising result, the difficulty to separate the cyclodextrins and the reducing sugars from the solution and the low yield obtained, prevented the use of these in the following steps. Therefore, it was decided to use the commercial cyclodextrin, which presented satisfactory results in the first study. The third study aimed evaluated the effect of the process used (electrospinning or electrospraying) on the efficiency of encapsulation of orange essential oil was evaluated, where the electrospinning process proved to be more efficient for the encapsulation of the orange essential oil with high encapsulation efficiency. . In the fourth study *in vitro* antifungal activity of orange essential oil (OEL) was evaluated against six isolates of *Aspergillus* spp. was evaluated, as well the *in situ* antifungal activity of OEL, in free form and encapsulated, in cakes. The results showed that OEL ncreased the microbiological stability of cakes, delaying the fungal contamination of the cakes from 30 to 150 days. In the latter study, the free OEL and encapsulated in  $\beta$ -cyclodextrin was applied to cake pre-mixtures, which were stored for 6 months. The cakes obtained from these pre-mixtures were evaluated at time zero and after 3 and 6 months of storage. The  $\beta$ -CD/OEL cake presented higher volume after storage of the respective premix for 6 months; lower hardness and lower percentage of hydrolyzed starch after *in vitro* digestibility. On the other hand, in the sensorial analysis, the cake with free OEL was preferred by 60% of the panelists.

**Key words:** encapsulation, orange essential oil, cyclodextrins, *Aspergillus*, cakes.



## Lista de Figuras

<b>Figura 1.</b> Estrutura molecular da amilose (a) e da amilopectina (b). .....	27
<b>Figura 2.</b> Representação esquemática da ação das enzimas envolvidas na degradação do amido.....	29
<b>Figura 3.</b> Representação esquemática das reações catalisadas pela enzima ciclodextrina glicosil transferase. A) ciclização/acoplamento; B) desproporcionalização e C) hidrólise. ....	30
<b>Figura 4.</b> Estrutura química da $\alpha$ , $\beta$ e $\gamma$ -ciclodextrinas (a) e representação esquemática das ciclodextrinas (b). ....	33
<b>Figura 5.</b> Estrutura tipo "cone truncado" característico de ciclodextrina. ....	34
<b>Figura 6.</b> Representação esquemática da formação de complexos de inclusão com ciclodextrinas.....	35
<b>Figura 7.</b> Representação esquemática do processo de electrospraying. ....	39
<b>Figura 8.</b> Número acumulado de artigos científicos utilizando ciclodextrinas como material de parede para encapsulação de aromas e sabores.....	40
<b>Figura 9.</b> Perfil cromatográfico do óleo essencial de laranja .....	54
<b>Figura 10.</b> Microscopia eletrônica de varredura (MEV) da $\beta$ -CD (a), do complexo de inclusão (b) e da mistura física (c).....	55
<b>Figura 11.</b> Curvas de DSC da $\beta$ -CD, do complexo de inclusão $\beta$ -CD/OEL, da mistura física (MF) e do óleo essencial de laranja (OEL).....	56
<b>Figura 12.</b> Curva da análise termogravimétrica da $\beta$ -CD, do complexo de inclusão $\beta$ -CD/OEL, da mistura física (MF) e do óleo essencial de laranja (OEL).....	58
<b>Figura 13.</b> Espectros de FTIR da $\beta$ -CD, do complexo de inclusão ( $\beta$ -CD-OEL), da mistura física (MF) e do óleo essencial. ....	59
<b>Figura 14.</b> Atividade enzimática (amilolítica e alfa-amilase) dos grãos de trigo não germinado (TMNG) e germinado (TMG) e dos amidos de trigo não germinado (ATNG) e germinado (ATG). ....	75
<b>Figura 15.</b> Termogramas TGA (a) e DTA (b) do complexo de inclusão, OEL e ciclodextrinas.....	80
<b>Figura 16.</b> Potencial zeta das cápsulas (a) e fibras (b) contendo óleo essencial de laranja (OEL) em diferentes concentrações. ....	90

<b>Figura 17.</b> Eficiência de encapsulação e capacidade de carregamento das cápsulas (a) e fibras (b) contendo óleo essencial de laranja (OEL) em diferentes concentrações. ....	91
<b>Figura 18.</b> Morfologia das cápsulas com 30, 40 e 50% de óleo essencial de laranja (a, b e c, respectivamente) e fibras com 30, 40 e 50% de óleo essencial de laranja (d, e e f, respectivamente). ....	93
<b>Figura 19.</b> Potencial zeta (mV) das soluções poliméricas contendo diferentes concentrações de $\beta$ -CD/OEL.....	111
<b>Figura 20.</b> Micrografias e distribuição do diâmetro das cápsulas preparadas com diferentes concentrações de $\beta$ -CD/OEL. (a) 2,5%; (b) 5,0%; (c) 7,5%. ....	112
<b>Figura 21.</b> Padrões de raios X da $\beta$ -CD, do complexo de inclusão $\beta$ -CD/OEO, da zeína e das cápsulas de zeína:complexo de inclusão $\beta$ -CD / OEO.....	115
<b>Figura 22.</b> Incidência fúngica nos bolos controle e com OEL livre e encapsulado após 30 dias(a) e 150 dias (b) de armazenamento. ....	117
<b>Figura 23.</b> Digestão <i>in vitro</i> dos bolos controle, com OEL livre e com $\beta$ -CD/OEL..	138
<b>Figura 24.</b> Análise sensorial de preferência dos bolos contendo OEL na forma livre e em encapsulada como complexo de inclusão com $\beta$ -ciclodextrina.....	141

## Lista de Tabelas

<b>Tabela 1.</b> Eficiência de encapsulação (EE) e retenção de voláteis (r) do complexo de inclusão de CD/OEL.....	61
<b>Tabela 2.</b> Área dos picos e concentração (%) dos compostos voláteis do óleo essencial de laranja (OEL) mistura física (MFOEL) e complexo de inclusão ( $\beta$ -CD-OEL).....	62
<b>Tabela 3.</b> Rendimento de extração e composição química do amido de trigo germinado e não germinado.....	74
<b>Tabela 4.</b> Concentrações de $\alpha$ , $\beta$ e $\gamma$ -ciclodextrinas e rendimento de conversão de amidos de trigo não germinado e germinado em ciclodextrinas.....	77
<b>Tabela 5.</b> Teor de açúcares redutores das CDs produzidas. ....	79
<b>Tabela 6.</b> Formulação dos bolos controle, com OEL encapsulado e OEL livre. ....	107
<b>Tabela 7.</b> Concentração inibitória mínima (CIM) e concentração fungicida mínima (CFM) de OEL frente às espécies de <i>Aspergillus</i> .....	109
<b>Tabela 8.</b> Viscosidade aparente e condutividade elétrica de soluções poliméricas com diferentes concentrações de complexo de inclusão $\beta$ -CD /OEL.....	109
<b>Tabela 9.</b> Teor de umidade das pré-misturas e dos bolos durante o armazenamento. ....	130
<b>Tabela 10.</b> Volume específico dos bolos durante o armazenamento.....	132
<b>Tabela 11.</b> Parâmetros de cor ( $L^*$ , $a^*$ e $b^*$ ) dos bolos durante o armazenamento. ..	134
<b>Tabela 12.</b> Análise de perfil de textura dos bolos durante o armazenamento.....	136
<b>Tabela 13.</b> Parâmetros da cinética de hidrólise do amido nos bolos. ....	138



## Sumário

1	Introdução.....	23
2	Revisão bibliográfica.....	27
2.1	Amido.....	27
2.1.1	Hidrólise enzimática de amido.....	28
2.2	Amido de trigo.....	30
2.2.1	Amido de trigo germinado.....	31
2.3	Ciclodextrinas.....	32
2.4	Complexo de inclusão.....	34
2.4.1	Complexos de inclusão com óleos essenciais.....	36
2.5	Encapsulação.....	37
2.6	Materiais encapsulados em alimentos.....	41
2.7	Materiais encapsulados em panificação.....	41
3	Capítulo 1 – Artigo publicado.....	45
	Produção, caracterização e estabilidade de complexo de inclusão entre $\beta$ - ciclodextrina/óleo essencial de laranja.....	45
3.1	Introdução.....	49
3.2	Material e métodos.....	50
3.2.1	Material.....	50
3.2.2	Extração do óleo essencial de laranja.....	50
3.2.3	Caracterização do óleo essencial de laranja por cromatografia gasosa.....	50
3.2.4	Preparo do complexo de inclusão e da mistura física.....	51
3.2.5	Caracterização do complexo de inclusão e da mistura física.....	51
3.2.5.1	Morfologia.....	51
3.2.5.2	Propriedades térmicas.....	51
3.2.5.2.1	Calorimetria diferencial de varredura (DSC).....	51
3.2.5.2.2	Análise termogravimétrica (TGA).....	52
3.2.5.3	Identificação dos grupos funcionais - espectros de infravermelho.....	52
3.2.6	Eficiência de complexação.....	52
3.2.7	Identificação e quantificação de voláteis.....	53
3.2.8	Estabilidade do complexo de inclusão.....	54
3.3	Resultados e discussão.....	54
3.3.1	Cromatografia gasosa do óleo essencial de laranja.....	54
3.3.2	Caracterização do complexo de inclusão e mistura física.....	55

3.3.2.1	Morfologia .....	55
3.3.2.2	Propriedades térmicas .....	56
3.3.2.2.1	Calorimetria diferencial de varredura (DSC) .....	56
3.3.2.2.2	Análise termogravimétrica (TGA).....	57
3.3.2.3	Identificação dos grupos funcionais - espectros de infravermelho.....	59
3.3.3	Eficiência de complexação.....	60
3.3.4	Identificação dos compostos voláteis do OEL.....	61
3.3.5	Estabilidade do complexo .....	62
3.4	Conclusão .....	64
4	Capítulo 2 – Artigo em processo de revisão.....	65
	Complexo de inclusão de ciclodextrinas obtidas a partir de amido de trigo germinado contendo óleo essencial de laranja: melhoria da estabilidade térmica do óleo essencial de laranja .....	65
4.1	Introdução .....	69
4.2	Material e métodos.....	70
4.2.1	Material .....	70
4.2.2	Moagem dos grãos .....	70
4.2.3	Extração do amido de trigo .....	71
4.2.4	Composição química do amido de trigo .....	71
4.2.5	Determinação da atividade amilolítica e alfa-amilase dos grãos e amidos de trigo	71
4.2.6	Produção das CDs dos amidos de trigo.....	72
4.2.7	Determinação cromatográfica das CDs produzidas.....	72
4.2.8	Determinação de açúcares redutores das CDs produzidas .....	72
4.2.9	Preparo do complexo de inclusão de ciclodextrinas/óleo essencial de laranja ( $\beta$ -CDs / OEL).....	73
4.2.10	Propriedades térmicas (TGA/DTA) do complexo de inclusão ( $\beta$ -CDs/OEL)	73
4.2.11	Análise estatística .....	73
4.3	Resultados e discussão .....	74
4.3.1	Rendimento de extração e composição química do amido.....	74
4.3.2	Atividade amilolítica e alfa-amilase em grãos moídos e amido de trigo .....	75
4.3.3	Produção de ciclodextrinas de amido de trigo.....	76
4.3.4	Quantificação de açúcares redutores das CDs produzidas .....	78
4.3.5	Análise térmica (TGA/DTA) do complexo de inclusão (CDs/OEL) .....	80

4.4	Conclusão .....	81
5	Capítulo 3 – Artigo a ser submetido .....	83
	Encapsulação de óleo essencial de laranja pela técnica de electrospun .....	83
5.1	Introdução .....	87
5.2	Materiais e métodos.....	88
5.2.1	Material.....	88
5.2.2	Extração do óleo essencial de laranja .....	88
5.2.3	Preparo da solução polimérica de zeína.....	88
5.2.4	Produção das cápsulas e fibras.....	89
5.2.5	Determinação do potencial zeta .....	89
5.2.6	Eficiência de encapsulação e capacidade de carregamento .....	89
5.2.7	Morfologia das cápsulas e fibras .....	90
5.2.8	Estatística .....	90
5.3	Resultados e discussão .....	90
5.3.1	Potencial zeta .....	90
5.3.2	Eficiência de encapsulação e capacidade de carregamento .....	91
5.3.3	Morfologia das cápsulas e fibras .....	93
5.4	Conclusão .....	94
5.5	Estudos futuros .....	95
6	Capítulo 4 – Artigo submetido .....	97
	Cápsulas de zeína e complexo de inclusão entre $\beta$ -ciclodextrina e óleo essencial de laranja: inibição do crescimento de <i>Aspergillus</i> spp. em bolos.....	97
6.1	Introdução .....	101
6.2	Material e métodos .....	102
6.2.1	Materiais .....	102
6.2.2	Extração do óleo essencial de laranja (OEL).....	103
6.2.3	Atividade antifúngica do OEL .....	103
6.2.3.1	Micro-organismos e preparação dos inóculos fúngicos.....	103
6.2.3.2	Concentração inibitória mínima (MIC) e concentração fungicida mínima (CFM) .....	104
6.2.4	Preparo do complexo de inclusão $\beta$ -CD/OEL.....	104
6.2.5	Preparo das cápsulas de zeína e complexo de inclusão ( $\beta$ -CD/OEL) .....	104
6.2.6	Obtenção das cápsulas de zeína/complexo de inclusão $\beta$ -CD/OEL por electrospaying.....	105

6.2.7	Viscosidade aparente e condutividade elétrica das soluções poliméricas .	105
6.2.8	Potencial zeta.....	105
6.2.9	Morfologia e distribuição de diâmetro das cápsulas.....	105
6.2.10	Eficiência de encapsulação (EE) do OEL .....	106
6.2.11	Difração de raio-X (DRX) .....	106
6.2.12	Elaboração dos bolos.....	106
6.2.13	Análise estatística .....	108
6.3	Resultados e discussão .....	108
6.3.1	Atividade antifúngica do OEL.....	108
6.3.2	Viscosidade aparente e condutividade elétrica das soluções poliméricas .	109
6.3.3	Potencial zeta.....	110
6.3.4	Morfologia e distribuição de diâmetro das cápsulas.....	111
6.3.5	Eficiência de encapsulação.....	114
6.3.6	Difração de raio-X .....	115
6.3.7	Incidência fúngica em bolos .....	116
6.4	Conclusão .....	118
6.5	Estudos futuros .....	118
7	Capítulo 5 – Artigo a ser submetido .....	119
	Armazenamento de pré-misturas de bolo contendo óleo essencial de laranja livre e encapsulado em $\beta$ -ciclodextrina: efeito sobre as propriedades tecnológicas, sensoriais e de digestibilidade <i>in vitro</i> .....	119
7.1	Introdução .....	123
7.2	Material e métodos.....	125
7.2.1	Materiais .....	125
7.2.2	Preparo do complexo de inclusão .....	125
7.2.3	Preparo das pré-misturas e dos bolos .....	125
7.2.4	Estabilidade ao armazenamento.....	126
7.2.5	Avaliação das propriedades tecnológicas .....	126
7.2.5.1	Umidade.....	126
7.2.5.2	Volume específico.....	126
7.2.5.3	Cor dos bolos.....	127
7.2.5.4	Análise de perfil de textura (TPA) .....	127
7.2.5.5	Digestibilidade <i>in vitro</i> .....	127
7.2.5.6	Análise sensorial.....	128

7.2.6 Análise estatística .....	129
7.3 Resultados e Discussão .....	129
7.3.1 Teor de umidade das pré-misturas e dos bolos.....	129
7.3.2 Volume específico dos bolos .....	131
7.3.3 Cor dos bolos .....	133
7.3.4 Análise de perfil de textura (TPA).....	134
7.3.5. Digestibilidade <i>in vitro</i> .....	137
7.3.6 Análise sensorial dos bolos.....	139
7.4 Conclusão .....	141
7.5 Estudos futuros .....	142
8 Considerações finais.....	143
APÊNDICE A.....	145
APÊNDICE B.....	147
APÊNDICE C .....	149
APÊNDICE D .....	151
Referências bibliográficas .....	153



## 1 Introdução

A deterioração de produtos representa um sério problema para a indústria de panificação resultando em perdas econômicas significativas (SAMAPUNDO et al., 2016) que podem variar entre 1 e 5% dependendo das estações do ano, do tipo de produto, das práticas sanitárias, das condições de processamento e armazenamento e embalagem. Os fungos são os principais agentes responsáveis pela deterioração das matérias-primas e produtos acabados de panificação. Além dos defeitos visuais, os fungos são responsáveis pelos *off flavours*, além de sintetizar micotoxinas e compostos alergênicos (RIZELLO et al., 2017).

Dentre os produtos de panificação, os bolos industrializados são altamente suscetíveis à deterioração por fungos devido ao seu longo tempo de armazenamento (> 45 dias) e sua alta atividade de água (aw) (0,78-0,95), ideal para o crescimento deste tipo de micro-organismo. Embora a contaminação fúngica nos estágios iniciais de preparo dos produtos seja notória, ela não é considerada a questão mais crítica, uma vez que a microbiota inicial pode ser destruída pelo tratamento térmico (forneamento). A contaminação pós-forneamento (ar, manuseio do produto e equipamento mal higienizado) é a questão mais preocupante para a estabilidade microbiológica de bolos (MORASSI et al., 2018) sendo *Penicillium* spp. e *Aspergillus* spp. os gêneros predominantes neste tipo de produto (RIBES et al., 2017; SIRISOONTARALAK et al., 2017; DEBONNE et al., 2018).

Com o intuito de assegurar a estabilidade microbiológica dos produtos de panificação, a indústria desenvolve uma série de estratégias, que incluem o uso de matérias-primas de alta qualidade e a prevenção da contaminação pós-forneamento (MORASSI et al., 2018). Além destas alternativas, o prazo de validade dos produtos de panificação pode ser ampliado pela adição de conservantes químicos (SAMAPUNDO et al., 2016). No entanto, as crescentes tendências dos consumidores por produtos alimentícios mais naturais e saudáveis levando a uma mudança na percepção do consumidor em relação aos conservantes químicos alimentares, têm impulsionado a busca por alternativas mais seguras para a conservação de alimentos, além de preservar as propriedades sensoriais do produto (RIBES et al., 2017; DEBONNE et al., 2018). Nesse sentido, os óleos essenciais surgem como alternativas potenciais para o uso de conservantes sintéticos, por apresentarem em sua constituição, compostos ativos com propriedades antifúngicas (GONÇALVES et al., 2018). Existem vários trabalhos na literatura relatando o

potencial antifúngico de óleos essenciais de citros (VELÁZQUEZ-NUÑEZ et al., 2013; JING et al., 2014; TAO et al., 2014; SIMAS et al., 2017).

O óleo essencial de laranja (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) pode ser classificado como uma mistura de terpenos, hidrocarbonetos e compostos oxigenados, considerados quimicamente instáveis. Em função de sua natureza insaturada podem ser facilmente oxidados por influência da luz, do ar e da umidade (GALVÃO et al., 2015). Este fato justifica as crescentes pesquisas que buscam alternativas para a proteção do óleo essencial de laranja, destacando-se a encapsulação (ASCHERI et al., 2003).

Atualmente existem muitas técnicas utilizadas para a encapsulação de compostos tais como, liofilização, *spray drying*, secagem em leite fluidizado, dentre outras (RAY et al., 2016; NEDOVIC et al., 2011). Além dessas técnicas, existem também as de *electrospinning* e *electrospraying*, que consistem na aplicação de uma alta voltagem que carrega positivamente a solução polimérica contida em uma seringa. A solução é bombeada, e por atração e transporte da solução em direção a um coletor, carregado negativamente, as fibras ou cápsulas com potencial de encapsular compostos são formadas (BHUSHANI; ANANDHARAMAKRISHNAN, 2014).

Outra alternativa para a proteção do óleo essencial de laranja é a formação de complexos de inclusão com ciclodextrinas (CDs) (WADHWA et al., 2017). As CDs possuem uma estrutura característica particular, com cavidades internas hidrofóbicas e extremidades essencialmente hidrofílicas (HUNDRE et al., 2014). Essa característica é responsável pela formação de complexos de inclusão com substâncias orgânicas e inorgânicas, alterando as suas características físicas e químicas (SHAO et al., 2014) conferindo maior solubilidade em soluções aquosas (LIANG et al., 2012) e fornecendo estabilização e proteção para as moléculas, contra reações de degradação e oxidação (TAO et al., 2014). Além disso, a liberação dessas moléculas pode ser controlada e/ou retardada pelo próprio complexo de inclusão (KFOURY et al., 2016; KAYACI; UYAR, 2012a). A formação e a estabilidade do complexo de inclusão são dependentes da compatibilidade entre a CDs e a molécula bioativa (FATHI et al., 2014).

Na indústria de alimentos, as ciclodextrinas são principalmente aplicadas para melhorar a retenção de sabor em alimentos submetidos a tratamentos térmicos, e como material de parede para encapsulação de substâncias sensíveis à

temperatura, como antioxidantes e óleos essenciais, visando melhorar as propriedades sensoriais de alimentos (GARCÍA-SEGOVIA et al., 2011; ASTRAY et al., 2009).

As ciclodextrinas são oligossacarídeos cíclicos não redutores compostos por unidades de D-glicose unidas por ligações  $\alpha$ -1,4, sendo as principais e mais comuns CDs aquelas compostas de seis, sete e oito unidades de glicose, denominadas  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ - CDs, respectivamente (MATENCIO et al., 2017; KAYACI; UYAR, 2012b; IBRAHIM et al., 2011). Estes oligossacarídeos são produzidos a partir de amido ou derivados de amido por meio de hidrólise enzimática (CELEBIOGLU; UYAR, 2013) catalisada pela ciclodextrina glicosiltransferase (CGTase) (DURA; ROSELL, 2016; MARQUES, 2010). Tendo em vista que durante o processo de germinação são produzidas enzimas amilolíticas, principalmente  $\alpha$  e  $\beta$ -amilases, que são responsáveis por converter o amido em açúcares redutores, como maltose, glicose e dextrinas (MURALIKRISHNA; NIRMALA, 2005), pressupõe-se que o amido de trigo germinado seja um substrato promissor para a produção de CDs.

Existem diversos trabalhos sobre a produção de CDs, otimizando parâmetros como, concentração de substrato e de enzima, tempo, temperatura e pH ótimos de reação (ZHEKOVA et al., 2009; MORIWAKI et al., 2009; IBRAHIM et al., 2011; SCHÖFFER et al., 2013; MORIWAKI et al., 2014; SAKINAH et al., 2014). Além disso, nos últimos anos têm crescido significativamente o número de trabalhos focando na aplicação de CDs purificadas, como complexos de inclusão para encapsulação de diversos compostos nas mais variadas aplicações (KAYACI; UYAR, 2012a; KAYACI; UYAR, 2012b; SHAO et al., 2014; MANGOLIM et al., 2014; VILANOVA; SOLANS, 2015; HUNDRE et al., 2015; ANAYA-CASTRO et al., 2017). No entanto, estudos sobre os efeitos das condições de produção até a aplicação das ciclodextrinas como material de parede para encapsulação são escassos. Além disso, não foram encontrados estudos que relatam a produção de CDs a partir de amido de trigo germinado.

Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi encapsular o óleo essencial de laranja em  $\beta$ -ciclodextrina e aplicar em bolos; avaliando sua atividade antifúngica frente à *Aspergillus* spp.

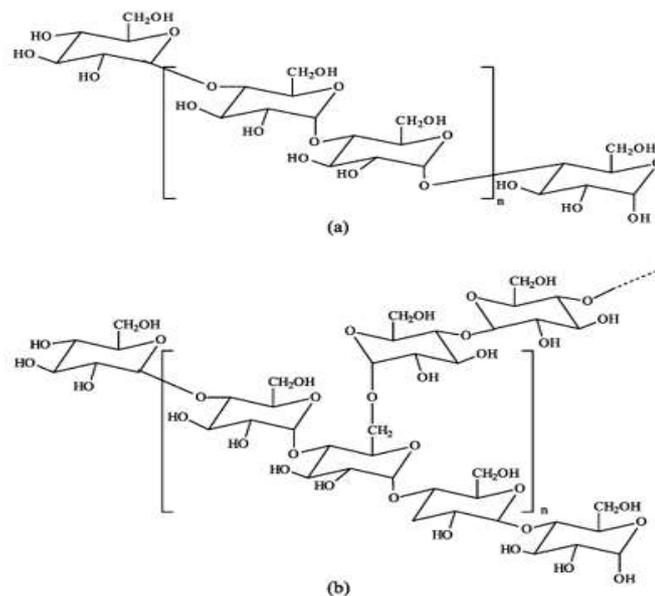


## 2 Revisão bibliográfica

### 2.1 Amido

O amido é um biopolímero semicristalino, considerado a principal fonte de reserva de muitos vegetais, podendo ser encontrado em cereais, raízes, tubérculos, sementes e frutas. Os grânulos de amido podem variar em tamanho, forma, estrutura e composição química, dependendo de sua origem botânica, e são constituídos por moléculas de amilose e amilopectina (ZAVAREZE; DIAS, 2011). A funcionalidade do amido depende principalmente da maneira pela qual estas duas frações estão organizadas dentro da estrutura granular (BELLO-PEREZ et al., 2006).

A amilose (Figura 1a) é uma cadeia essencialmente linear formada por unidades de glicose unidas por ligações glicosídicas  $\alpha$ -1,4, apresentando grau de polimerização entre 500 e 2000 unidades de glicose. A amilopectina (Figura 1b) é caracterizada pelo alto grau de ramificação, sendo a sua estrutura formada por unidades de glicose unidas por ligações do tipo  $\alpha$ -1,4 na cadeia principal, mas com cerca de 5 a 6% de ligações  $\alpha$ -1,6 nos seus pontos de ramificação. A amilopectina apresenta grau de polimerização da ordem de  $10^4$  a  $10^5$ , sendo comum a presença de 20 a 30 unidades de glicose (TESTER et al., 2004; ROCHA et al., 2008).



**Figura 1.** Estrutura molecular da amilose (a) e da amilopectina (b).

Fonte: CORRADINI et al. (2005).

Os grânulos de amido estão organizados em regiões cristalinas e amorfas, e estas regiões são dependentes da presença de macromoléculas lineares e ramificadas. As regiões cristalinas, consideradas as mais ordenadas, são formadas pela fração linear das moléculas de amilopectina e são responsáveis por manter a estrutura do grânulo, controlar seu comportamento na presença de água e sua resistência a ataques químicos e enzimáticos. A região amorfa é constituída pelas cadeias de amilose e também pelas regiões ramificadas da amilopectina (PÉREZ; BERTO, 2010).

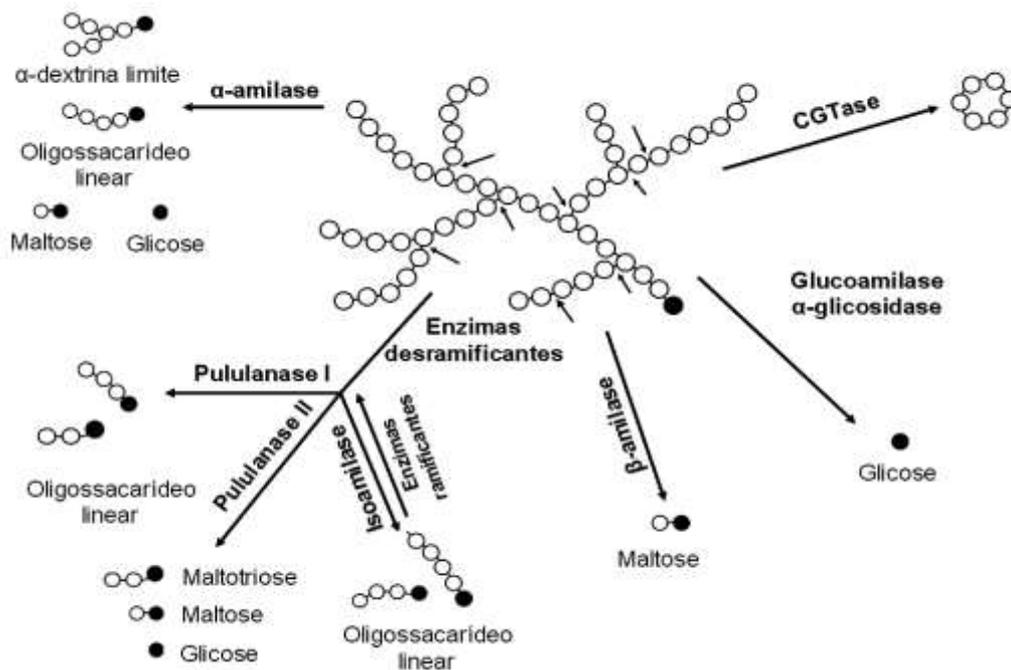
O amido pode ser degradado através de hidrólises ácida, ácida-enzimática, ou apenas enzimática, mas a utilização de enzimas amilolíticas, em substituição às substâncias químicas, apresenta algumas vantagens, tais como: segurança, menor impacto ambiental, além de possibilitar maior controle da reação, devido à especificidade das enzimas, e menor geração de sub-produtos (MIAO et al., 2015).

### *2.1.1 Hidrólise enzimática de amido*

As principais enzimas envolvidas na degradação do amido podem ser simplifiadamente classificadas em amilases, que hidrolisam as ligações do tipo  $\alpha$ -1,4, e amilases desramificantes que hidrolisam as ligações do tipo  $\alpha$ -1,6. De forma geral, existem quatro grupos de enzimas que convertem o amido: as endoamilases, as exoamilases, as desramificantes e as transferases (Figura 2) (VAN DER VEEN et al., 2000).

Segundo Gupta et al., (2003) as amilases são capazes de hidrolisar moléculas de amido liberando diversos produtos, incluindo dextrinas e pequenos polímeros compostos de unidades de glicose, e podem ser classificadas em três categorias, as  $\alpha$ -amilases, chamadas de endoamilases, que catalisam as hidrólises de forma aleatória no interior da molécula de amido, liberando oligossacarídeos de diversos tamanhos, as  $\beta$ -amilases ou exoamilases, que hidrolisam as ligações glicosídicas a partir da extremidade não redutora da molécula, liberando glicose ou maltose e por fim, as glucoamilases ou amiloglucosidases, responsáveis por liberar unidades de glicose do terminal não-redutor das moléculas do substrato.

As ligações glicosídicas do tipo  $\alpha$ -1,6 podem ser hidrolisadas pelas chamadas enzimas desramificantes, exemplos destas enzimas são as isoamilases e pululanases (CAI et al., 2010).

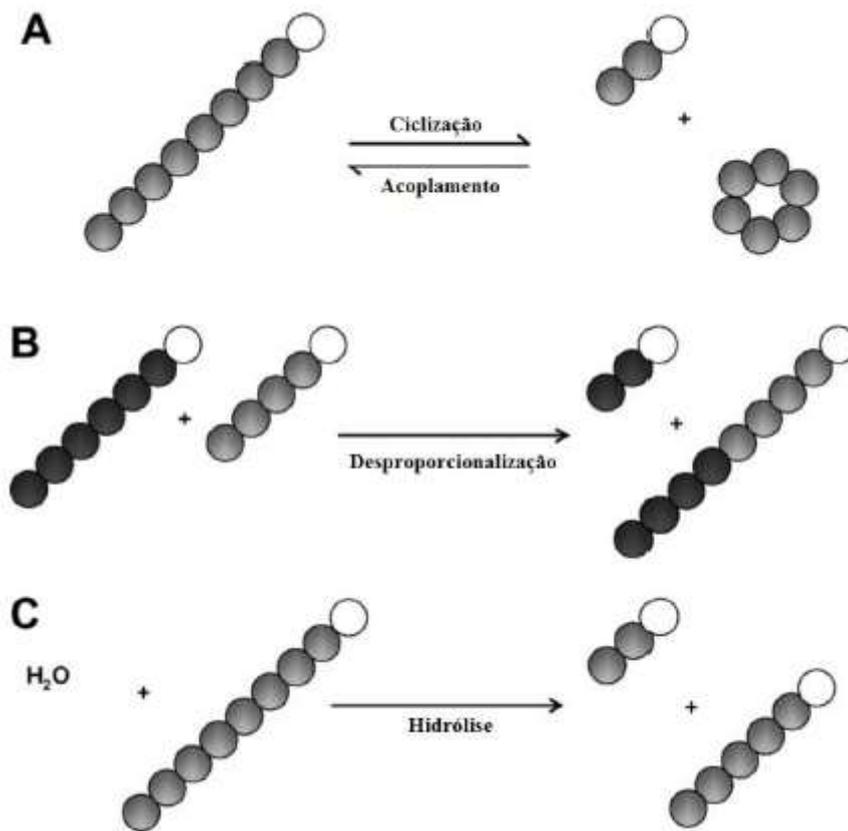


**Figura 2.** Representação esquemática da ação das enzimas envolvidas na degradação do amido.

Fonte: Van Der Veen et al., (2000).

Entre as enzimas envolvidas no processo de degradação do amido, encontra-se também o grupo das transferases, que são enzimas que quebram ligações glicosídicas  $\alpha$ -1,4 da molécula doadora e transferem parte do doador a um receptor glicosídico com a formação de uma nova ligação glicosídica (MARTINS; HATTI-KAUL, 2003). Dentre as transferases, destaca-se a enzima ciclodextrina glicosiltransferase, de grande interesse industrial.

A ciclodextrina glicosiltransferase (CGTase) é uma endoenzima, da família das  $\alpha$ -amilases, que catalisa quatro tipos de reações através da clivagem das ligações glicosídicas  $\alpha$ -1,4 presentes na parte interna da cadeia de um polissacarídeo. A CGTase apresenta uma atividade menor em reações de hidrólise, catalisando principalmente três reações de transglicosilação: ciclização, acoplamento e desproporcionalização (Figura 3) (DURA; ROSELL, 2016; ROMÁN et al., 2016).



**Figura 3.** Representação esquemática das reações catalisadas pela enzima ciclodextrina glicosil transferase. A) ciclização/acoplamento; B) desproporcionalização e C) hidrólise.

Fonte: SVENSSON et al. (2009).

Segundo Van Der Veen et al. (2000), a principal reação catalisada pela enzima CGTase é a reação de desproporcionalização, onde ocorre a clivagem de um oligossacarídeo linear, sendo uma das partes transferida para outro aceptor, também linear. A ciclização ocorre quando a extremidade não redutora de um oligossacarídeo linear é ligada em sua própria estrutura, dando origem as chamadas ciclodextrinas. Na reação de acoplamento, inversa a ciclização, ocorre a abertura de um anel de ciclodextrina seguida pela transferência para outro oligossacarídeo linear.

## 2.2 Amido de trigo

O trigo destaca-se por ser o cereal mais cultivado no mundo, e o amido, o componente presente em maior quantidade tanto no grão quanto na farinha, é a principal reserva energética em plantas de trigo, representando 65% do peso seco

final dos grãos (LI et al., 2016). Além disso, é considerado um ingrediente multifuncional na indústria de alimentos (YONEMOTO et al., 2007).

No endosperma do grão de trigo, o amido se apresenta na forma de grânulos, sendo que sua forma, tamanho e estrutura são fatores determinantes na funcionalidade do amido (ZHANG et al., 2016). O amido de trigo possui distribuição bimodal em relação ao tamanho, apresentando duas formas distintas de grânulos: grânulos tipo A e B (Li et al., 2016). Os grânulos tipo A apresentam formato lenticular com um diâmetro  $> 10\mu\text{m}$ , enquanto os grânulos de amido tipo B são de formato poligonal ou esférico, com diâmetro  $\leq 10\mu\text{m}$  (WANG et al., 2014).

A composição química do amido de trigo depende de diversos fatores, principalmente àqueles relacionados à origem genética e condições ambientais (clima, qualidade do solo, fertilização, temperatura, tempo de semeadura, precipitação). A cultivar do trigo exerce grande influência no teor de amilose e amilopectina dos grânulos de amido, mas ela não é um fator isolado. Outro fator determinante são as condições ambientais a que este trigo foi exposto, que influenciam diretamente na proporção destas macromoléculas e também na atividade de enzimas envolvidas na biossíntese do amido (ROSICKA-KACZMAREK et al., 2016).

### 2.2.1 Amido de trigo germinado

As frequentes ocorrências de chuvas no período da colheita do trigo levam a elevada incidência de grãos germinados, o que afeta diretamente sua qualidade tecnológica (BARANZELLI et al., 2018). A germinação é um processo onde ocorre redução das reservas acumuladas para a geração de uma nova planta, ou seja, reservas como amido e proteínas, principalmente, sofrem o ataque de enzimas, e são hidrolisados em moléculas menores (POPINIGIS, 1985).

Segundo Popinigis (1985), o aumento da atividade enzimática, principalmente de  $\alpha$  e  $\beta$ -amilases, é observada durante as primeiras fases da germinação. A atividade hidrolítica é de suma importância, pois converte substâncias de reserva, principalmente o amido, em açúcares menores, utilizados como substratos para o processo respiratório, que conseqüentemente garante o aporte energético para a germinação.

O processo de degradação das reservas altera a qualidade tecnológica dos grãos e farinhas, sendo a principal alteração o aumento da atividade de enzimas

amilolíticas (amilases), que atuam sobre o amido, convertendo-o a açúcares como maltose e glicose, e também a dextrinas e outras moléculas resultantes da clivagem das cadeias de amilose e amilopectina (MCKIE; MCCLEARY, 2015; SINGH; KAYASTHA, 2014).

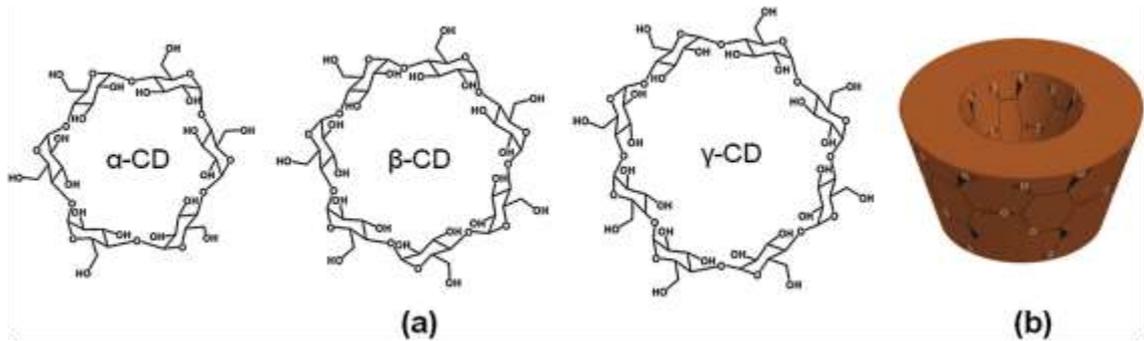
As alterações observadas na composição e nas propriedades do amido germinado podem ser interessantes para produtos que necessitam de amidos com propriedades específicas para determinadas aplicações (CEREDA, 2002), como por exemplo, para a produção de ciclodextrinas, que são produzidas por meio da conversão enzimática do amido catalisada pela enzima ciclodextrina glicosiltransferase (CGTase) (LI et al., 2014; MORIWAKI et al., 2014).

Diferentes tipos de amido podem ser utilizados como substrato para a produção de ciclodextrinas, porém o mais comumente utilizado é o amido de batata. O amido de milho e o amido de trigo também podem ser utilizados (SZERMAN et al., 2007). No entanto, ainda não existem relatos na literatura da utilização de amido de trigo germinado como substrato para a produção de ciclodextrinas, avaliando a influência do aumento da atividade enzimática amilolítica promovida pela germinação.

### **2.3 Ciclodextrinas**

O amido é um biopolímero semicristalino, utilizado como fonte de reserva de muitos vegetais, podendo ser encontrado em cereais, raízes, tubérculos e sementes (ZAVAREZE; DIAS, 2011). Ele é considerado o principal substrato para a reação de hidrólise das ligações glicosídicas e a subsequente reação de transglicosilação intramolecular ou ciclização dos oligossacarídeos, dando origem às chamadas ciclodextrinas (ASTRAY et al., 2009; VAN DER VEEN et al., 2000).

As ciclodextrinas são oligossacarídeos cíclicos não redutores constituídos por unidades de glicose unidas por ligações  $\alpha$  (1-4) (YUAN et al., 2016). Dentre as ciclodextrinas destacam-se as que contêm seis, sete e oito unidades de glicose, denominadas respectivamente de  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ -ciclodextrinas (Figura 4) (ABARCA et al., 2016).



**Figura 4.** Estrutura química da  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ -ciclodextrinas (a) e representação esquemática das ciclodextrinas (b).

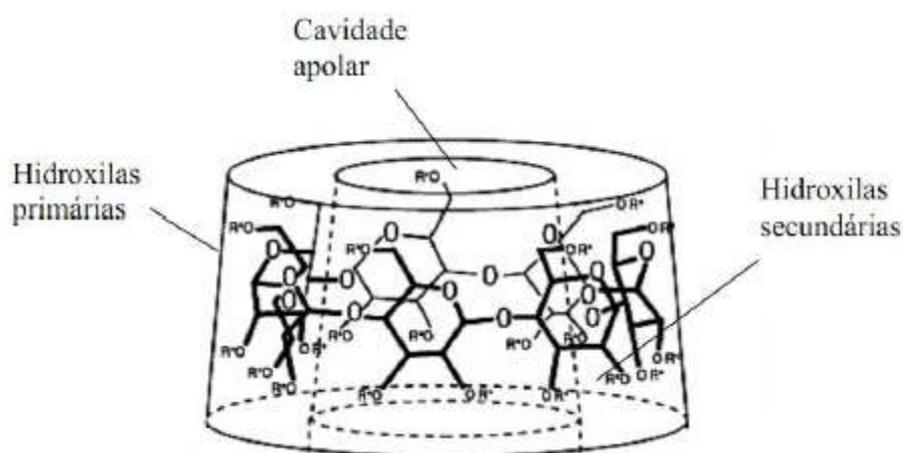
Fonte: Kayaci e Uyar (2012b).

As ciclodextrinas são obtidas a partir da degradação enzimática do amido sob ação da enzima ciclodextrina glicosiltransferase (MAN et al., 2016) capaz de catalisar quatro tipos de reações, hidrólise, transglicosilação/ciclização, acoplamento e desproporcionamento (DURA; ROSELL, 2016; ROMÁN et al., 2016).

As características das ciclodextrinas são dependentes da fonte e da concentração de amido, da concentração de enzima, do tempo de reação, da temperatura e do pH. O produto obtido a partir da conversão enzimática é normalmente uma mistura de  $\alpha\beta$  e  $\gamma$ -ciclodextrinas, podendo também conter pequenas quantidades de ciclodextrinas com mais de nove unidades de glicose (LI et al., 2014).

A fonte de amido utilizada pode produzir ciclodextrinas com características distintas e esse fato é justificado provavelmente em função das diferenças na estrutura física dos grânulos de amido e às suas propriedades (MORIWAKI et al., 2009).

Segundo Carneiro et al. (2006), a maneira que os resíduos de glicose presentes no anel das ciclodextrinas se arranjam, hidroxilas secundárias (C2 e C3) situadas em uma das extremidades do anel enquanto as hidroxilas primárias (C6) em outra, resultam em moléculas com formato cilíndrico, do tipo “cone truncado” (Figura 5). Em função dessa conformação, as extremidades hidrofílicas apresentam capacidade de se dissolver em água enquanto as suas cavidades internas hidrofóbicas possibilitam a formação de complexos de inclusão com diversas substâncias orgânicas e inorgânicas (HUNDRE et al., 2015; SHAO et al., 2014; ZHU et al., 2014).



**Figura 5.** Estrutura tipo "cone truncado" característico de ciclodextrina.

Fonte: CARNEIRO et al. (2006).

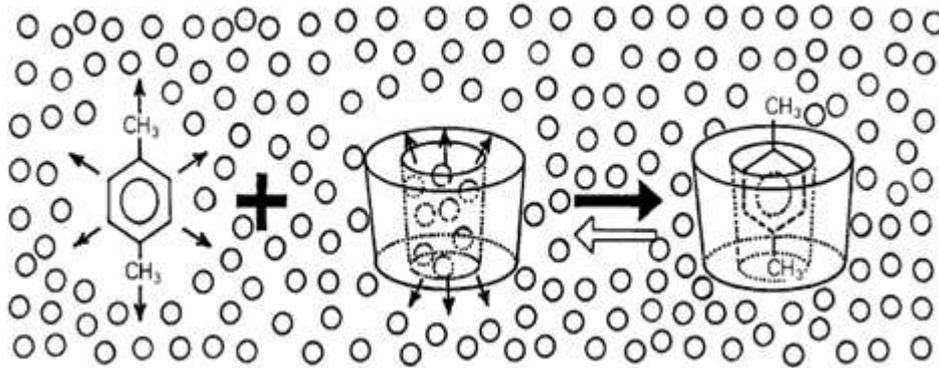
Entre todos os tipos de ciclodextrinas, a  $\beta$ -CD é a mais utilizada principalmente para a formação de complexos de inclusão, pois sua cavidade permite hospedar moléculas na faixa de massa molecular da maioria das moléculas de interesse, entre 200 e 800 g.mol<sup>-1</sup>. Outro fator que amplia seu uso é a facilidade de produção, que por ser mais estável e menos solúvel em água, facilita a sua separação das outras ciclodextrinas e diminui seu custo (SANTOS et al., 2015; TAO et al., 2014). Além disso, seu rendimento a partir de amido é maior quando comparado às outras ciclodextrinas (RAKMAI et al., 2017; SHRESTHA et al., 2017).

## 2.4 Complexo de inclusão

Complexo de inclusão pode ser definido como o resultado da interação entre compostos em que uma molécula hóspede de menor tamanho se encaixa na cavidade de outra molécula. Nesse sentido, as ciclodextrinas consideradas como cápsulas vazias de determinado tamanho molecular, apresentam a capacidade de formar complexos de inclusão com uma ampla variedade de compostos (ASTRAY et al., 2009).

As ciclodextrinas apresentam conformação espacial do tipo "cone truncado", com os grupos hidroxilas primários e secundários voltados para a face externa, conferindo caráter hidrofílico para a superfície externa, enquanto a cavidade da molécula é essencialmente hidrofóbica (DUCHÊNE; BOCHOT, 2016; LIMA et al., 2016), o que possibilita que diversas moléculas possam ser encapsuladas em sua

cavidade, permitindo também que as ciclodextrinas sejam solúveis em água e outras substâncias polares (ZHU et al., 2014). Na figura 6 está representada esquematicamente a formação de um complexo de inclusão com ciclodextrina, nesta imagem o p-xileno é a molécula hóspede e os pequenos círculos representam as moléculas de água.



**Figura 6.** Representação esquemática da formação de complexos de inclusão com ciclodextrinas.

Fonte: Martins e Veiga (2002).

Essa capacidade de incorporar compostos no interior da sua cavidade hidrofóbica é em função das ligações envolvidas na formação dos complexos, tais como força de Van der Waals, interações dipolo-dipolo e/ou pontes de hidrogênio. Essas ligações são consideradas fortes o suficiente para permitir a separação do complexo mesmo em estado sólido e fraco o suficiente para permitir a liberação da molécula encapsulada, quando necessário (VENTURINI et al., 2008).

A complexação com ciclodextrinas é uma alternativa interessante para aumentar a solubilidade aquosa das moléculas encapsuladas, bem como protegê-las contra reações de oxidação, degradação térmica e evaporação (KAMIMURA et al., 2014; SANTOS et al., 2015). Outra aplicação seria a encapsulação de aromas e sabor, visando mascarar aromas indesejáveis e consequentemente melhorar as características organolépticas dos alimentos (ZHANG et al., 2015). Além disso, a formação de complexos de inclusão permite sistemas de liberação controlada de aromas (KFOURY et al., 2014), e a complexação com compostos fenólicos presentes em vegetais, frutas e bebidas possibilita a redução do escurecimento enzimático desses alimentos (CARNEIRO et al., 2006).

As funcionalidades das ciclodextrinas as tornam atrativas para diversas aplicações nas mais variadas áreas, tais como indústrias de alimentos, químicas, farmacêuticas e têxteis, além de ser amplamente utilizadas no ramo da biotecnologia e agricultura (SCHÖFFER et al., 2013).

Uma das aplicações das ciclodextrinas é a formação de complexos de inclusão com óleos essenciais e outras substâncias voláteis, a fim de aumentar sua estabilidade, pois reduz significativamente suas perdas por evaporação, fornece proteção contra reações de oxidação, fotoestabilidade e estabilidade térmica, além de permitir sua liberação controlada (KFOURY et al., 2015a).

#### *2.4.1 Complexos de inclusão com óleos essenciais*

Segundo Marques (2010), diversos compostos altamente voláteis e quimicamente instáveis na presença de ar, luz, umidade e calor têm sido estudados na formação de complexos de inclusão com ciclodextrinas, dentre eles podem ser citados: citral, citronelal, linalol, mentol, óleo essencial de sálvia, de jasmim, de canela, de bergamota, de laranja, de limão, e outros monoterpenos como timol e geraniol. Os aromas desses compostos, quando inclusos nas ciclodextrinas, apresentam menor perda durante o armazenamento, como consequência de sua menor exposição à luz e ao oxigênio. Além disso, a complexação garante a eficácia em relação à atividade antimicrobiana de alguns óleos essenciais por um maior período de tempo (HILL et al., 2013).

Óleos essenciais são misturas complexas de compostos voláteis de baixo peso molecular e insolúveis em água (DIMA; DIMA, 2015), considerados instáveis e facilmente degradados por oxidação, volatilização, aquecimento e presença de luz se não estiverem protegidos de fatores externos (EL ASBAHANI et al., 2015). Óleos essenciais são obtidos a partir de diferentes técnicas de extração, tais como a destilação (incluindo a destilação por arraste à vapor), prensagem a frio e maceração (SOLÓRZANO-SANTOS; MIRANDA-NOVALES, 2012).

As frutas cítricas, tais como a laranja, o limão, a lima e as tangerinas são consideradas produtos básicos, sendo o Brasil o principal país produtor (BUSTAMANTE et al., 2016). Óleos essenciais extraídos a partir destas frutas cítricas apresentam em sua composição uma grande variedade de compostos, destes 85-99% são compostos voláteis, e os 1-15% restantes são compostos não voláteis. Os compostos voláteis são misturas de monoterpenos, sesquiterpenos e

sesquiterpenóides como aldeídos, cetonas, ácidos, álcoois e ésteres (RUIZ; FLOTATS, 2014; FAN et al., 2015).

Os óleos essenciais de citros são amplamente utilizados em alimentos devido às suas mais diversas aplicações, tais como, em bebidas, sorvetes e em produtos de panificação, além de serem utilizados em indústrias farmacêuticas devido ao seu efeito anti-inflamatório e antibacteriano (BOUKROUFA et al., 2015; ALPARSLAN et al., 2016).

O óleo essencial de laranja (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) é constituído por aproximadamente 98% de R-limoneno sendo os 2% restantes referentes a uma mistura de outros terpenos e aldeídos alifáticos. Devido à sua natureza insaturada, o óleo essencial de laranja é considerado quimicamente instável, podendo ser facilmente oxidado na presença de luz, ar ou umidade (GALVÃO et al., 2015). Diante disto, têm se buscado alternativas para garantir a estabilidade e proteção do óleo essencial de laranja. De acordo com Dima; Dima (2015), uma maneira de proteger os óleos essenciais durante o processamento, armazenamento e transporte é a encapsulação. Sendo assim, uma alternativa promissora é o uso de ciclodextrinas como agentes encapsulantes e formadores de complexos de inclusão com óleos essenciais.

## **2.5 Encapsulação**

A tecnologia de encapsulação tem recebido considerável interesse na área de alimentos devido aos seus vários campos de aplicações. A encapsulação pode ser definida como um processo para aprisionar uma substância (agente ativo) dentro de outra substância (material transportador) formando partículas ou cápsulas em escala micrométrica ou nanométrica. A substância encapsulada (agente ativo) também é designada como núcleo, preenchimento ou fase interna, enquanto os materiais de revestimento (material transportador) são conhecidos como material de parede, membrana, cápsula, casca ou matriz (NEDOVIC et al., 2011; DEVI et al., 2017).

A encapsulação possibilita que os agentes ativos sejam protegidos de várias condições drásticas, tais como luz, cisalhamento, oxigênio, umidade, calor ou outras condições extremas, aumentando assim a sua estabilidade e mantendo a sua viabilidade (DEVI et al., 2017). A encapsulação possibilita ainda a liberação controlada do agente ativo durante períodos prolongados e sob condições determinadas, contribui para o revestimento de sabores indesejáveis, a formação de

partículas sólidas, redução da perda de evaporação ou volatilidade, aumento da barreira de reatividade para compostos bioativos e melhoria da estabilidade física e biológica e vida útil de compostos bioativos (SHISHIR et al., 2018). Esta tecnologia tem sido amplamente utilizada em indústrias de alimentos com a finalidade de encapsular aromas e sabores (TALEGAONKAR et al., 2016).

Microencapsulação e nanoencapsulação são as duas formas principais da tecnologia de encapsulação, em que ambas têm a função de melhorar a funcionalidade do produto. As técnicas de microencapsulação e nanoencapsulação podem produzir microcápsulas (1 a 1000  $\mu\text{m}$ ), submicron-cápsulas (várias centenas de nanômetros a menos de 1  $\mu\text{m}$ ) e nanocápsulas (1 a várias centenas de nanômetros) (RODRÍGUEZ et al., 2016).

No processo de encapsulação, o primeiro passo é saber o tipo de sistema mais adequado para o composto ativo. Portanto, são necessárias algumas escolhas importantes, a primeira é a seleção de materiais encapsulantes adequados para o preparo do sistema encapsulado e a outra, é a técnica utilizada para a encapsulação. Materiais encapsulados devem ser reconhecidos como materiais “geralmente reconhecidos como seguros” (GRAS). Outro fator importante é considerar a funcionalidade que se deseja com a encapsulação, as concentrações adequadas, o mecanismo de liberação e o requisito de estabilidade (SHISHIR et al., 2018).

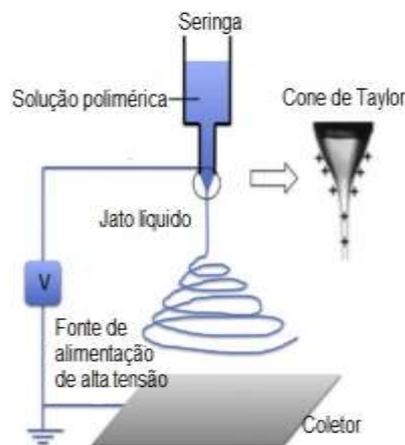
Os compostos aromáticos são considerados sistemas muito complexos e existem muitas variáveis que afetam a sua estabilidade (FATHI et al., 2014). Portanto, encapsular compostos voláteis antes de incorporá-los em alimentos ou bebidas é uma interessante alternativa para evitar perdas de aroma durante o processamento e minimizar as reações de degradação (VOS et al., 2010). Nesse sentido, a encapsulação é uma técnica que além de aumentar a estabilidade de óleos essenciais, aumenta sua solubilidade, diminuindo a necessidade de uso de surfactantes e aumentando a possibilidade de uso dos óleos essenciais como aditivos alimentares (OSÓRIO-TOBON et al., 2016).

Segundo El Asbahani et al. (2015) e Ribeiro-Santos et al. (2017), uma parte significativa da literatura trata da encapsulação de óleos essenciais como sendo cápsulas de tamanho micro ou nanométrico utilizadas com o intuito de protegê-los contra fatores ambientais, tais como: oxigênio, luz, umidade, pH e altas

temperaturas, além de conferir proteção aos seus compostos bioativos, mantendo assim suas propriedades, sejam elas antioxidantes, antimicrobianas, entre outras.

Dentre as técnicas utilizadas para a encapsulação, destaca-se a emulsificação, coacervação, extrusão, gelificação iônica, inclusão molecular, precipitação, liofilização, atomização, lipossomas dentre outras (RADÜNZ et al., 2018). Além destas técnicas, têm se destacado a técnica de *electrospraying*, um método de encapsulação que utiliza forças elétricas, podendo ser obtidas cápsulas de tamanho nanométrico. A principal vantagem desta técnica é a sua elevada eficiência de encapsulação e possibilidade de produção em uma única etapa. A formação de nanocápsulas depende de diversos fatores, tais como, da massa molecular polimérica, da evaporação do solvente, do fluxo e da tensão aplicada (ANANDHARAMAKRISHNAN, 2014).

No processo de *electrospraying* a aplicação de uma alta tensão elétrica à solução polimérica produz um jato carregado eletricamente, que pode ser dividido em gotículas, resultando em partículas de diferentes tamanhos e formas, coletadas pelo alvo ligado ao outro eletrodo (Figura 7) (ZAMANI et al., 2013).



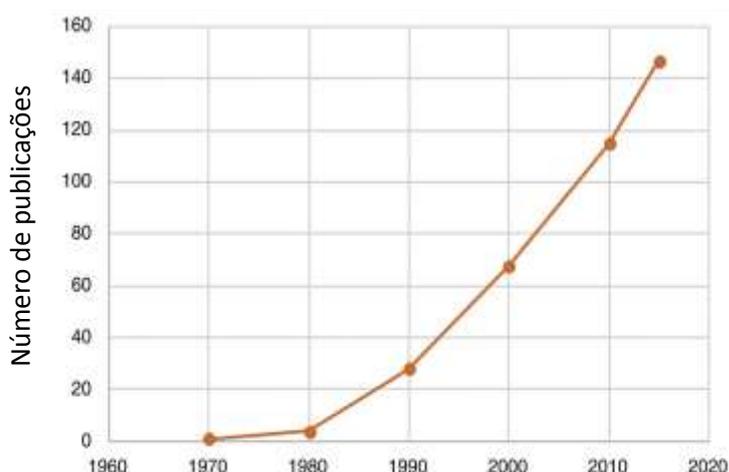
**Figura 7.** Representação esquemática do processo de *electrospraying*.

Fonte: Adaptado de Bhushani e Anandharamakrishnan (2014).

Outro fator que exerce influência na eficiência de encapsulação é o material de parede a ser utilizado. Embora um único polímero possa ser usado para encapsulação, nem sempre um único agente encapsulante possui todas as propriedades de um material de parede ideal, assim, recomenda-se uma

combinação de polímeros (RUTZ et al., 2016). Dentre os materiais de parede utilizados, destacam-se as ciclodextrinas, com potencial aplicação para encapsulação de compostos de sabor e aroma, proporcionando estabilidade à oxidação e às perdas por evaporação destes compostos (TALEGAONKAR et al., 2016).

O aumento exponencial das publicações relacionadas à utilização de ciclodextrinas como material de parede para encapsulação de aromas (Figura 8) e sua aplicação em alimentos revela o grande potencial desta tecnologia, que tem como principais vantagens a diminuição da volatilidade, o aumento da estabilidade e seu potencial mecanismo de liberação controlada (FENYVESI; SZENTE, 2016).



**Figura 8.** Número acumulado de artigos científicos utilizando ciclodextrinas como material de parede para encapsulação de aromas e sabores.

Fonte: Fenyvesi e Szente (2016).

A encapsulação adequada das moléculas ativas depende da sensibilidade desta (estabilidade térmica) e da natureza (solubilidade em óleo e água) dos componentes ativos. A liberação do componente ativo pode ser controlada por vários processos, tais como: processo mecânico, variações de pH (condições ácidas estomacais, neutras intestinais), ações enzimáticas ou ainda por outros estímulos externos (DEVI et al., 2017). Segundo Kfoury et al. (2016), a liberação de moléculas ativas encapsuladas em ciclodextrinas é principalmente influenciada por fatores ambientais específicos, como temperatura e umidade relativa (UR), sendo o “gatilho” da liberação ativado em temperaturas acima de 100°C e umidades relativas acima de 75%.

## **2.6 Materiais encapsulados em alimentos**

Materiais encapsulados são aplicados em alimentos visando principalmente o fornecimento de suplementos, alterações na solubilidade, sabor, textura e cor, além de fornecer compostos com propriedades antioxidantes e antimicrobianos. Existem vários processos de encapsulação patenteados por indústrias para uso em alimentos. No entanto, apenas alguns estudos relacionados à aplicação de compostos encapsulados em alimentos foram relatados, como por exemplo, aplicação de microcápsulas contendo licopeno em bolo, óleo de linhaça em pão, curcumina em sorvete e iogurte e pigmentos de pimentão vermelho em iogurte (RUTZ et al., 2016).

Segundo He e Hwang (2016), as principais aplicações de materiais encapsulados em alimentos são: na proteção contra deterioração microbiológica, através de agentes antimicrobianos e aumento da biodisponibilidade de compostos bioativos; no aperfeiçoamento das propriedades físicas dos alimentos, através do uso de aditivos de cor, antiaglomerantes entre outros; em embalagens ativas e inteligentes; na encapsulação de sabores e aromas e compostos bioativos e na segurança alimentar. Na área de embalagens, a encapsulação apresenta aplicações tais como, aumentar a vida útil do produto através do desenvolvimento de embalagens ativas com propriedades antimicrobianas, que reduzem a carga microbiana superficial no alimento (HANDFORD et al., 2014).

No processamento de alimentos, a encapsulação auxilia no desenvolvimento de novos produtos, onde o uso de ingredientes alimentares encapsulados oferece melhorias em propriedades de consistência, sabor e textura (CUSHEN et al., 2012). Nesse contexto, uma possível aplicação de materiais encapsulados em alimentos é a encapsulação de óleos essenciais e sua aplicação como aditivos alimentares em bolos, visando conferir a melhoria das suas propriedades físicas e sensoriais e estabilidade durante a vida útil, além de melhorar a solubilidade em água, a estabilidade térmica e a biodisponibilidade dos compostos encapsulados (EZHILARASI et al., 2013).

## **2.7 Materiais encapsulados em panificação**

A adição de materiais específicos encapsulados em formulações alimentícias pode surgir como uma maneira de superar algumas questões de processamento, a

fim de obter vantagens tecnológicas e/ou nutricionais. Este tema é particularmente importante em produtos de panificação, visto que a panificação é um processo complexo onde ocorre uma série de reações químicas, principalmente no momento do forneamento. Contudo, o uso de ingredientes encapsulados na panificação se concentra basicamente na encapsulação de ingredientes como: ômega-3, ácidos graxos poliinsaturados (PUFAs), cloreto de sódio, curcumina e probióticos (VITAGLIONE et al., 2015).

Um desafio na área de panificação é o uso de compostos bioativos, uma vez que estes possuem estabilidade limitada. Nesse sentido, a encapsulação destes compostos pode permitir seu uso em alimentos altamente processados termicamente e no desenvolvimento de produtos funcionais de panificação (MALMO et al., 2013). No entanto, nem todas as cápsulas apresentam resistência ao processamento térmico, assim, o uso de ingredientes encapsulados em produtos de panificação ainda é um desafio tecnológico, uma vez que as condições de temperatura e pressão ocasionadas pelo forneamento podem causar rompimento do revestimento tornando as cápsulas não mais adequadas aos objetivos pretendidos (VITAGLIONE et al., 2015). Nesse sentido, buscam-se estratégias de encapsulação que ofereçam alternativas para favorecer a liberação controlada de moléculas que contribuam para o aroma, além da formação de compostos antioxidantes e/ou antimicrobianos.

Embora esteja amplamente difundido o uso de óleos essenciais como conservantes e aromatizantes naturais em alimentos, ainda existem poucos relatos na literatura sobre o uso de óleos essenciais, encapsulados ou não, em produtos de panificação.

Gonçalves et al. (2017) encapsularam óleo essencial de tomilho (*Thymus vulgaris*) pelo método de coacervação complexa e verificaram sua atividade contra microrganismos patogênicos comuns em alimentos, empregando bolo como o sistema modelo para simular a aplicação da micropartícula em produtos de panificação. As micropartículas aplicadas em amostras de bolos conferiram proteção contra a volatilização do óleo encapsulado e promoveu uma vida útil mínima de 30 dias sem o uso de conservantes sintéticos.

Debonne et al. (2018) investigaram a atividade antifúngica do óleo essencial de tomilho (*Thymus zygis*) *in vitro*, para validar a sua atividade antifúngica em pão de trigo e em massa fermentada frente às cepas de *Aspergillus niger* e *Penicillium*

*paneum*. Apesar do promissor potencial *in vitro* do óleo de tomilho, não foi observada uma extensão da vida de útil dos pães. Além disso, propriedades importantes como volume, cor e sabor dos pães foram negativamente afetadas pelo óleo essencial de tomilho. Assim, a fim de permitir uma maior preservação do pão e a manutenção das propriedades tecnológicas e sensoriais, uma sugestão é trabalhar com óleos menos aromáticos.

Ju et al. (2018) estudaram o efeito dos óleos essenciais de canela e cravo contra o crescimento fúngico em bolo de feijão verde e bolo de limão, avaliando também os efeitos desses dois óleos essenciais e seus métodos de aplicação sobre a vida útil dos produtos em embalagens convencionais e a vácuo, através de teste de armazenamento acelerado. A avaliação sensorial mostrou que a adição dos óleos essenciais não apresentou diferença significativa no cheiro e sabor dos produtos. O teste de armazenamento acelerado revelou que a adição de óleo essencial de canela se mostrou mais eficiente no controle fúngico, podendo prolongar a vida útil do bolo de feijão verde e do bolo de limão em embalagem convencional por 9-10 e 3-4 dias, respectivamente. Nas embalagens a vácuo, o óleo essencial de canela prolongou a vida útil do bolo de feijão verde e do bolo de limão para mais de 15-16 e 8–9 dias, respectivamente.

Óleos essenciais de citros também têm sido amplamente relatados como conservantes naturais devido ao seu aroma agradável e suas propriedades antimicrobianas (DONSÌ; FERRARI, 2016; Li et al., 2018). Na literatura encontram-se diversos relatos sobre o uso destes óleos essenciais como uma alternativa viável no controle do crescimento de *Aspergillus flavus* e *Penicillium verrucosum* entre outros fungos comumente associados à deterioração de produtos de panificação (SIMAS et al., 2017). Porém não há relatos de sua aplicação em produtos de panificação. Nesse sentido, o óleo essencial de laranja surge como uma alternativa interessante para o controle do crescimento de *Aspergillus* spp. e contribuição do aroma em bolos.



### **3 Capítulo 1 – Artigo publicado**

#### **Produção, caracterização e estabilidade de complexo de inclusão entre $\beta$ -ciclodextrina/óleo essencial de laranja**

Artigo publicado no periódico *Journal of Food Science*

Qualis 2012-2016 em Ciência de Alimentos: A2

Fator de impacto: 2,018

v. 82, p. 2598-2605, 2017

<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1111/1750-3841.13923>

ISSN 1750-3841



## Resumo

O objetivo deste estudo foi produzir e caracterizar complexos de inclusão entre  $\beta$ -ciclodextrina ( $\beta$ -CD) e óleo essencial de laranja (OEL) comparando-os com os seus compostos puros e mistura física. As amostras foram avaliadas por composição química, morfologia, estabilidade térmica e compostos voláteis por cromatografia gasosa de *headspace* estática (SH-GC). Comparando-se o óleo essencial livre e a mistura física com o complexo de inclusão, foram observadas diferenças na composição química, estabilidade térmica e morfologia. Essas diferenças mostram que houve a formação do complexo de inclusão e demonstra a necessidade do método de precipitação utilizado para garantir a interação entre a  $\beta$ -CD e o óleo essencial. A lenta perda dos compostos voláteis do óleo essencial quando complexados com  $\beta$ -CD, demonstra sua maior estabilidade quando comparada à sua mistura física e o óleo essencial de laranja na forma livre. A aplicação da  $\beta$ -CD na formação de complexos de inclusão com OEL pode ampliar as possíveis aplicações em alimentos.

**Palavras-chave:**  $\beta$ -ciclodextrina, óleo essencial de laranja, complexo de inclusão, compostos voláteis



### 3.1 Introdução

As ciclodextrinas (CDs) são oligossacarídeos cíclicos não redutores, compostos por seis ( $\alpha$ -ciclodextrina), sete ( $\beta$ -ciclodextrina) ou oito ( $\gamma$ -ciclodextrina) unidades de glicose unidas por ligações  $\alpha$ -1,4 glicosídicas (KURKOV; LOFTSSON, 2013). As CDs são obtidas a partir da degradação enzimática do amido pela enzima ciclodextrina glicosiltransferase (ABARCA et al., 2016) que catalisa quatro tipos de reações, hidrólise, transglicosilação/ciclização, acoplamento e desproporção (DURA; ROSELL, 2016, ROMÁN et al., 2016).

As CDs possuem uma estrutura peculiar, com extremidades essencialmente hidrofílicas, o que favorece a sua solubilização em água e outras substâncias polares, enquanto a sua cavidade interior é de caráter hidrofóbico (ZHU et al., 2014). Essa característica é responsável pela formação de complexos de inclusão com substâncias orgânicas e inorgânicas, alterando suas características físicas e químicas (SHAO et al., 2014) e favorecendo sua aplicação em diferentes áreas, incluindo aquelas relacionadas à alimentos, produtos farmacêuticos, cosméticos, produtos químicos, agricultura e biotecnologia (LI et al., 2014; MORIWAKI et al., 2014).

A formação e a estabilidade do complexo de inclusão dependem da compatibilidade entre a CDs e a molécula bioativa. Portanto, diferentes tipos de CDs ( $\alpha$ -CD,  $\beta$ -CD e  $\gamma$ -CD) podem ter capacidades diferentes para aprisionar uma mesma molécula e, assim, o tipo de CDs utilizada depende da finalidade a que se destina e do tipo de molécula que se deseja hospedar (FATHI et al., 2014). Entre as CDs, a  $\beta$ -CD é a mais utilizada, porque a sua cavidade permite hospedar moléculas na faixa de pesos moleculares da maioria das moléculas normalmente “encapsuladas”, geralmente com um peso molecular entre 200 e 800 g.mol<sup>-1</sup>. Outro fator que favorece sua utilização é a facilidade de produção, maior estabilidade e menor solubilidade em água, facilitando a sua separação de outras CDs e reduzindo seu custo (SANTOS et al., 2015, TAO et al., 2014).

Na área de alimentos, as CDs são principalmente aplicadas na formação de complexos de inclusão em substâncias com sensibilidade a altas temperaturas, como por exemplo, óleos essenciais. O óleo essencial de laranja (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) é constituído de uma mistura de terpenos, hidrocarbonetos e oxigenados, que devido à sua estrutura insaturada, são considerados quimicamente instáveis, facilmente oxidados na presença de ar, luz e umidade (GALVÃO et al., 2015). A

formação do complexo de inclusão entre  $\beta$ -CD e óleo essencial de laranja poderia aumentar a solubilidade em água, a estabilidade à luz e à temperatura deste óleo, o que proporcionaria a proteção contra a oxidação, e a redução de efeitos fisiológicos indesejados de sua volatilidade (HILL et al., 2013; KAMIMURA et al., 2014).

Neste contexto, objetivou-se com o estudo produzir complexo de inclusão entre  $\beta$ -CD e óleo essencial de laranja. A fim de avaliar a eficiência do método de complexação, o complexo de inclusão foi comparado com o composto puro ( $\beta$ -CD) e sua mistura física (óleo essencial de laranja e  $\beta$ -CD). As amostras foram avaliadas quanto à sua composição química, térmica, morfológica, eficiência de complexação e a estabilidade dos complexos de inclusão a partir da análise de voláteis pela técnica de *headspace* estático.

## 3.2 Material e métodos

### 3.2.1 Material

As laranjas da variedade Valência [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck] foram coletadas em setembro de 2015 na cidade de Pelotas, Brasil. A  $\beta$ -CD comercial (97% de pureza) foi adquirida na Sigma-Aldrich (USA).

### 3.2.2 Extração do óleo essencial de laranja

Para a extração do óleo essencial, inicialmente as cascas foram congeladas, visando aumentar a superfície de contato, o que resulta em um maior rendimento do processo. Após, 30 g de cascas de laranja congeladas foram trituradas com 300 mL de água destilada na proporção de (1:10; m/v). A extração foi realizada por hidrodestilação utilizando extrator Clevenger, conectado a um balão de fundo redondo de 2000 mL, com uma manta de aquecimento como fonte de calor. Após 3 horas, o óleo essencial foi recolhido e acondicionado em ultra freezer a  $-20^{\circ}\text{C} \pm 2$  em frascos de vidro âmbar selados com parafilme até ao momento das análises.

### 3.2.3 Caracterização do óleo essencial de laranja por cromatografia gasosa

Para a identificação dos componentes, o óleo essencial de laranja foi analisado por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (GC-MS), utilizando coluna não capilar (30 m x 0,25 mm x 0,25  $\mu\text{m}$ ). O gás de arraste utilizado foi hélio, sob fluxo de  $1,2 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ . A temperatura foi mantida a  $60^{\circ}\text{C}$  durante 2 min e depois gradualmente aumentada  $4^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$  até atingir  $220^{\circ}\text{C}$ , o tempo total de corrida foi de

41 min. Os espectros de massa foram registados na faixa de 30 a 450 m / z e o volume injetado foi de 0,1  $\mu$ L. Os componentes individuais foram identificados comparando com seus respectivos espectros de massa e com a biblioteca interna. A composição percentual foi obtida a partir da integral dos picos.

#### 3.2.4 *Preparo do complexo de inclusão e da mistura física*

O complexo de inclusão entre óleo essencial de laranja (OEO) e  $\beta$ -ciclodextrina ( $\beta$ -CD) foi preparado pelo método de precipitação, de acordo com a metodologia descrita por Bhandari et al. (2010) com algumas modificações. Dissolveu-se uma amostra de 2 g de  $\beta$ -CD em 50 mL de água destilada mantida a 35°C em placa de aquecimento e adicionou-se lentamente 1,5 g de óleo essencial à solução quente. A mistura foi continuamente agitada e mantida a 35°C durante 3 h. Quando a temperatura diminuiu espontaneamente para a temperatura ambiente, a solução permaneceu durante a noite sob refrigeração a 5°C. Recuperou-se o material precipitado por filtração sob vácuo. O precipitado foi lavado com etanol a 99% e seco em estufa com circulação forçada de ar a 50°C durante 24 h. O complexo de inclusão obtido foi armazenado e refrigerado em frascos selados.

Com o intuito de avaliar a eficácia do método de complexação, foi preparada uma mistura física (MF) entre o óleo essencial de laranja e  $\beta$ -CD na proporção de 1:1 (m/m) utilizando grau e pistilo. Posteriormente, a mistura foi armazenada em vidros devidamente selados e mantidos sob refrigeração (4°C).

#### 3.2.5 *Caracterização do complexo de inclusão e da mistura física*

##### 3.2.5.1 *Morfologia*

As morfologias da  $\beta$ -CD comercial, do complexo de inclusão de  $\beta$ -CD-OEL e da mistura física foram obtidas em microscópio eletrônico de varredura utilizando uma voltagem de aceleração de 10 kV e uma ampliação de 2000x.

##### 3.2.5.2 *Propriedades térmicas*

###### 3.2.5.2.1 *Calorimetria diferencial de varredura (DSC)*

A análise térmica das amostras foi realizada utilizando calorímetro diferencial de varredura (DSC, TA-60WS, Shimadzu, Kyoto, Japão) utilizando aproximadamente 3 mg da amostra em cadinhos de alumínio sob atmosfera dinâmica de nitrogênio (50

mL/min) e taxa de aquecimento de 10°C/min, em uma faixa de temperatura de 30-300°C.

### 3.2.5.2 Análise termogravimétrica (TGA)

A estabilidade térmica das amostras foi avaliada utilizando um analisador termogravimétrico (TGA, TA-60 WS, Shimadzu, Kyoto, Japão). As amostras ( $\pm 5$  mg) foram aquecidas na faixa de temperatura de 30-600°C, a uma taxa de aquecimento de 10°C/min, sob atmosfera de nitrogênio (50 mL/min).

### 3.2.5.3 Identificação dos grupos funcionais - espectros de infravermelho

Os espectros de infravermelho das amostras foram obtidos em espectrofotômetro com transformada de Fourier (IR Prestige-21; Shimadzu) na região de 4000-400  $\text{cm}^{-1}$ . Foram preparadas pastilhas a partir da mistura das amostras com KBr em uma proporção de 1:100 (amostra: KBr). Foram recolhidas 100 leituras a uma resolução de 4  $\text{cm}^{-1}$ . As medidas foram coletadas em absorvância.

### 3.2.6 Eficiência de complexação

A eficiência de complexação do complexo de inclusão foi determinada conforme metodologia descrita por Wen et al. (2016). Pesou-se 20-30 mg do complexo de inclusão e misturou-se com água destilada (20 mL) e acetato de etila (10 mL) em um balão volumétrico de 100 mL. A solução foi então aquecida em chapa de aquecimento a 85 °C durante 20 min, com agitação intermitente. A fase orgânica contendo os compostos voláteis foi decantada e a fase aquosa foi extraída com acetato de etila duas vezes (2 x 5 ml) a 85 °C utilizando o método descrito acima. A concentração de óleo essencial de laranja em acetato de etila foi determinada por espectrofotômetro UV-Visível (UV-2550, Shimadzu, Japão) utilizando uma curva padrão do óleo essencial de laranja, em concentrações de 2-8 mg/ml de óleo essencial de laranja em acetato de etila, seguindo-se a leitura da absorvância da solução a 292 nm. A eficiência de complexação (EC) foi calculada conforme a Equação 1.

$$EC (\%) = \frac{\text{Encapsulado (g)}}{\text{Total complexo de inclusão (g)}} \times 100 \quad \text{Eq. (1)}$$

### 3.2.7 Identificação e quantificação de voláteis

O complexo de inclusão, a mistura física e o óleo essencial livre foram pesados e condicionados em frascos de vidro de 20 mL para a análise do *headspace* estático segundo Kfoury et al. (2015a), com algumas modificações. Os frascos foram vedados por meio de um septo de silicone/PTFE e submetidos ao banho-maria termostaticado a uma temperatura de  $30 \pm 0,1$  °C. Após o tempo de 30 min necessários para o equilíbrio entre a amostra e a fase gasosa, a amostragem foi conduzida manualmente usando uma seringa gas-tight (SGE, Austrália). O volume do *headspace* amostrado foi de 1 mL e injetado diretamente na porta de injeção do cromatógrafo a uma temperatura de 250 °C no modo split de razão 1:20. Todas as injeções foram realizadas em um cromatógrafo a gás Varian Star 3400CX (CA, EUA) equipado com um detector de ionização de chama (GC-FID). Os compostos foram separados numa coluna capilar apolar de sílica fundida BPX 5 (25 m × 0,22 mm × 0,25 µm) (SGE, Austrália). O hidrogênio foi utilizado como gás de arraste a uma pressão constante de 10 psi. A temperatura inicial da coluna foi ajustada para 40°C e mantida durante 0,5 min. Em seguida, um gradiente de temperatura foi iniciado subindo a 4 °C min<sup>-1</sup> até 80°C, seguido por um aumento a 10 °C.min<sup>-1</sup> até 230°C e mantida em condições isotérmicas durante 2 min. A temperatura do detector foi mantida a 250 °C. Uma série de n-alcenos homólogos foram analisados sob as mesmas condições cromatográficas para calcular o índice de retenção linear (LRI). A quantidade percentual relativa de cada composto identificado foi obtida a partir da área do pico obtida no FID.

A análise qualitativa dos compostos foi efetuada por um cromatógrafo gasoso Shimadzu QP2010 Ultra acoplado a espectrômetro de massas (GC/MS, Shimadzu Corporation, Japão). Para estas análises, foram usadas as mesmas condições cromatográficas acima descritas e hélio foi utilizado como o gás de arraste. O detector foi operado no modo de ionização por impacto de elétrons com uma energia de ionização de 70 eV e um intervalo de varredura de massas 35-350 m/z. Os analitos foram identificados com base na comparação com os espectros de massas disponível na biblioteca National Institute of Standards and Technology (NIST) e por comparação dos índices de retenção linear calculados com aqueles disponíveis na literatura científica.

### 3.2.8 Estabilidade do complexo de inclusão

A estabilidade do complexo de inclusão em relação ao percentual de retenção de voláteis foi avaliada no dia do preparo dos complexos de inclusão e 7 e 14 dias após. O percentual de retenção ( $r$ ) do OEL pela  $\beta$ -CD foi determinado de acordo com Kfoury et al. (2015a), com algumas modificações, e expressa conforme Equação 2.

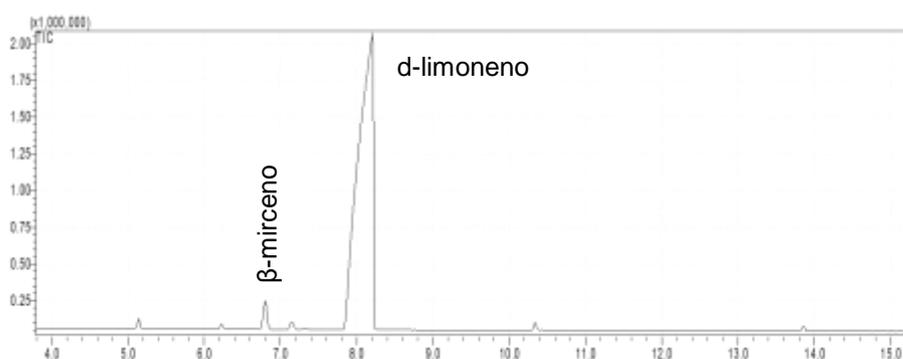
$$r (\%) = \left(1 - \frac{\sum ACD}{\sum A0}\right) \times 100 \quad \text{Eq. (2)}$$

Onde  $\sum A0$  e  $\sum ACD$  referem-se a soma das áreas dos picos de cada componente do OEL na ausência e na presença de  $\beta$ -CD, respectivamente.

## 3.3 Resultados e discussão

### 3.3.1 Cromatografia gasosa do óleo essencial de laranja

A análise de óleo essencial de laranja por GC-MS permitiu a identificação de 100% dos componentes integrados como mostrado na Figura 9.



**Figura 9.** Perfil cromatográfico do óleo essencial de laranja

Foi possível identificar sete constituintes, sendo o d-limoneno (95,56%) o principal componente, seguido de  $\beta$ -mirceno (2,35%), octanal (0,55%),  $\alpha$ -pineno (0,54%),  $\beta$ -linalol (0,45%), ciclohexeno (0,29%) e decanal (0,26%). Estes resultados foram semelhantes aos encontrados por Galvão et al. (2015), que caracterizaram o óleo essencial de laranja e também identificaram sete compostos, sendo o limoneno (96,30%) o componente principal, seguido de mirceno (2,11%),  $\alpha$ -pireno (0,66%), incluindo alguns outros componentes em menores concentrações. Segundo Hashtjin; Abbasi (2015), os compostos limoneno e mirceno são os principais

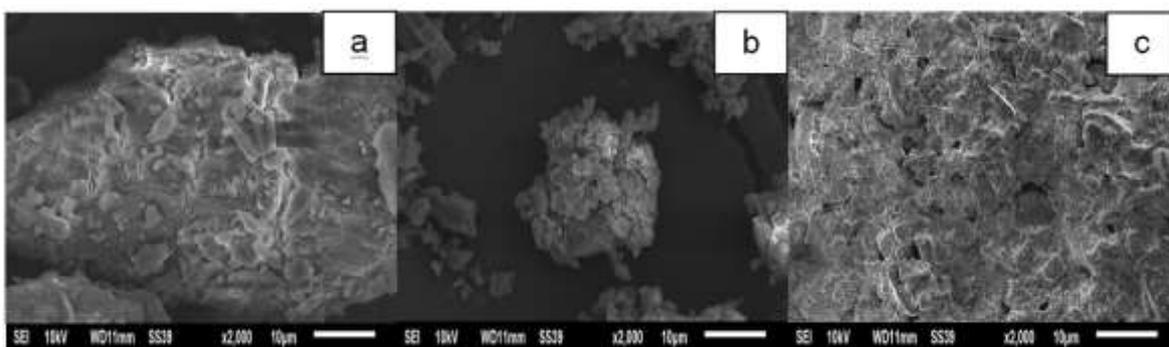
constituintes do óleo essencial de laranja, representando 95% e 2%, respectivamente.

De acordo com Gonçalves et al. (2015), os óleos essenciais de citros são caracterizados como misturas de muitos componentes, incluindo terpenos, sesquiterpenos, aldeídos, álcoois e ésteres e podem ser descritos como uma mistura de hidrocarbonetos terpênicos, compostos oxigenados e resíduos não voláteis. Entretanto, fatores como a época de colheita, a forma de cultivo, as condições climáticas, a genética, o método de extração, o estresse hídrico, o período e as condições de armazenamento podem influenciar a composição química dos óleos essenciais (DIMA; DIMA, 2015). Calo et al. (2015) identificaram aproximadamente 400 compostos em óleos essenciais de citros, e relataram que a quantidade destes compostos depende principalmente dos métodos de extração e das cultivares de citros.

### 3.3.2 Caracterização do complexo de inclusão e mistura física

#### 3.3.2.1 Morfologia

As morfologias da  $\beta$ -CD, do complexo de inclusão e da mistura física são mostradas nas Figuras 10a, 10b e 10c, respectivamente.



**Figura 10.** Microscopia eletrônica de varredura (MEV) da  $\beta$ -CD (a), do complexo de inclusão (b) e da mistura física (c).

A cavidade hidrofóbica da  $\beta$ -CD tem a capacidade de acomodar vários tipos de moléculas hóspedes para formar complexos de inclusão com morfologias diferentes (ZHANG et al., 2015). A  $\beta$ -CD pura apresentou tamanho de partícula e formato irregular (Figura 10a). Por outro lado, o complexo de inclusão, quando comparado à morfologia da  $\beta$ -CD pura, apresentou alterações no tamanho e na forma das

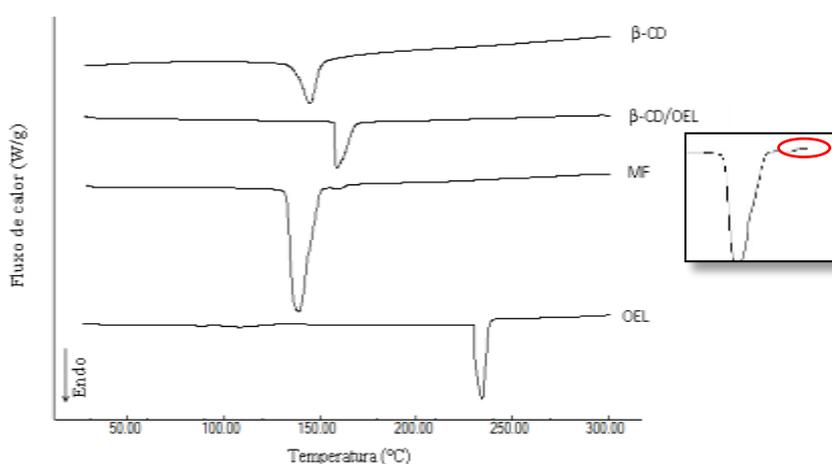
partículas (Figura 10b) sugerindo uma alteração da estrutura, o que pode indicar a formação de um complexo, diferindo também da estrutura observada na mistura física (Figura 10c). Galvão et al. (2015) avaliaram a morfologia de um complexo de inclusão entre  $\beta$ -CD e óleo essencial de laranja e também observaram mudanças na forma e tamanho de partícula quando comparado à  $\beta$ -CD pura.

Wen et al. (2016) avaliaram a morfologia do complexo de inclusão de  $\beta$ -CD e óleo essencial de canela e relataram que a  $\beta$ -CD apareceu com partículas de diferentes tamanhos em blocos retangulares, enquanto que a amostra referente ao complexo de inclusão apresentava-se sob a forma de cristais em multi-camadas. Assim, a diferença de morfologia entre o complexo de inclusão e a  $\beta$ -CD sugere a formação de um complexo de inclusão.

### 3.3.2.2 Propriedades térmicas

#### 3.3.2.2.1 Calorimetria diferencial de varredura (DSC)

Análise térmica é amplamente utilizada para a avaliação de complexos de inclusão. As curvas de DSC de todas as amostras são mostradas na Figura 11.



**Figura 11.** Curvas de DSC da  $\beta$ -CD, do complexo de inclusão  $\beta$ -CD/OEL, da mistura física (MF) e do óleo essencial de laranja (OEL).

A  $\beta$ -CD pura apresentou um único pico endotérmico a 144,6 °C, que está relacionado à perda de água dentro da cavidade hidrofóbica de  $\beta$ -CD (WANG et al., 2011). O complexo de inclusão apresentou um pico endotérmico a 159,0°C menos pronunciado do que a  $\beta$ -CD pura (Figura 11). Zhang et al. (2015) encontraram um

pico de intensidade reduzida no complexo de inclusão de trans-anetol e  $\beta$ -ciclodextrina e sugeriram que parte da água que estava inicialmente presente na cavidade da  $\beta$ -CD foi deslocada pelo óleo, devido à sua maior afinidade pela cavidade hidrofóbica da  $\beta$ -CD, confirmando a formação do complexo.

O pico endotérmico a 234°C observado no termograma de óleo essencial de laranja não foi detectado nos termogramas do complexo de inclusão (Figura 11), o que indica uma maior estabilidade do óleo essencial complexado quando comparado com o óleo essencial livre. Tao et al. (2014) também encontraram um pico endotérmico de 268°C apenas no óleo de tomilho, não sendo este pico observado no termograma do complexo de inclusão. Segundo esses autores, o óleo de tomilho foi protegido na cavidade hidrofóbica da  $\beta$ -CD, confirmando a formação do complexo de inclusão. Além disso, no termograma da mistura física foi observado o aparecimento de dois picos endotérmicos (Figura 11), sugerindo que não houve uma boa interação entre  $\beta$ -CD e o óleo essencial de laranja. Isto demonstra a necessidade do método de precipitação para a formação do complexo de inclusão.

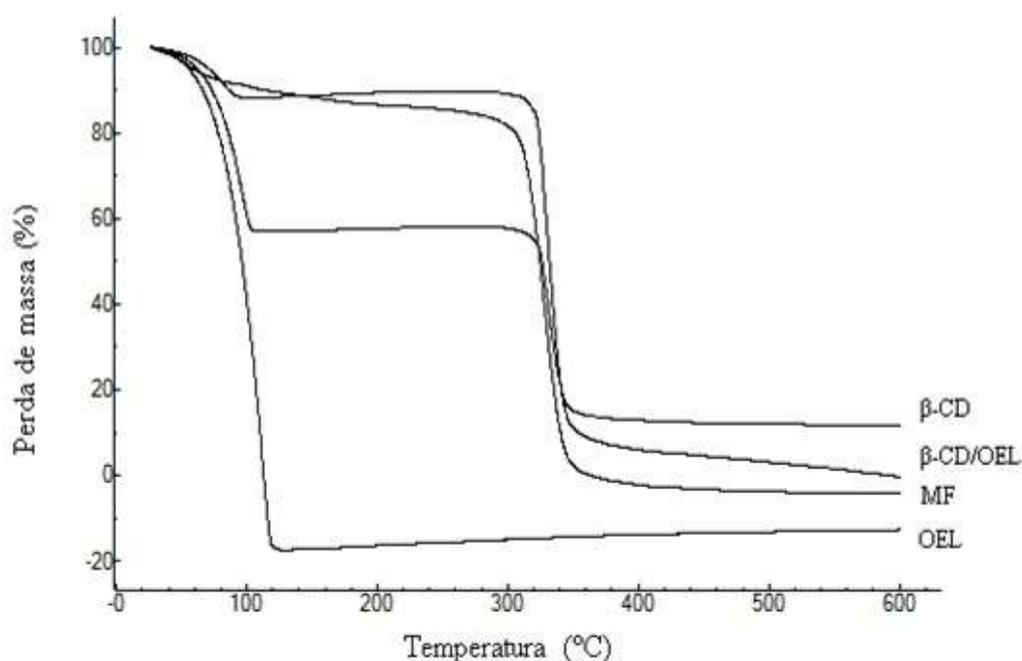
De acordo com Mura (2015), modificações na forma e temperatura do pico da banda de desidratação da CD, coincidindo com o desaparecimento do pico de fusão da molécula hóspede, estão diretamente relacionadas com a formação de complexos de inclusão. Além disso, a presença de dois picos na curva de DSC de misturas físicas refere-se à desidratação da CD e ao pico de fusão das moléculas hóspedes.

No termograma do óleo essencial de laranja livre, foi apresentado um pico a 234 °C, provavelmente relacionado ao d-limoneno, componente principal do óleo essencial de laranja, confirmado pela análise de CG-MS (Figura 9). Também foram encontrados picos de menor intensidade a 82°C e 100°C relacionados com a volatilização dos demais constituintes do óleo.

#### 3.3.2.2.2 Análise termogravimétrica (TGA)

Os perfis termogravimétricos de  $\beta$ -CD, do complexo de inclusão, da mistura física e do óleo essencial estão ilustrados na Figura 12. A decomposição térmica da  $\beta$ -CD ocorreu em dois estágios, um de 60 a 90°C e outro de 324°C a 341°C (Figura 12). O primeiro estágio com uma perda de massa de 9,9% pode ser atribuído à evaporação da água ligada à  $\beta$ -CD e o segundo à decomposição térmica da  $\beta$ -CD. Neste estágio, 73,6% da massa foi perdida. Segundo Mura (2015) e Trotta et al.

(2000), as curvas de TGA da  $\beta$ -CD são caracterizadas por duas perdas de massa distintas: a primeira, ocorrendo a temperaturas próximas de 100°C, devida à desidratação da  $\beta$ -CD, enquanto a segunda etapa ocorre a temperaturas superiores a 300°C, devido à decomposição da ciclodextrina.



**Figura 12.** Curva da análise termogravimétrica da  $\beta$ -CD, do complexo de inclusão  $\beta$ -CD/OEL, da mistura física (MF) e do óleo essencial de laranja (OEL).

No termograma do complexo de inclusão observou-se também dois estágios, o primeiro atribuído à perda de água da  $\beta$ -CD e o segundo a decomposição da  $\beta$ -CD (Figura 12). O primeiro estágio, referente à evaporação da água ligada à  $\beta$ -CD, pode ser atribuída à redistribuição e a redução de água contida na cavidade da  $\beta$ -CD. De acordo com Zhang et al. (2015), a substituição das moléculas de água que se ligam a  $\beta$ -CD por uma molécula hidrofóbica apropriada é a principal "força motriz" para a formação de complexos.

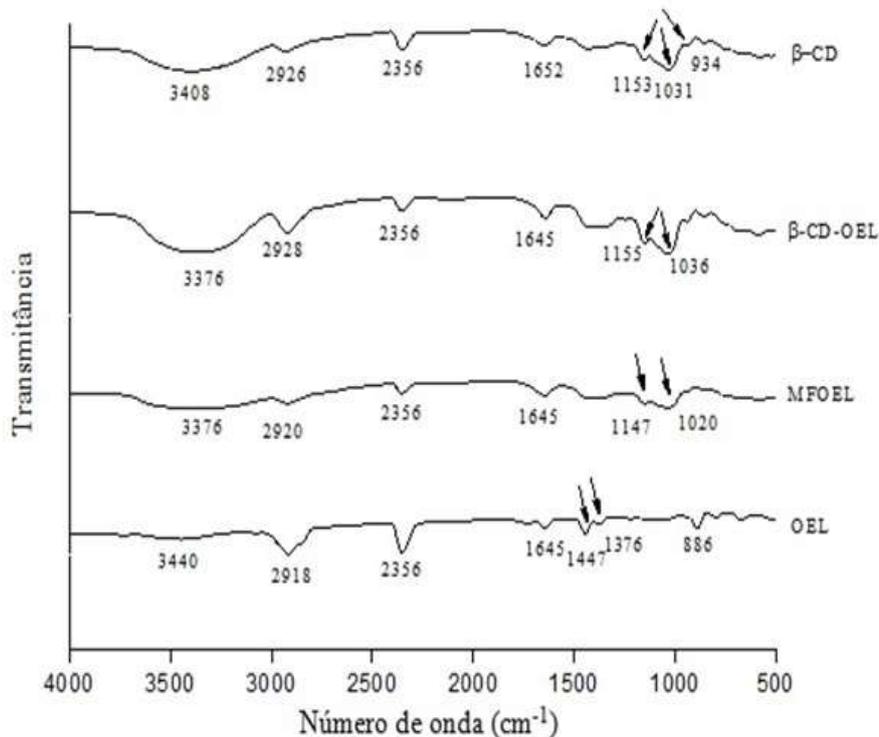
Comparando o complexo de inclusão com a mistura física e a  $\beta$ -CD pura, foi observado que a temperatura inicial de decomposição do complexo de inclusão foi superior à da mistura física e da  $\beta$ -CD pura. Esse comportamento sugere que o complexo de inclusão foi mais termicamente estável quando comparado às demais amostras (MENEZES et al., 2012).

A curva de TGA da mistura física apresentou dois estágios de perda de massa, o primeiro de 30°C a 150°C, relacionado com a degradação do óleo e o segundo de 324 a 342°C, atribuído à decomposição da  $\beta$ -CD pura.

Devido à sua alta volatilidade, o óleo essencial livre apresentou perda de massa de 100% na faixa de temperatura de 30-150°C (Figura 12). A mistura física apresentou dois estágios de perda de massa, o primeiro de 30° a 150°C, relacionado com a degradação do óleo e o segundo de 324 a 342°C, atribuído à decomposição da  $\beta$ -CD pura. No entanto, no termograma do complexo de inclusão não foi observado o estágio referente à decomposição do óleo essencial. Este resultado sugere que a complexação com  $\beta$ -CD aumentou a estabilidade térmica do óleo essencial, como observado também em outros estudos (MURA, 2015; ABARCA et al., 2016).

### 3.3.2.3 Identificação dos grupos funcionais - espectros de infravermelho

A Figura 13 apresenta os espectros de FTIR da  $\beta$ -CD pura, do complexo de inclusão, da mistura física e do óleo essencial de laranja.



**Figura 13.** Espectros de FTIR da  $\beta$ -CD, do complexo de inclusão ( $\beta$ -CD-OEL), da mistura física (MF) e do óleo essencial.

O espectro da  $\beta$ -CD pura apresentou bandas características a  $3408\text{ cm}^{-1}$  e  $2926\text{ cm}^{-1}$  correspondendo a grupos de vibração de estiramento O-H e C-H, respectivamente. As bandas de absorção a  $1652\text{ cm}^{-1}$ ,  $1153\text{ cm}^{-1}$ ,  $1031\text{ cm}^{-1}$  e  $934\text{ cm}^{-1}$  correspondem à ligação H-O-H, alongamento de grupos C-O e vibração de alongamento simétrico C-O-C de estiramento de ligações  $\alpha$ -1,4, respectivamente (ZHANG et al., 2015; ABARCA et al., 2016; WEN et al., 2016).

No espectro do complexo de inclusão pode ser observada uma diminuição acentuada da banda em  $3408\text{ cm}^{-1}$  em relação à observada no espectro da  $\beta$ -CD pura (Figura 13). Além disso, a banda em  $1447\text{ cm}^{-1}$ , característica do óleo essencial, não foi observada no espectro do complexo de inclusão. Resultado semelhante foi encontrado por Galvão et al. (2015), que avaliaram o complexo de inclusão de óleo essencial de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck e  $\beta$ -CD. Estes autores observaram uma redução da intensidade de algumas bandas características de óleo essencial e desaparecimento de outras, indicando a interação de óleo essencial dentro da cavidade de  $\beta$ -CD. Alterações nas bandas características da molécula hóspede, tais como desaparecimento, alargamento, variações na intensidade de pico são resultados da restrição das vibrações de estiramento da molécula hóspede causada pela inclusão na cavidade da  $\beta$ -CD (MURA, 2015). De acordo com Oliveira et al. (2011), a inserção da molécula hóspede na cavidade da  $\beta$ -CD pode causar uma restrição conformacional, que conseqüentemente reduz o movimento das moléculas encapsuladas, reduzindo a intensidade do sinal.

### 3.3.3 Eficiência de complexação

A quantidade de óleo essencial “inclusa” nos complexos de inclusão foi mensurada por espectroscopia de UV-visível e os resultados expressos como eficiência de complexação (EC%) (mg de óleo complexado/ g de complexo). A eficiência de complexação encontrada para o complexo de inclusão entre  $\beta$ -CD e óleo essencial de laranja foi de 32,70% (32,70 mg de óleo complexado em 1g de complexo) (Tabela 1). Este resultado é superior ao encontrado por Wen et al. (2016), que ao avaliarem o complexo de inclusão entre  $\beta$ -CD e óleo essencial de canela, encontraram uma eficiência de complexação de 10,8% (10,8 mg de óleo essencial de canela complexado em 1g de complexo). Segundo Tao et al., (2014) valores baixos de eficiência de complexação podem estar associados à perdas do óleo

essencial por volatilização, isto porque durante o processo de formação dos complexos de inclusão, a etapa de secagem é realizada em recipientes abertos.

**Tabela 1.** Eficiência de encapsulação (EE) e retenção de voláteis (r) do complexo de inclusão de CD/OEL.

Tempo de armazenamento (dias)	EE (%)*	r (%)*
0	32,70 ± 0,02	99,90 ± 0,03
7	Nd	98,66 ± 0,09
14	Nd	98,61 ± 0,11

\*Média ± desvio padrão; Nd= não determinada.

Por outro lado, Kfoury et al. (2015b) encontraram valores de eficiência de complexação considerados altos, variando entre 60 e 80%, utilizando diferentes relações molares entre  $\beta$ -CD e óleo essencial de manjeriço, 3:1 e 6:1, respectivamente. No entanto, vale ressaltar que os maiores valores encontrados para eficiência de complexação no estudo de Kfoury et al., (2015b) podem ser justificados não só pelas maiores relações molares utilizadas, como também pelo diferente método utilizado para formação dos complexos de inclusão, a liofilização. O método de liofilização para formação de complexos de inclusão é utilizado para moléculas voláteis e termolábeis, visto que a baixa temperatura utilizada minimiza suas perdas por evaporação (DEL VALLE, 2004).

Abarca et al. (2016) avaliaram o complexo de inclusão  $\beta$ -CD:2N-N, e encontraram 34,8% e 1,9% de eficiência de complexação, utilizando uma relação de 1:0,5 e 1:2, respectivamente. Segundo os autores, as diferenças encontradas para a eficiência de complexação podem ser atribuídas à estrutura química e propriedades da molécula hospedada, ao tipo de interação entre a molécula e a  $\beta$ -CD e ao método utilizado para formação dos complexos de inclusão.

### 3.3.4 Identificação dos compostos voláteis do OEL

A área e a concentração dos compostos voláteis em relação à área total dos picos, do óleo essencial livre, da mistura física e do complexo de inclusão, são mostradas na Tabela 2.

**Tabela 2.** Área dos picos e concentração (%) dos compostos voláteis do óleo essencial de laranja (OEL) mistura física (MFOEL) e complexo de inclusão ( $\beta$ -CD-OEL).

Composto	Área		
	OEL	MFOEL	$\beta$ -CD-OEL
4-thujene	1,99 $\pm$ 0,02	0,73 $\pm$ 0,01	Nd
$\beta$ -mirceno	14,45 $\pm$ 0,39	3,73 $\pm$ 0,05	Nd
cis-Ocimeno	3,40 $\pm$ 0,07	0,92 $\pm$ 0,01	Nd
Limoneno	680,67 $\pm$ 16,29	150,72 $\pm$ 2,30	0,17 $\pm$ 0,00
$\beta$ -linalol	2,81 $\pm$ 0,15	2,39 $\pm$ 0,03	Nd
Total	708,40 $\pm$ 16,97	160,75 $\pm$ 2,40	0,17 $\pm$ 0,00
Concentração (%) <sup>a</sup>	100	22,70	0,02

<sup>a</sup>Concentração dos compostos voláteis (%) em relação à área do total dos picos. Nd= não detectado

O perfil cromatográfico do óleo essencial livre, da sua mistura física e do seu complexo de inclusão mostrou diferenças qualitativas e quantitativas; isto porque cada constituinte do óleo possui habilidade para formar complexo de inclusão devido à sua maior ou menor afinidade pela  $\beta$ -CD. Quando as moléculas hóspedes apresentam uma dimensão molecular semelhante, a molécula ou o seu resíduo mais hidrofóbico tem a maior afinidade pela cavidade da CD (MARQUES, 2010), além da hidrofobicidade da molécula hóspede, a ligação entre as CDs e os compostos aromáticos depende da sua acomodação geométrica na cavidade da CD (CIOBANU et al., 2013). O aprisionamento da molécula dentro da cavidade se dá por forças de ligação, como forças de Van der Waals, interações dipolo-dipolo e pontes de hidrogênio (GUPTA et al., 2016).

A concentração relativamente baixa dos compostos no complexo de inclusão mostrou a alta estabilidade do complexo de inclusão, com perda de volatilização de apenas 0,02% para  $\beta$ -CD-OEL e 22,70% para a mistura física (MFOEL).

### 3.3.5 Estabilidade do complexo

A estabilidade do complexo de inclusão durante 0,7 e 14 dias foi determinada pela retenção do OEL na  $\beta$ -CD e quantificado comparando-se a soma das áreas dos picos cromatográficos dos componentes do óleo essencial na presença e na

ausência da  $\beta$ -CD. Os valores de retenção são apresentados na Tabela 1. Os valores de retenção mostraram que o OEL foi eficientemente retido na cavidade da  $\beta$ -CD, devido à encapsulação da molécula hóspede na formação do complexo de inclusão. Isso refletiu na redução da pressão de vapor e volatilidade do óleo essencial devido à sua inclusão na cavidade da  $\beta$ -CD (KFOURY et al., 2015).

Segundo Ho et al. (2011), a liberação das moléculas hóspedes de complexos de inclusão podem ser influenciados por fatores como temperatura e umidade relativa. Kfoury et al. (2016) avaliaram o efeito do método de preparo, da temperatura e umidade relativa na liberação de aroma de complexo de inclusão entre  $\beta$ -ciclodextrina e anetol e mostraram em seu estudo que um aumento na temperatura (acima de 100°C) e na umidade do ambiente (acima de 75% UR) é capaz de “abrir” a estrutura da ciclodextrina e acelerar a liberação dos compostos voláteis.

Os resultados deste estudo sugerem que a formação de complexos de inclusão com ciclodextrinas representa uma alternativa de encapsulação eficiente e estável, devido à capacidade da  $\beta$ -CD em reter eficientemente os óleos essenciais, protegendo-os da evaporação, mesmo 14 dias após a sua elaboração. O  $\beta$ -CD-OEL apresentou perda volátil de 1,29% após 14 dias desde que foram produzidos. O desempenho das CDs depende da complementaridade geométrica (tamanho e forma) entre sua cavidade e a molécula hóspede (KFOURY et al., 2015a).

Segundo Marques (2010), em geral, quanto menor a molécula hóspede, mais fácil a complexação, desde que ocorram interações entre ela e a cavidade hospedeira. Por outro lado, moléculas grandes são dependentes da presença de um grupo ou anel capaz de serem introduzidas na cavidade, caso contrário, apenas algumas partes lipofílicas da molécula são capazes de se encaixar na cavidade lipofílica da CD e não a molécula inteira.

Decock et al. (2008) estudaram a modelagem molecular para 2 compostos com hidrofobicidade semelhante, mas de diferentes famílias químicas, limoneno e metilheptina carbonato. Eles observaram o espaço vazio fraco entre a cavidade da  $\beta$ -CD e o limoneno sugerindo que esta CD é mais adequada para acomodar tal molécula, comparada com a  $\alpha$ -CD e  $\gamma$ -CD. Em relação aos tamanhos de cavidades, carbonato de heptina formetil, uma molécula linear, o espaço é maior do que o limoneno. Neste caso, o  $\alpha$ -CD é mais adequado devido ao seu menor tamanho de cavidade.

Ciobanu et al. (2013) estudaram a liberação controlada de compostos aromáticos do óleo essencial de *Mentha piperita* complexados por ciclodextrinas. A  $\beta$ -CD apresentou alta retenção para todos os compostos aromáticos estudados. Estes resultados sugerem que a inclusão na cavidade da  $\beta$ -CD protege os compostos contra a evaporação do aroma.

### **3.4 Conclusão**

Na comparação da  $\beta$ -CD pura, do óleo essencial livre e da mistura física com o complexo de inclusão, foi observado que ocorreram diferenças na composição química, na estabilidade térmica e na morfologia das mesmas. Estes resultados sugerem a formação do complexo de inclusão, e evidenciam a necessidade do método de precipitação utilizado para garantir a interação entre a  $\beta$ -CD e o óleo essencial de laranja.

#### **4 Capítulo 2 – Artigo em processo de revisão**

**Complexo de inclusão de ciclodextrinas obtidas a partir de amido de trigo germinado contendo óleo essencial de laranja: melhoria da estabilidade térmica do óleo essencial de laranja**

Artigo submetido ao periódico *Food and Bioprocess Technology*

Qualis 2012-2016 em Ciência de Alimentos: A1

Fator de impacto: 2,99

ISSN 1935-5130



**Resumo**

Ciclodextrinas (CDs) são oligossacarídeos produzidos por modificação enzimática de amido, capazes de formar complexos de inclusão a fim de melhorar a solubilidade em água e a estabilidade térmica de moléculas hidrofóbicas e voláteis. O objetivo deste estudo foi produzir  $\alpha$ ,  $\beta$ , and  $\gamma$ -CDs de amidos de trigo germinado e não germinado. Além disso, avaliou-se a estabilidade térmica do complexo de inclusão entre as CDs produzidos a partir de amido de trigo germinado e óleo essencial de laranja. O teor e o rendimento de  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ -CDs produzidas a partir de amido de trigo germinado e não germinado em diferentes concentrações de amido foram avaliados por cromatografia líquida de alta eficiência e estas CDs foram utilizados para a formação de um complexo de inclusão com óleo essencial de laranja (CDs/OEL). A germinação aumentou a atividade enzimática de todas as amostras, bem como o rendimento de CDs. O complexo de inclusão formado entre CDs/OEL melhorou significativamente a estabilidade térmica do óleo essencial de laranja, promovendo sua proteção em altas temperaturas.

**Palavras-chave:** amido de trigo, germinação, ciclodextrinas, complexo de inclusão, estabilidade térmica.



#### 4.1 Introdução

A germinação do trigo no campo, conhecida como germinação na espiga, é um processo natural que ocorre devido ao excesso de chuvas, se desencadeando especialmente próximo ao momento da colheita e resultando em menor rendimento e baixa qualidade do grão, além de prejuízos na extração e qualidade tecnológica da farinha, diminuindo assim, seu valor econômico (BROWN et al., 2018). Durante este processo há degradação de reservas, causada principalmente pelo aumento da atividade enzimática amilolítica, como  $\alpha$ -amilase,  $\beta$ -amilase, enzima de desramificantes e  $\alpha$ -glicosidase, que atuam sobre o amido, convertendo-o em açúcares como maltose e glicose, e também dextrinas e oligossacarídeos, como resultado da clivagem das cadeias de amilose e amilopectina (MCKIE; MCCLEARY, 2015). A atividade amilolítica promovida pela germinação pode influenciar a produção de ciclodextrinas, visto que durante esse processo parte do amido é clivado, facilitando a produção das ciclodextrinas.

As ciclodextrinas (CDs) são oligossacarídeos cíclicos não redutores que consistem em unidades de D-glicose unidas por ligações  $\alpha$ -1,4. Existem três principais e mais comuns ciclodextrinas, que são aquelas compostas por seis, sete e oito unidades de glicose, denominadas  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ -ciclodextrinas, respectivamente (MATENCIO et al., 2017). Estes oligossacarídeos são produzidos a partir da hidrólise enzimática (CELEBIOGLU; UYAR, 2013), catalisada pela enzima ciclodextrina glicosiltransferase (DURA; ROSELL, 2016), sendo o amido o principal substrato (MATHEW; ADLERCREUTZ, 2013).

A ciclodextrina glicosiltransferase (CGTase) é uma endoenzima, da família das  $\alpha$ -amilases, que catalisa quatro tipos de reações através da clivagem das ligações glicosídicas  $\alpha$ -1,4. Esta enzima apresenta menor atividade nas reações de hidrólise, catalisando principalmente três reações de transglicosilação: ciclização, acoplamento e desproporção (DURA; ROSELL, 2016).

As ciclodextrinas apresentam formato tipo “cone truncado”, com a cavidade interna essencialmente hidrofóbica, permitindo a formação de complexos de inclusão com substâncias hospedeiras hidrofóbicas, enquanto a superfície externa possui caráter hidrofílico (DUCHÊNE; BOCHOT, 2016) o que as tornam solúveis em água e outras substâncias polares (HUNDRE et al., 2015). Além disso, a formação de complexo de inclusão com substâncias orgânicas e inorgânicas aumenta sua estabilidade à luz e temperatura, fornece proteção contra a oxidação, mascara ou

reduz efeitos fisiológicos indesejados e reduz sua volatilidade (SANTOS et al., 2015).

As características das ciclodextrinas podem variar de acordo com a concentração e fonte de amido, concentração de enzima, tempo de reação, temperatura e pH (LI et al., 2014). Vários autores estudaram diferentes fontes de amido para a produção de ciclodextrinas (IBRAHIM et al., 2011; SCHÖFFER et al., 2017). No entanto, não foram encontrados relatos na literatura utilizando o amido de trigo germinado na produção de ciclodextrinas.

Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi produzir ciclodextrinas a partir de amidos de trigo germinado e não germinado e quantificá-las em  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ -ciclodextrinas. Além disso, estudou-se a composição química, atividade amilolítica e alfa-amilase dos amidos de trigo (germinado e não germinado) e a estabilidade térmica do complexo de inclusão entre ciclodextrinas produzidas a partir de amido de trigo germinado e óleo essencial de laranja.

## **4.2 Material e métodos**

### *4.2.1 Material*

Foram utilizados grãos de trigo da cultivar BRS Marcante, das safras de 2013 e 2014, onde a safra de 2014 corresponde ao trigo que germinou naturalmente no campo. Os grãos de trigo foram cedidos pela Embrapa Trigo-Passo Fundo/RS. A enzima CGTase (Toruzyme® 3.0 L) foi gentilmente cedida pela Novozymes A/S (Dinamarca). O amido solúvel P.A foi adquirido da Synth (Brasil). A  $\beta$ -CD comercial (97% de pureza) foi adquirida da Sigma- Aldrich (USA). O óleo essencial de laranja foi extraído por hidrodestilação das cascas de laranja da variedade Valência [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck] coletadas na cidade de Pelotas, em setembro de 2015.

### *4.2.2 Moagem dos grãos*

Os grãos de trigo foram acondicionados a 15% de umidade com água destilada durante 24 h, depois moídos em moinho de cilindros experimental (Chopin, Moulin CD1, França), de acordo com o método 26-10.02 da American Association of Cereal Chemistry (AACCI, 2010).

#### 4.2.3 *Extração do amido de trigo*

O amido de trigo foi extraído conforme o processo sugerido por Knight; Olson (1984). Uma mistura de farinha de trigo e água foi preparada em uma proporção de 2:1 (p:v). A massa formada foi lavada com água até completa remoção do amido, e então a mistura de amido e água foi filtrada em peneira de 200 mesh. O filtrado foi centrifugado a 3500 rpm, durante 20 min. Após a centrifugação, a camada escura na parte superior do material precipitado foi removida e o restante do decantado foi ressuspenso em água destilada e centrifugado novamente. O processo foi repetido por três vezes. O amido foi seco em estufa com circulação de ar a 40 °C por 16 h até aproximadamente 12% de umidade, para análises posteriores.

#### 4.2.4 *Composição química do amido de trigo*

Os teores de umidade, cinzas, lipídios e proteína bruta foram determinados de acordo com os métodos AACC International números 44-15.02, 08-12.01, 30-25.01 e 46-13.01, respectivamente, AACC (2010).

#### 4.2.5 *Determinação da atividade amilolítica e alfa-amilase dos grãos e amidos de trigo*

A determinação da atividade amilolítica e da enzima alfa-amilase foi determinada nos grãos de trigo moídos (germinado e não germinado) e nos amidos, seguindo a metodologia descrita por Saman et al. (2008). A extração da enzima foi realizada pela suspensão de 1 g de amostra em 10 mL de solução de cloreto de cálcio 0,2%, mistura em vórtex por 1 min e centrifugação a 1008 x g por 10 min. O sobrenadante foi utilizado para medir a atividade enzimática (extrato enzimático).

A atividade amilolítica foi determinada pela incubação de 0,5 mL do extrato enzimático em substrato composto de solução de amido solúvel 1% em tampão acetato 0,05 mol.L<sup>-1</sup>. As amostras foram incubadas a 60°C por 5 min e o aumento dos açúcares redutores foi avaliado. Uma unidade de atividade amilolítica (U) é considerada como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 μmol de maltose por minuto.

A atividade da enzima alfa-amilase seguiu o mesmo procedimento da atividade amilolítica com modificações na temperatura e tempo de incubação. A mistura do extrato enzimático e substrato foram incubados a 70°C por 15 min para inativar as enzimas β-amilase e α-glucosidase. Uma unidade de atividade da α-amilase (U) é

considerada como a quantidade de enzima necessária para liberar 1  $\mu\text{mol}$  de maltose por minuto.

#### 4.2.6 *Produção das CDs dos amidos de trigo*

As CDs foram produzidas de acordo com a metodologia proposta por Alves-Prado et al. (2008), com algumas modificações. Os amidos de trigo (germinado e não germinado) (1% p/v) foram preparados em tampão acetato, 100 mM, pH 5,5, e gelatinizadas em banho-maria (esta concentração foi previamente determinada através de testes preliminares), 1,5% (v/v) de enzima CGTase (também definida em testes preliminares) foi adicionada em 100 mL de cada substrato gelatinizado, e estes então permaneceram em banho-maria digestor (Velp Scientifica) a 55°C sob agitação a 120 ciclos por minuto por 24 h. Ao final da reação a suspensão foi mantida a 90°C por 10 min para inativação da enzima, sendo após centrifugada, coletando-se o sobrenadante, que foi armazenado a 4°C em frascos hermeticamente fechados, para análises posteriores.

#### 4.2.7 *Determinação cromatográfica das CDs produzidas*

A concentração de  $\alpha$ -CD,  $\beta$ -CD e  $\gamma$ -CD produzidas na modificação enzimática do amido foram determinadas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) utilizando cromatógrafo líquido equipado com detector de índice de refração IR-CG 410, coluna amino propilsilano SGE com tamanho de partícula 5 mm, comprimento 25 cm e diâmetro interno 4,6 mm. A fase móvel utilizada foi acetonitrila e água (65:35) a um fluxo de 0,5 mL.min<sup>-1</sup> à temperatura ambiente ( $\pm 25$  °C). Os padrões e as amostras foram filtrados em membrana de 0,45  $\mu\text{m}$ . Foram construídas curvas analíticas para  $\alpha$ -CD,  $\beta$ -CD e  $\gamma$ -CD com diferentes faixas de concentração. Os resultados da área dos respectivos picos em função da concentração de CDs foram ajustados por regressão linear e os limites de quantificação e detecção foram calculados.

#### 4.2.8 *Determinação de açúcares redutores das CDs produzidas*

A determinação de açúcares redutores foi realizada pelo método de DNS, de acordo com metodologia descrita por Miller (1959), com algumas modificações. Após a modificação enzimática do amido, uma alíquota de 200  $\mu\text{L}$  da solução de CDs foi coletada, adicionada 200  $\mu\text{L}$  da solução DNS (ácido 3,5-dinitrossalicílico), aquecida

em banho-maria a 100°C durante 5 min e posterior resfriamento em água fria. Após foi adicionado 1,6 mL de água destilada e realizada a leitura em espectrofotômetro a 540 nm. Os resultados foram expressos em mg de equivalentes de açúcar redutor por mL de amostra, através da realização da curva com padrão de glicose.

#### *4.2.9 Preparo do complexo de inclusão de ciclodextrinas/óleo essencial de laranja ( $\beta$ -CDs / OEL)*

O complexo de inclusão entre as ciclodextrinas produzidas a partir de amido de trigo germinado e o óleo essencial de laranja (OEL) foi preparado pelo método descrito por Yildiz et al. (2018), com algumas modificações. Inicialmente, a quantidade de CD e OEO foram ajustadas na proporção de 1:1 (p/p) (definida por testes preliminares) e a ciclodextrina (20%, p/v) foi dissolvida em água, mantida a 35°C, e o óleo essencial (20%, p/v) foi lentamente adicionado à solução. Estas suspensões foram agitadas durante a noite à temperatura ambiente. Para minimizar a perda de óleo essencial, durante a agitação o frasco de vidro foi fechado hermeticamente. Por fim, a solução obtida foi seca em estufa com circulação forçada de ar a 35°C durante 24 h. O complexo de inclusão obtido foi armazenado sob refrigeração a 4°C em frascos selados.

#### *4.2.10 Propriedades térmicas (TGA/DTA) do complexo de inclusão ( $\beta$ -CDs/OEL)*

As temperaturas de decomposição e a perda de massa (%) devido à decomposição do complexo de inclusão, do óleo essencial de laranja e das ciclodextrinas produzidas a partir de amido de trigo germinado foram determinadas usando um analisador termogravimétrico (TGA, TA-60WS, Shimadzu, Kyoto, Japão). As curvas TGA / DTA foram registradas sob atmosfera dinâmica de nitrogênio (50 mL.min<sup>-1</sup>) aquecendo as amostras ( $\pm$  5 mg) de 30°C a 600°C com uma taxa de aquecimento de 10°C/min.

#### *4.2.11 Análise estatística*

As análises foram realizadas em triplicatas e o desvio padrão foi reportado, exceto para a determinação cromatográfica das CDs produzidas. As medias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de significância pela análise de variância (ANOVA). A comparação de dois grupos foi realizada pelo teste t à 5% de significância.

### 4.3 Resultados e discussão

#### 4.3.1 Rendimento de extração e composição química do amido

Os rendimentos de extração e composições químicas dos amidos de trigo não germinados e germinados são mostrados na Tabela 3.

**Tabela 3.** Rendimento de extração e composição química do amido de trigo germinado e não germinado.

Parâmetros (% , b.s) <sup>a</sup>	Germinado	Não germinado
Rendimento de extração	45,83 ± 1,35 <sup>*</sup>	64,83 ± 1,27
Umidade	8,96 ± 0,25 <sup>ns</sup>	8,73 ± 0,21
Cinzas	0,21 ± 0,00 <sup>*</sup>	0,14 ± 0,01
Lipídeos	0,11 ± 0,00 <sup>*</sup>	0,10 ± 0,00
Proteína bruta (x 5,7)	0,31 ± 0,02 <sup>ns</sup>	0,33 ± 0,01

<sup>a</sup> Média de três repetições ± desvio padrão. \* ou ns na mesma linha representam significância e não significância, entre amido de trigo germinado e não germinado, respectivamente, pelo teste t com 5% de probabilidade de erro.

Os resultados obtidos neste estudo indicam que o rendimento de extração de amido foi reduzido após a germinação. Segundo Pinkaew et al. (2017), a germinação pode induzir alterações importantes no amido, inclusive no rendimento de extração. Resultado semelhante também foi relatado para três cultivares de arroz (PINKAEW et al., 2016) e foi atribuído à decomposição do amido nativo por enzimas hidrolíticas, resultantes da germinação. Essas enzimas, incluindo  $\alpha$ -amilase,  $\beta$ -amilase e  $\alpha$ -glicosidase, podem degradar grânulos de amido e, assim, produzir maltose, glicose, dextrinas e oligossacarídeos (XU et al., 2011).

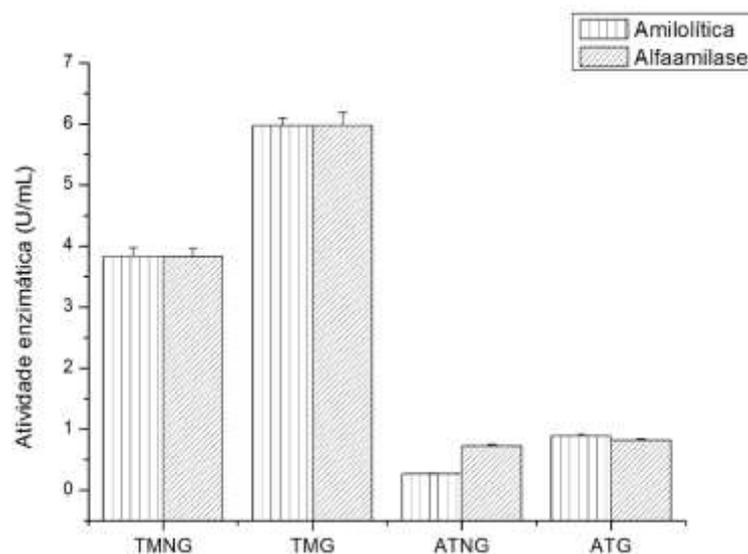
Segundo Pinkaew et al. (2016), o isolamento do amido envolve a remoção de proteínas. Assim, um maior rendimento de extração de amido é seguido por um menor teor de proteína. No entanto, embora tenha sido observada uma diferença significativa no rendimento do amido, a germinação não induziu mudanças no teor de proteína bruta nem no teor de umidade do amido no presente estudo. Xu et al. (2011) revelaram que o teor de proteína após a germinação está relacionado ao peso molecular das proteínas; enquanto que as proteínas de alto peso molecular são, até certo ponto, hidrolisadas durante o estágio inicial de germinação, as proteínas com baixo peso molecular permanecem praticamente as mesmas.

Na germinação, houve um aumento significativo do teor de cinzas. Esse aumento pode ser devido à hidrólise dos inibidores de nutrientes promovido pela germinação, como o ácido fítico, levando à liberação de fosfato e minerais (WANG et al., 2018). Segundo Kajla, Sharma e Sood (2017), durante a germinação cerca de 70% do fósforo é convertido em fósforo livre solúvel pela ação da fitase, o que consequentemente aumenta o teor de cinzas.

A germinação proporcionou um aumento significativo do conteúdo lipídico. Esse aumento pode estar relacionado aos lipídios livres decorrentes do aumento das atividades das enzimas lipolíticas durante a germinação (BARANZELLI et al., 2018; SINGH et al., 2017). Além disso, A perda de amido devido à germinação leva à consequente diminuição do peso; assim, as porcentagens dos outros componentes podem ser alteradas como uma proporção do peso total (VAN HUNG et al., 2011).

#### 4.3.2 Atividade amilolítica e alfa-amilase em grãos moídos e amido de trigo

As atividades amilolítica e alfa-amilase em grãos moídos de trigo germinado e não germinado foram superiores aos valores encontrados para seus respectivos amidos (Figura 14).



**Figura 14.** Atividade enzimática (amilolítica e alfa-amilase) dos grãos de trigo não germinado (TMNG) e germinado (TMG) e dos amidos de trigo não germinado (ATNG) e germinado (ATG).

A maior atividade enzimática no trigo integral em comparação com o amido é explicada pela ação de enzimas localizadas abaixo da camada de aleurona e, em

menor grau, no germe (POMERANZ, 1988). Além disso, durante o processo de extração do amido, as enzimas podem ter sido removidas, o que, juntamente com a solubilidade das proteínas, pode ter contribuído para a menor atividade enzimática do amido, em comparação com o grão triturado de trigo.

As atividades amilolítica e alfa-amilase foram maiores nos grãos de trigo moídos germinados e no amido de trigo germinado do que nas amostras não germinadas. As amilases endógenas, que são sintetizadas na camada de aleurona, são ativadas durante a germinação e são responsáveis pela degradação do endosperma amiláceo (DELCOUR; HOSENEY, 2010). A alfa-amilase constitui aproximadamente 30% do total de enzimas sintetizadas durante a germinação e desempenha um papel importante na hidrólise do amido, agindo principalmente como uma enzima de clivagem durante o processo de germinação (KALITA et al., 2017).

De Brier et al. (2015) relataram que a alfa-amilase pode persistir em grãos de trigo maduros e não germinados em níveis suficientes para afetar a atividade enzimática das farinhas, o que explica a atividade da alfa-amilase em trigo não germinado (3,82 U/mL), enquanto o trigo germinado exibiu maior atividade de alfa-amilase (5,97 U/mL). Em um estudo anterior sobre a germinação do trigo, Jin et al. (2011) relataram valores de atividade da alfa-amilase até 12 vezes maiores após 5 dias de germinação.

#### 4.3.3 *Produção de ciclodextrinas de amido de trigo*

A produção de ciclodextrinas foi diretamente influenciada pela concentração de amido (Tabela 4). A concentração de amido induziu mudanças que foram proporcionais à quantidade de ciclodextrinas produzidas. Quando a concentração de amido mais alta foi utilizada (10%), o número de  $\gamma$ -CDs aumentou, enquanto as concentrações de  $\alpha$  e  $\beta$ -CDs diminuíram continuamente durante a reação. Por outro lado, os amidos de trigo apresentaram maior taxa de conversão para  $\beta$ -CDs em menor concentração de amido (1%).

A proporção de ciclodextrinas é dependente da concentração inicial de substrato e do tempo de reação (SCHÖFFER et al., 2017). Observações semelhantes foram feitas na produção de ciclodextrinas e na taxa de conversão de diferentes concentrações de amido de batata (0,5 a 5,0%) (IBRAHIM et al. 2011).

Esses autores encontraram uma taxa de conversão mais alta usando uma concentração de 1,5% de amido comparado a uma concentração de 5,0% de amido.

**Tabela 4.** Concentrações de  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ -ciclodextrinas e rendimento de conversão de amidos de trigo não germinado e germinado em ciclodextrinas.

Amido de trigo	Amido (%) <sup>a</sup>	Ciclodextrinas (mg/mL)			Ciclodextrinas (%)			Rendimento (%) <sup>b</sup>
		$\alpha$	$\beta$	$\gamma$	$\alpha$	$\beta$	$\gamma$	
Não germinado	1	0,04	4,42	0,40	1,42	89,06	9,52	48,6
	10	3,02	2,75	6,55	35,00	17,60	4,45	12,3
Germinado	1	0,04	5,00	0,40	1,30	90,25	8,45	54,4
	10	3,29	3,09	6,52	36,40	18,52	45,12	12,9

<sup>a</sup> Concentração calculada com relação à solução tampão (p/v). <sup>b</sup> = mg ciclodextrina/100 mg amido.

Sakinah et al. (2014) testaram o efeito de diferentes concentrações de amido de mandioca e ciclodextrina glicosiltransferase na produção de ciclodextrinas, e encontraram concentrações mais altas de ciclodextrinas quando utilizadas concentrações mais baixas de amido. No entanto, o aumento na concentração de amido de tapioca (acima de 8% p/v) não resultou em um aumento significativo na produção total de ciclodextrina. Isso ocorre porque os locais de ligação do amido ficaram saturados em concentrações mais altas de amido, enquanto a concentração de ciclodextrina glicosiltransferase permaneceu constante, resultando em um rendimento insignificante de ciclodextrina.

Schöffner et al. (2013) estudaram o efeito da concentração de substrato na produção de  $\beta$ -ciclodextrina, com concentrações de amido solúvel variando de 0,2% a 10%, e descobriram que o rendimento máximo de conversão ocorreu em uma baixa concentração de amido (4%). Segundo Rakmai; Cheirsilp (2016), a redução na concentração de  $\beta$ -ciclodextrina usando uma alta concentração de substrato ocorre porque as reações que produzem ciclodextrinas são reversíveis e inibidas por uma alta concentração de produto. Além disso, altas concentrações de amido também causam um aumento na viscosidade, o que dificulta o acesso das enzimas ao seu substrato (RAKMAI et al., 2015).

Por outro lado, em estudo anterior de Muria et al. (2011) sobre o efeito da concentração de substrato e temperatura na produção de  $\beta$ -ciclodextrina, foi

observado que o aumento na concentração de amido de sago resultou em um aumento na concentração final de  $\beta$ -ciclodextrina em todas as temperaturas testadas. Isso ocorre porque um aumento na concentração do substrato aumenta a frequência de colisão de enzimas e substratos.

O processo de germinação influenciou a produção de  $\beta$ -ciclodextrina mais eficientemente na menor concentração de amido (1%) testada. Durante a germinação, várias alterações no grão foram observadas, incluindo o aumento de enzimas amilolíticas ativadas por mecanismos que regulam o processo de germinação (MCKIE; MCCLEARY, 2015). A presença dessas enzimas podem ter contribuído para a diferença observada na produção de ciclodextrinas. Tanto nos amidos de trigo germinados como nos não germinados, uma concentração de amido de 10% induziu uma redução no teor de  $\beta$ -ciclodextrina e um aumento no teor de  $\gamma$ -ciclodextrina.

Como o processo de germinação diminui a qualidade tecnológica da farinha de trigo para a produção de pão, uma alternativa seria isolar o amido de trigo germinado para a produção de ciclodextrinas, o que representaria uma maneira de agregar valor a um produto que de outra forma seria descartado pela indústria alimentar.

#### *4.3.4 Quantificação de açúcares redutores das CDs produzidas*

O conteúdo de açúcares redutores nas ciclodextrinas produzidas a partir do amido de trigo esta apresentado na Tabela 5.

Embora a CGTase pertença à família das  $\alpha$ -amilases, esta enzima catalisa principalmente a ciclização intramolecular (WANG et al., 2013). Assim, o amido era tradicionalmente submetido a um pré-tratamento usando amilase antes da CGTase. No entanto, o uso adicional de amilase apresenta várias desvantagens, como a degradação de CDs e um baixo rendimento devido à aceleração de outras reações da CGTase por acoplamento (SAKINAH et al., 2009). Nesse contexto, o uso de amido de trigo previamente hidrolisado por amilases produzidas durante a germinação pode surgir como uma alternativa para superar esses problemas.

**Tabela 5.** Teor de açúcares redutores das CDs produzidas.

Amido <sup>a</sup>	Amido <sup>b</sup> (%)	Açúcares redutores (mg/mL) <sup>c</sup>
ATNG	1	0,39±0,006 <sup>d</sup>
ATNG	10	0,89±0,003 <sup>b</sup>
ATG	1	0,43±0,013 <sup>c</sup>
ATG	10	0,97±0,002 <sup>a</sup>

<sup>a</sup> ATNG= amido de trigo não germinado; ATG= amido de trigo germinado.

<sup>b</sup> Concentrações de amido calculados com relação a 100 mL de solução tampão;

<sup>c</sup> mg glicose / ml de solução de ciclodextrina. Cada valor representa a média de três repetições.

Média ±desvio padrão. Médias com letras distintas na mesma coluna apresentam diferença estatisticamente significativa entre si ( $p < 0,05$ )

Como observado na Tabela 5, o processo de germinação contribuiu para o aumento do teor de açúcares redutores, possivelmente devido à presença de enzimas  $\alpha$  e  $\beta$ -amilase. No processo de germinação, as reservas de grãos, como amido, proteínas e lipídios, são metabolizadas durante a degradação do endosperma e a formação de enzimas (DELCOUR; HOSENEY, 2010). Segundo Wang et al. (2013), o tratamento com enzimas amilolíticas pode produzir grandes quantidades de glicose, o que poderia facilitar a reação de acoplamento com as CDs. Confirmando essa afirmação, o amido de trigo germinado apresentou o maior teor de açúcares redutores e, conseqüentemente, o maior rendimento de ciclodextrinas (Tabela 4).

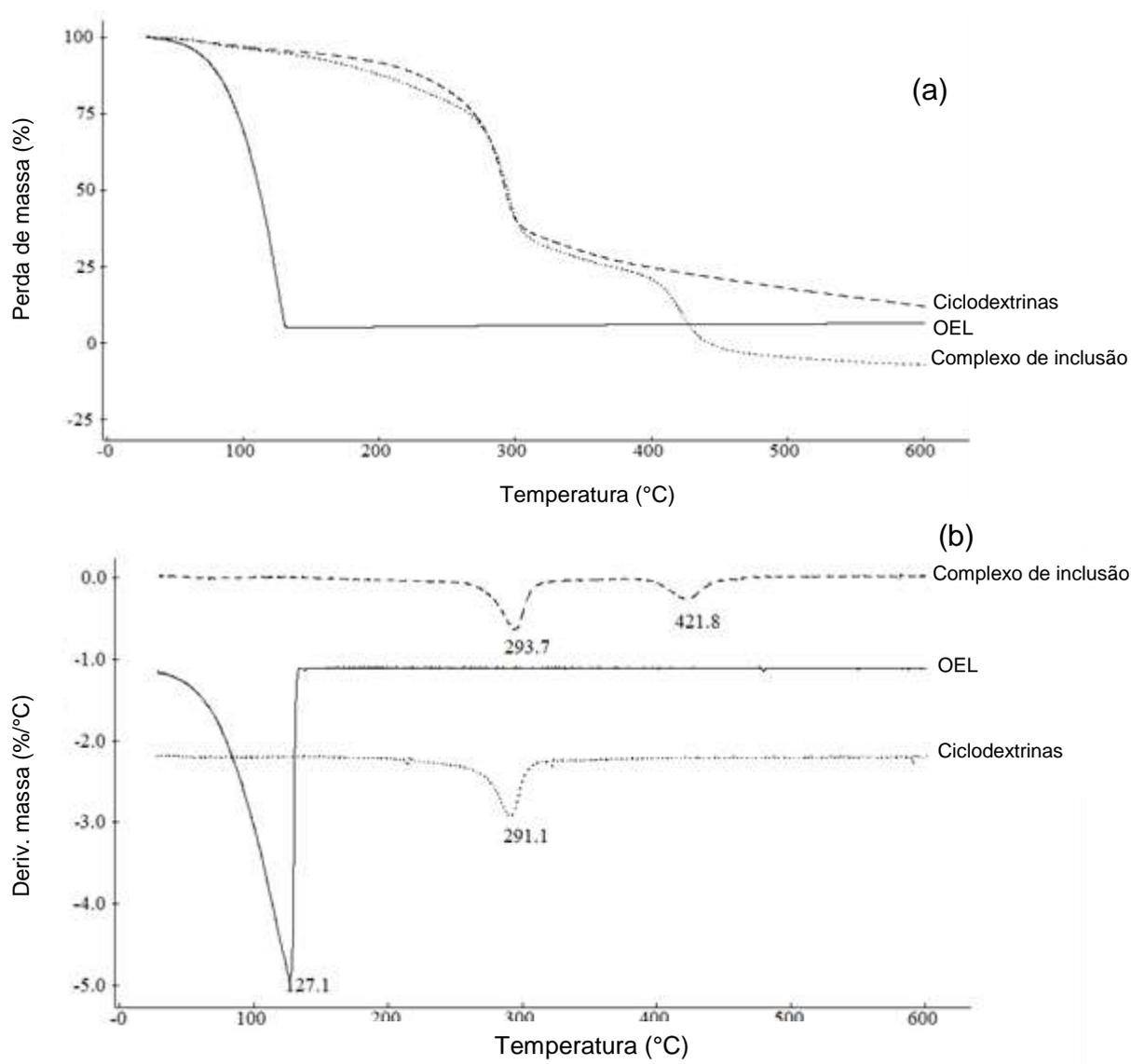
Os resultados encontrados neste trabalho estão de acordo com os resultados encontrados por Xu et al. (2011) que mostraram uma relação inversa entre o rendimento de extração de amido e a redução do teor de açúcar, onde a germinação causou uma diminuição no teor total de amido, mas um aumento no nível de açúcares redutores. Isso ocorre porque as amilases produzidas durante a germinação clivam as ligações glicosídicas  $\alpha$ -1,4 no amido e desse modo liberam produtos como glicose e maltose. Segundo Wang et al., (2013) o tratamento com enzimas hidrolisantes pode produzir grandes quantidades de glicose, o que poderia facilitar a reação de acoplamento com os CDs, resultando em sua degradação.

Saman et al. (2008) relataram um maior teor de açúcares redutores durante o processo de germinação, e atribuíram isso à presença de enzimas hidrolíticas. Segundo Rakmai e Cheirsilp (2016) e Muria et al. (2011), o aumento na quantidade de açúcares redutores pode ser atribuído à hidrólise adicional do amido e da

ciclodextrina em açúcares redutores, uma vez que a ciclodextrina glicosiltransferase também catalisa a hidrólise do amido.

#### 4.3.5 Análise térmica (TGA/DTA) do complexo de inclusão (CDs/OEL)

A estabilidade térmica do complexo de inclusão, do OEL e das ciclodextrinas produzidas a partir do amido de trigo germinada foi determinada usando curvas TGA/DTA (Figura 15).



**Figura 15.** Termogramas TGA (a) e DTA (b) do complexo de inclusão, OEL e ciclodextrinas.

As temperaturas inicial e final de decomposição das CDs foram de 252,9 e 321,0 °C, respectivamente, com 47,4% de perda de peso. Na curva DTG foi

observada apenas em um estágio de decomposição térmica, onde ocorreu a principal degradação das moléculas de CDs. O óleo essencial de laranja iniciou sua decomposição a 31,9 °C e sua decomposição completa ocorreu em torno de 135 °C, com uma redução de massa de 94,7%, indicando sua natureza altamente volátil. Por outro lado, os termogramas do complexo de inclusão apresentaram dois estágios de decomposição térmica. A primeira etapa com uma perda de massa de 48,0% pode ser atribuída à degradação principal da CD (293 °C), e a segunda etapa (421,8 °C), provavelmente à evaporação do óleo essencial de laranja com uma redução adicional de 23,0% na massa.

No complexo de inclusão, não há evidências da presença de óleo essencial de laranja na temperatura de decomposição (127 °C, Figura 16b), sugerindo que a formação do complexo de inclusão aumentou a estabilidade térmica do óleo essencial, retardando assim a sua decomposição. Segundo Yildiz et al. (2018), a estabilidade térmica aumentada do óleo essencial é um indicativo de complexação de inclusão entre a ciclodextrina e moléculas hóspedes. Munhuweyi et al. (2018) produziram microcápsulas de p-ciclodextrina contendo óleos essenciais de canela e orégano, e observaram uma alteração na degradação térmica da molécula hóspede após complexação com ciclodextrina. Essas mudanças foram atribuídas a uma interação química e à presença de uma molécula hospedeira no complexo que aumentava a estabilidade térmica dos compostos voláteis.

#### **4.4 Conclusão**

Os grãos de trigo germinados no campo são uma fonte promissora de amido para a produção de ciclodextrina. A concentração de amido germinado e não germinado influenciou o rendimento e os teores de  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ -ciclodextrinas, sendo observado o maior rendimento de conversão quando utilizado amido de trigo germinado na concentração de 1%, produzindo principalmente  $\beta$ -ciclodextrina, enquanto a maior concentração de amido (10%) produziu maiores concentrações de  $\gamma$ -ciclodextrinas. O complexo de inclusão produzido com ciclodextrinas a partir de amido de trigo germinado aumentou a estabilidade térmica do óleo essencial de laranja, promovendo sua proteção em altas temperaturas. Assim, o amido de trigo germinado pode ser um substrato promissor para a produção de ciclodextrina, agregando valor a este produto que, normalmente, não é utilizado pela indústria de alimentos. As ciclodextrinas produzidas a partir de amido de trigo germinado podem

ser utilizadas para encapsular compostos altamente voláteis e instáveis a altas temperaturas.

## 5 Capítulo 3 – Artigo a ser submetido

**Encapsulação de óleo essencial de laranja pela técnica de *electrospun***

Artigo escrito para o periódico *Journal of Microencapsulation*

Qualis 2012-2016 em Ciência de Alimentos: A2

Fator de impacto: 1,543

ISSN 1464-5246



## Resumo

A técnica de *electrospun* é um processo eletro-hidrodinâmico que visa à obtenção de fibras (*electrospinning*) ou partículas (*electrospraying*), baseada na concentração da solução do polímero. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito do processo utilizado (*electrospinning* ou *electrospraying*) na eficiência de encapsulação de óleo essencial de laranja. O óleo essencial de laranja (30, 40 e 50%) foi encapsulado utilizando zeína (10%) como matriz polimérica para a formação das cápsulas, e zeína (20%) para as fibras. As soluções poliméricas foram caracterizadas pelo potencial zeta. A eficiência de encapsulação, capacidade de carregamento e morfologia das cápsulas e fibras foram avaliadas. O potencial zeta aumentou proporcionalmente com o aumento da concentração do óleo essencial de laranja. A eficiência de encapsulação e a capacidade de carregamento foram significativamente maiores na formação de fibras do que na formação de cápsulas e aumentaram com o aumento da concentração de óleo essencial de laranja. A morfologia das cápsulas em todas as concentrações de óleo essencial de laranja estudadas apresentou partículas “enrugadas”. As fibras com 40% de óleo essencial de laranja apresentaram morfologia mais homogênea com apenas alguns “beads”. O processo de *electrospinning* se mostrou a técnica mais eficiente para a encapsulação do óleo essencial de laranja, com alta eficiência de encapsulação.

**Palavras-chave:** *electrospinning*; *electrospraying*; cápsulas; fibras; óleo essencial de laranja.



## 5.1 Introdução

Os óleos cítricos representam uma mistura de centenas de compostos que podem ser classificados em três frações: hidrocarbonetos terpênicos, compostos oxigenados e compostos não voláteis (ALPARSLAN et al., 2016). Devido ao baixo peso molecular dos componentes constitucionais, como aldeídos, álcoois, ésteres e terpenóides, os óleos essenciais são altamente voláteis e lipofílicos (HASHTJIN; ABBASI, 2015).

A encapsulação consiste de uma técnica para aprisionar um material ou mistura de materiais (molécula hóspede) em outros materiais ou sistemas (material de parede) a fim de evitar a perda dos compostos bioativos e voláteis (SHRESTHA et al., 2017). A técnica pode manter a estabilidade química do hospedeiro e promover sua liberação no tempo e taxa desejado (ROSA et al., 2015). Além disso, a encapsulação pode proporcionar proteção contra a degradação, causada principalmente por altas temperaturas, luz UV e oxidação, além de ampliar a ação de seu princípio bioativo (EL ASBAHANI et al., 2015; SOTELO-BOYÁS et al., 2017).

Vários métodos de encapsulação tais como *electrospun*, gelificação, deposição de camada por camada, extrusão, co-precipitação, coacervação, secagem por pulverização / liofilização, formação de emulsão e outros são usados para aprisionar moléculas hóspedes (ZHU, 2017). O *electrospun* tem despertado interesse por ser uma técnica alternativa com potenciais aplicações em alimentos, embalagens de alimentos e indústrias agrícolas (AYTAC et al., 2017; LIBRÁN et al., 2017). Esta técnica apresenta como uma das vantagens a de trabalhar sob condições ambientais (temperatura e pressão), além da obtenção de maiores eficiências de encapsulação e menores tamanhos de partículas do que nos atomizadores mecânicos convencionais (GOMEZ-MASCARAQUE et al., 2016; GARCÍA-MORENO et al., 2017).

A técnica de *electrospun*, ou seja, *electrospinning* ou *electrospraying* é um processo electro-hidrodinâmico que consiste na aplicação de uma alta voltagem que carrega positivamente a solução polimérica contida em uma seringa. A solução é bombeada, e por atração e transporte da solução em direção a um coletor, carregado negativamente, as fibras ou cápsulas com potencial de encapsular compostos são formadas (MENDES et al., 2017; ZAEIM et al., 2017). A diferença entre as técnicas de *electrospinning* e *electrospraying* é baseada na concentração

da solução de polímero. Quando a concentração da solução é alta, o jato do cone de Taylor é estabilizado e as fibras são formadas; se a solução apresentar baixa concentração, o jato é desestabilizado e gotículas finas são formadas (BHUSHANI; ANANDHARAMAKRISHNAN, 2014; GHORANI; TUKER, 2015).

Para a encapsulação de compostos bioativos pela técnica de *electrospun*, uma ampla gama de proteínas de grau alimentício pode ser usada (BHUSHANI et al., 2017). Entre eles, a zeína, uma proteína do milho, apresenta várias vantagens, como biocompatibilidade e biodegradabilidade (YANG et al., 2017). Além disso, a zeína é conhecida por sua alta resistência térmica e grande propriedade de barreira ao oxigênio (NEO et al., 2013) considerada como um material de parede potencial para a encapsulação de compostos funcionais e para aplicações no setor de embalagens. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito do processo utilizado (*electrospinning* ou *electrospraying*) na eficiência de encapsulação de óleo essencial de laranja.

## **5.2 Materiais e métodos**

### *5.2.1 Material*

Laranjas da variedade Valência [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck] foram colhidas em setembro de 2015, no sul do Rio Grande do Sul, na cidade de Pelotas, Brasil. A zeína foi adquirida da Sigma-Aldrich (EUA).

### *5.2.2 Extração do óleo essencial de laranja*

O óleo essencial de laranja foi extraído por hidrodestilação, conforme descrito por Kringel et al. (2017).

### *5.2.3 Preparo da solução polimérica de zeína*

As soluções poliméricas foram preparadas usando zeína em duas concentrações diferentes. Para o processo de *electrospraying* utilizou-se 10% (p/v) de zeína e para o processo de *electrospinning* foi utilizada a concentração de 20% (p/v). Inicialmente, a zeína foi dissolvida em solução aquosa de etanol a 70% sob agitação. Na sequência, 30, 40 ou 50% (p/p, OEL/zeína) de óleo essencial de laranja foi adicionado às soluções de polímero e agitado durante 15 min no escuro a  $21 \pm 2^\circ\text{C}$ .

#### 5.2.4 Produção das cápsulas e fibras

Para ambas as técnicas (*electrospinning* e *electrospraying*) as soluções de polímero foram carregadas em uma seringa plástica de 6 mL e bombeadas (Modelo 780100; Kd Scientific Inc., Holliston, MA, EUA) através de uma agulha de aço inoxidável de extremidade chata e calibre 16 (Fisher Scientific, Ottawa, ON, Canadá) com taxa de 0,8 mL.h<sup>-1</sup>. A agulha estava conectada a um eletrodo positivo de uma fonte de alta tensão (ES30R-5W/DM; Gamma High Voltage Research, EUA) à 20 kV. O sistema foi configurado verticalmente e a distância entre a agulha e o alvo coletor foi fixada em 20 cm. As cápsulas e fibras foram coletadas numa placa coletora de aço inoxidável circular coberta com folha de alumínio. O processo foi conduzido a 22 ± 2°C e 30% de umidade relativa do ambiente, dentro de uma câmara com controle de umidade e temperatura (MLR-350; SANYO Electric Co., Japão).

#### 5.2.5 Determinação do Potencial zeta

O Potencial zeta foi obtido pela técnica de espalhamento dinâmico de luz (DLS) usando o equipamento Zetasizer Nano Series (Malvern Instruments, Worcestershire, Reino Unido). As amostras foram diluídas 100 vezes com etanol a 70% e medidas a 25 °C.

#### 5.2.6 Eficiência de encapsulação e capacidade de carregamento

A capacidade de carregamento (CC) e a eficiência de encapsulação (EE) foram determinadas de acordo com Moomand; Lim (2014) pela medição do óleo não aprisionado, com algumas modificações. O óleo da superfície das cápsulas foi removido pela lavagem com hexano. A absorvância do líquido contendo o óleo e hexano foi medida em espectrofotômetro. O conteúdo de óleo na fração hexano (B) foi determinada por uma curva padrão (R<sup>2</sup>=0,99) preparada pela diluição do óleo essencial em hexano em diferentes concentrações. A quantidade teórica do óleo (A) foi considerada como a quantidade do óleo essencial inicialmente adicionada na solução polimérica (30, 40 e 50% p/p, OEL/zeína). A CC e a EE foram calculadas de acordo com as Equações 3 e 4, respectivamente:

$$CC = \frac{(A-B)}{c} \times 100 \quad \text{Eq. (3)}$$

$$EE = \frac{(A-B)}{A} \times 100 \quad \text{Eq. (4)}$$

Onde A é a quantidade teórica de óleo essencial (mg), B é a quantidade de óleo livre coletado na solução com hexano (mg) e C é o peso inicial das cápsulas (mg).

### 5.2.7 Morfologia das cápsulas e fibras

A morfologia das cápsulas e das fibras foi avaliada utilizando microscópio eletrônico de varredura (S-570; Hitachi High Technologies Corp., Japão) a uma voltagem de aceleração de 10 kV. As amostras foram recobertas com uma camada de ouro utilizando um metalizador a vácuo (Denton Desk V, Denton Vacuum, EUA).

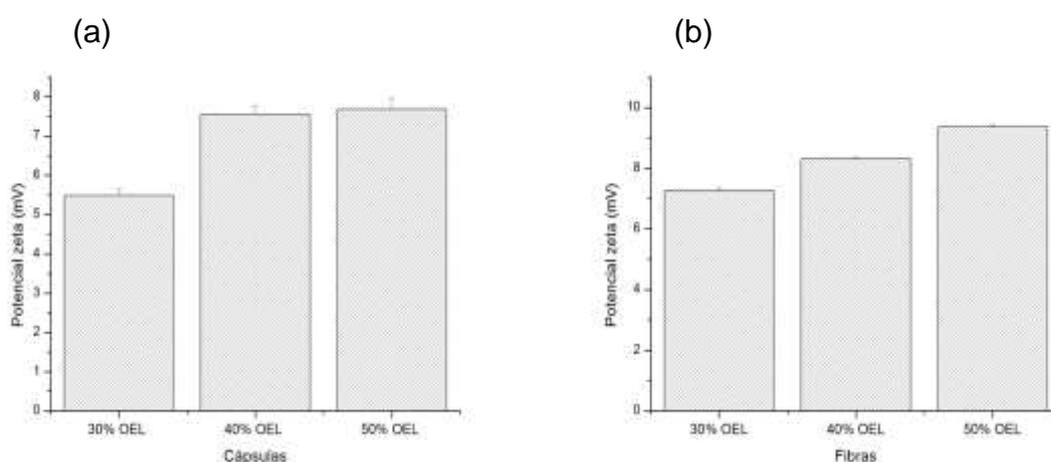
### 5.2.8 Estatística

As análises foram realizadas em triplicatas e o desvio padrão foi reportado. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de significância pela análise de variância (ANOVA).

## 5.3 Resultados e discussão

### 5.3.1 Potencial zeta

Os valores do potencial zeta das cápsulas e fibras são mostrados na Figura 16 (a) e (b), respectivamente.



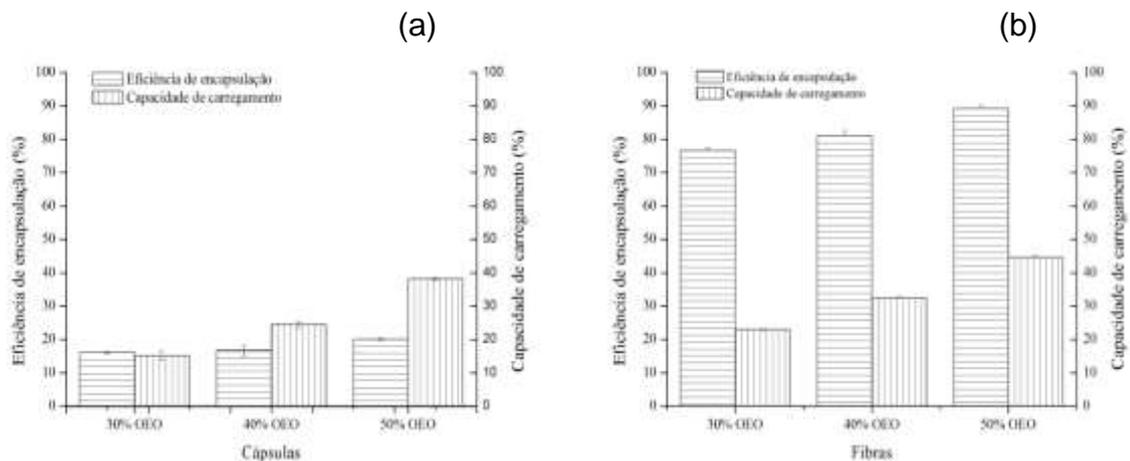
**Figura 16.** Potencial zeta das cápsulas (a) e fibras (b) contendo óleo essencial de laranja (OEL) em diferentes concentrações.

Para ambas as amostras (cápsulas e fibras) o comportamento observado foi o mesmo, o potencial zeta aumentou proporcionalmente com o aumento da concentração de óleo essencial de laranja. O potencial zeta foi ligeiramente superior para as fibras, em todas as concentrações de óleo essencial estudadas. Segundo Liang et al. (2018) o aumento no valor do potencial zeta mostra uma maior interação entre a molécula hóspede e a zeína.

As dispersões coloidais com valores de potencial zeta superiores a  $\pm 30$  mV indicam partículas altamente carregadas (negativas ou positivas), proporcionando dispersões fisicamente estáveis devido à repulsão eletrostática gerada (ROSA et al., 2015). Os resultados encontrados no presente estudo mostraram a formação de cápsulas e fibras com uma estrutura mais agregada, provavelmente devido à hidrofobicidade tanto do óleo essencial de laranja quanto da zeína (CHEN et al., 2018).

### 5.3.2 Eficiência de encapsulação e capacidade de carregamento

A eficiência de encapsulação (%) e capacidade de carregamento (%) das cápsulas e fibras carregadas de óleo essencial de laranja são mostradas na Figura 17a e 17b, respectivamente.



**Figura 17.** Eficiência de encapsulação e capacidade de carregamento das cápsulas (a) e fibras (b) contendo óleo essencial de laranja (OEL) em diferentes concentrações.

A eficiência de encapsulação e capacidade de carregamento foram significativamente superiores nas fibras quando comparado às cápsulas. Este

resultado mostra que o *electrospinning* é uma técnica mais eficiente para a encapsulação do óleo essencial de laranja, apresentando alta eficiência de encapsulação. Além disso, o ineficiente encapsulamento do óleo essencial de laranja nas cápsulas pode ser devido à facilidade de difusão de vapor no conteúdo de polímero relativamente reduzido solicitado para a formação de cápsulas comparado com a concentração de zeína necessária para as fibras (YAO et al., 2016). O mesmo comportamento foi observado por Liang et al. (2017) quando a eficiência de encapsulação do epigallocatequina galato aumentou proporcionalmente à medida que a concentração de zeína aumentou.

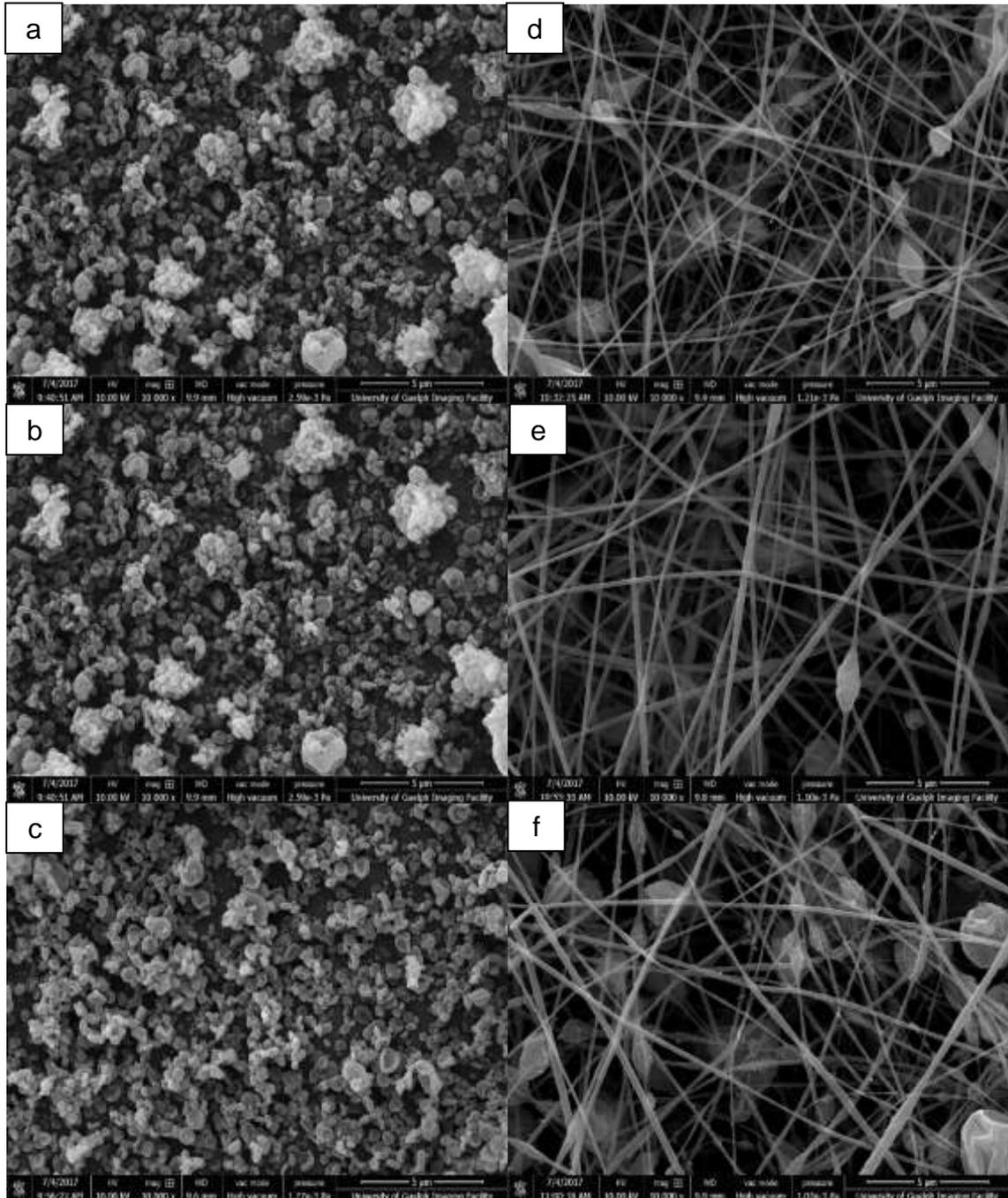
A eficiência de encapsulação alcançada neste estudo utilizando a técnica de *electrospinning* foi maior (75% a 90%) do que aquelas relatadas para encapsulação de óleo essencial de laranja por outros métodos (40 a 88%) (VELMURUGAN et al., 2017; GHASEMI et al., 2017). Este resultado pode estar relacionado às condições de processo utilizadas durante a encapsulação, visto que a técnica utilizada não envolve temperatura, pressão e condições químicas severas. Assim, os óleos essenciais são protegidos da volatilização e degradação durante o processo de encapsulação (KHOSHAKHLAGH et al., 2017).

Além do método utilizado, outros fatores afetam a eficiência de encapsulação de óleos essenciais, como materiais de núcleo e parede. Wang et al. (2017) relataram o uso de fibras eletro-esféricas de zeína como um encapsulante eficiente para componentes funcionais de alimentos.

Em relação à concentração de óleo essencial, tanto nas cápsulas quanto nas fibras, a eficiência de encapsulação e a capacidade de carregamento foram aumentadas com o aumento da concentração de óleo essencial de laranja (Figuras 18a e 18b). Cheng e Zhong (2015) observaram comportamento oposto nas nanopartículas de zeína, quando a concentração de óleo de hortelã-pimenta aumentou, a eficiência de encapsulação diminuiu. Essa diferença pode estar relacionada à maior afinidade do óleo de laranja com a zeína do que o óleo de hortelã-pimenta. Segundo Kringel et al. (2017), a afinidade entre moléculas hospedeiras e hospedeiras é influenciada pela composição química, tamanho molecular e estrutura do óleo essencial.

### 5.3.3 Morfologia das cápsulas e fibras

Os efeitos das concentrações de óleo essencial laranja e do polímero na morfologia das cápsulas e fibras foram estudados e estão apresentados na Figura 18.



**Figura 18.** Morfologia das cápsulas com 30, 40 e 50% de óleo essencial de laranja (a, b e c, respectivamente) e fibras com 30, 40 e 50% de óleo essencial de laranja (d, e, f, respectivamente).

As cápsulas apresentaram partículas “enrugadas” em todas as concentrações de óleo essencial de laranja estudadas (Figuras 19a, 19b e 19c). Segundo Gomez-Estaca et al. (2012), a forma das partículas de zeína pode ser devido a um aumento no tamanho das gotículas junto com uma rápida evaporação do solvente, formando uma pele semi-sólida do polímero na superfície, que após a secagem colapsa e forma partículas enrugadas.

As fibras produzidas com 30 e 50% de óleo essencial de laranja (Figuras 19d e 19f, respectivamente) apresentaram maior formação de “*beads*”, enquanto que as fibras com 40% de óleo essencial de laranja apresentaram morfologia mais homogênea com apenas alguns “*beads*” observados. Essa diferença pode estar relacionada principalmente com a concentração do polímero. Concentrações de polímero mais altas estabilizam o jato do cone de Taylor e o alongamento ocorre devido ao mecanismo de instabilidade de entrelaçamento. Por outro lado, concentrações mais baixas de polímero produzem gotículas finas devido à desestabilização do jato (BHUSHANI; ANANDHARAMAKRISHNAN, 2014). Moomand e Lim (2015) notaram que uma menor concentração de polímero (10% p/p) produziu agregados de zeína enquanto uma maior concentração de polímero (20% m/m) resultou em fibras lisas. Com isto, pode-se pressupor que a zeína é mais adequada para a encapsulação de óleo essencial de laranja na forma de fibras do que em cápsulas.

#### 5.4 Conclusão

A menor concentração de zeína formou cápsulas agregadas, enquanto que na concentração mais alta de zeína foram obtidas fibras uniformes. A concentração de zeína não influenciou os valores do potencial zeta. No entanto, a concentração de óleo essencial de laranja influenciou o potencial zeta, que aumentou proporcionalmente à medida que a concentração do óleo essencial de laranja aumentou na solução polimérica. A maior concentração de zeína contribuiu para a maior eficiência de encapsulação, aumentando também com a maior concentração de óleo essencial de laranja. A menor concentração de zeína produziu partículas desuniformes, em todas as concentrações de óleo essencial de laranja estudadas. Fibras produzidas com 30 e 50% de óleo essencial de laranja apresentaram vários “*beads*”, enquanto as fibras com 40% de óleo essencial de laranja apresentaram morfologia mais homogênea com apenas alguns “*beads*”. Assim, o *electrospinning*

pode ser considerado a técnica mais adequada para encapsulação de óleo essencial de laranja e as fibras formadas por esta técnica podem apresentar potencial para aplicação em embalagens de alimentos.

### **5.5 Estudos futuros**

Tendo em vista os resultados obtidos neste estudo e a atividade antifúngica do OEL relatada na literatura, têm-se como proposta de continuação deste trabalho a aplicação das fibras de zeína com OEL encapsulado em embalagens ativas para controle de *Aspergillus* spp. Uma possível aplicação destas fibras com propriedades antifúngicas seriam em embalagens de produtos de panificação, como pães ou bolos, visto que a principal fonte de contaminação destes produtos se dá por fungos do gênero *Aspergillus*.

Para isto, algumas análises poderiam ser realizadas, tais como: determinação da atividade antifúngica dos voláteis do óleo essencial pela técnica de micro-atmosfera e identificação de voláteis e o percentual de retenção (r%) destes voláteis pela zeína. Além disso, seria interessante avaliar o mecanismo de liberação do OEL das fibras pela técnica de *headspace*, em ambientes com diferentes umidades relativas (%UR); bem como a distribuição do óleo essencial de laranja nas fibras de zeína através da análise de microscopia confocal.



## 6 Capítulo 4 – Artigo submetido

**Cápsulas de zeína e complexo de inclusão entre  $\beta$ -ciclodextrina e óleo essencial de laranja: inibição do crescimento de *Aspergillus* spp. em bolos**

Artigo em revisão no periódico *Food Microbiology*

Qualis 2012-2016 em Ciência de Alimentos: A1

Fator de impacto: 4,09

ISSN 0740-0020



## Resumo

O objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade antifúngica *in vitro* do óleo essencial de laranja (OEL) contra seis isolados de *Aspergillus* spp. bem como a atividade antifúngica do OEL na forma livre e encapsulada em bolos. O OEL foi encapsulado pelo método de precipitação antissolvente, usando zeína e complexo de inclusão entre  $\beta$ -ciclodextrinas ( $\beta$ -CD/OEL) em diferentes concentrações (2,5; 5,0 e 7,5% m/v, em relação à zeína). As cápsulas produzidas foram secas pela técnica de *electrospraying*. Em geral, as cápsulas apresentaram formato esférico e regular com eficiência de encapsulação de 35%. As alterações no padrão de difração do complexo de inclusão ( $\beta$ -CD/OEL) e da  $\beta$ -CD indica que a complexação foi efetiva, além disso, o menor pico em  $17,07^\circ$  das cápsulas de zeína e complexo de inclusão  $\beta$ -CD/OEL confirmam a encapsulação bem-sucedida. O OEL inibiu o crescimento de todas as espécies de *Aspergillus* testadas. A concentração inibitória mínima (CIM) do OEL variou de 45,24 a 90,47 mg/mL e a concentração fungicida mínima (CFM) variou de 45,24 a  $>180,95$  mg/mL. *A. terreus* (MV 3529) mostrou-se a espécie mais sensível ao OEL, seguido da *A. niger* (MV 3531 M 1354). A espécie *A. fumigatus* apresentou a maior resistência ao OEL com CFM de  $\geq 180,95$  mg/mL. O OEL atrasou efetivamente a deterioração microbiológica dos bolos de 30 para 150 dias. Estes resultados sugerem que o OEL pode ser usado com o intuito de aumentar a estabilidade microbiológica, e consequentemente a vida-útil de bolos.

**Palavras-chave:** atividade antifúngica, *Aspergillus*, óleo essencial de laranja, bolos.



## 6.1 Introdução

A deterioração dos produtos é um dos maiores problemas na indústria de panificação. Por esta razão, o uso de conservantes sintéticos acaba sendo uma alternativa para aumentar a vida útil de bolos e pães. No entanto, a utilização destes conservantes vem sendo relacionada a problemas de saúde e a associada percepção negativa do consumidor. No intuito de contornar esse problema, a indústria de panificação tem explorado alternativas naturais para a preservação dos produtos (DEBONNE et al., 2018). Assim, óleos essenciais cítricos têm sido explorados como conservante natural devido ao seu aroma e características antioxidantes favoráveis, bem como suas atividades antimicrobianas (DONSÌ; FERRARI, 2016; LI et al., 2018; TAO et al., 2014). Estes óleos essenciais são considerados uma alternativa viável para controlar o crescimento de *Aspergillus flavus* e *Penicillium verrucosum*, entre outros fungos comumente associados à deterioração de produtos de panificação (SIMAS et al., 2017) que podem estar presentes na superfície do produto devido à contaminação pós-panificação, durante as etapas de resfriamento, acabamento e embalagem (SIRISOONTARALAK et al., 2017).

*Citrus sinensis* (L.) Osbeck é a cultivar de laranja mais cultivada no mundo. A variedade *C. sinensis* Valencia é a principal variedade de laranja produzida no Brasil, principal produtor e exportador de óleos essenciais de laranja (OEL) (GONÇALVES et al., 2018). Embora amplamente utilizado na indústria de alimentos, o OEL na forma não encapsulada é volátil e suscetível à oxidação na presença de luz, ar e umidade (WADHWA et al., 2017). Além disso, sua alta reatividade e hidrofobicidade representam desafios consideráveis durante as formulações de alimentos e bebidas (DONSÌ; FERRARI, 2016). Para superar esses desafios, o óleo essencial precisa ser encapsulado em sistemas compatíveis com a aplicação em alimentos (EVAGELIOU; SALIARI, 2017).

A encapsulação envolve o aprisionamento de uma substância (agente ativo) dentro de um material suporte (material de parede) com a finalidade de proteger a substância ativa e estender sua bioatividade (KHORSHIDIAN et al., 2018). Desta forma, a capacidade e eficiência de encapsulamento são altamente dependentes do material de parede usado utilizado (WANI et al., 2017). Uma ampla gama de polímeros pode ser usada como material de parede, como por exemplo, a zeína, uma prolamina extraída do milho que tem sido utilizada como material de parede

para melhorar a eficiência de encapsulação devido à sua biodegradabilidade e compatibilidade com outros polímeros (GHORANI; TUCKER, 2015; WU et al., 2012). A zeína contém domínios hidrofóbicos e hidrofílicos que podem ser facilmente convertidos em nanopartículas coloidais esféricas pelo método de precipitação utilizando antissolvente (SUN et al., 2016). Neste método, a diferença de solubilidade da zeína em etanol e água é responsável por precipitar as nanopartículas de zeína promovendo a encapsulação do óleo essencial, o qual é dissolvido na solução aquosa de etanol juntamente com a zeína (WU et al., 2012). Após a precipitação, é necessária uma etapa de secagem para manter a estabilidade do óleo essencial, bem como facilitar o manuseio e armazenamento (ANANDHARAMAKRISHNAN, 2014). Neste contexto, o *electrospraying* é uma técnica promissora para a produção de microcápsulas. Este método consiste na aplicação de um campo elétrico de alta voltagem em uma solução polimérica, a qual é pulverizada em direção a um coletor de carga oposta ou aterrada, onde as microcápsulas secas são depositadas (GOMEZ-MASCARAQUE et al., 2017). O *electrospraying* é ideal para o encapsulamento de compostos voláteis e termicamente instáveis, como os óleos essenciais, uma vez que o processo é realizado à temperatura ambiente e à pressão atmosférica (VEGA-LUGO; LIM, 2009). Além disso, a complexação do composto bioativo dentro de uma molécula hospedeira tais como ciclodextrinas (CDs) antes do *electrospraying*, pode aumentar sua estabilidade (WEN et al., 2017).

O objetivo deste estudo foi avaliar a atividade antifúngica *in vitro* do óleo essencial de laranja frente a seis espécies de *Aspergillus* spp. e avaliar sua atividade através da incidência fúngica em bolos utilizando OEL na forma livre e encapsulado pelo método de precipitação utilizando antissolvente.

## **6.2 Material e métodos**

### **6.2.1 Materiais**

Laranjas da variedade Valência [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck] foram colhidas em setembro de 2015, na cidade de Pelotas, Brasil. A  $\beta$ -ciclodextrina comercial ( $\beta$ -CD; 97% de pureza) e a zeína foram adquiridas da Sigma-Aldrich (EUA). Este experimento foi realizado nos laboratórios do Departamento de Ciência de Alimentos da Universidade de Guelph, em Guelph, Canadá, nos Laboratórios do Departamento de Ciência e Tecnologia de Agroindustrial da Universidade Federal de Pelotas e no

Centro de Diagnóstico e Pesquisa em Micologia Veterinária da Universidade Federal de Pelotas.

### 6.2.2 Extração do óleo essencial de laranja (OEL)

O óleo essencial de laranja foi obtido por hidrodestilação, conforme descrito por Kringel et al. (2017).

### 6.2.3 Atividade antifúngica do OEL

#### 6.2.3.1 Micro-organismos e preparação dos inóculos fúngicos

A atividade antifúngica do OEL foi avaliada contra três cepas de *Aspergillus fumigatus* (Af10, Af71 and Af13073) do Centro Nacional de Aspergilose (Manchester, United Kingdom); dois isolados de *Aspergillus niger* (MV3531 e M1354) da Universidade Federal de Pelotas (UFPel, Pelotas, RS, Brasil) e da Universidade Federal de Rio Grande (FURG, Rio Grande, RS, Brasil), e um isolado de *Aspergillus terreus* (MV3529) da UFPel, totalizando seis micro-organismos. O gênero *Aspergillus* foi escolhido para avaliação, pois é um dos fungos mais importantes associados à deterioração do bolo.

As avaliações antifúngicas *in vitro* foram realizadas pela técnica de microdiluição em caldo, de acordo com o protocolo M38-A2 estabelecido pelo Clinical and Laboratory Standards Institute (2008) com adaptações. Resumidamente, os fungos foram cultivados em placas contendo ágar de dextrose de batata (Acumedia, Lansing, Michigan, EUA) a 30 °C durante 7 dias para induzir a formação de conídios e esporangiósporos. As colônias foram cobertas com 3 mL de solução salina estéril a 0,85% contendo uma gota de Tween 20 (cerca de 0,01 mL) para facilitar a preparação do inóculo. O conteúdo fúngico foi transferido para tubos para a decantação das partículas pesadas. Após cerca de 3 min, as suspensões superiores foram transferidas para tubos contendo soro fisiológico para correção do inóculo para transmitância de 80-82% (correspondente à 0,09 a 0,11 de absorbância) em espectrofotômetro (Spectrum Instruments Co. Shanghai, China) à 530 nm. Após o ajuste da concentração, uma diluição em meio RPMI-1640 (meio Roswell Park Memorial Institute, Sigma, Alemanha), suplementado com glicose 2% e MOPS [3- (ácido N-morfolino propanosulfônico)], foram preparadas na proporção de 1:50 (v/v), correspondendo a uma densidade de aproximadamente 0,4 a 5×10<sup>4</sup> UFC/mL.

### 6.2.3.2 *Concentração inibitória mínima (MIC) e concentração fungicida mínima (CFM)*

Em uma microplaca de 96 poços, prepararam-se diluições seriadas de OEL em meio RPMI-1640 suplementado entre as concentrações de 0,707 a 361,9 mg/mL. Para controle do experimento, poços contendo 100 mL de RPMI-1640, foram adicionados de 100 mL de OEL (para o controle negativo) e 100 mL de inóculo fúngico (para o controle positivo). As microplacas foram incubadas a 35 °C por 48h para estabelecer os valores de CIM, correspondendo a menor concentração do óleo essencial para inibir o crescimento fúngico. Para CFM, 10 µL de cada poço, sem crescimento fúngico visível, foram transferidos para placas de Petri contendo ágar Sabouraud-dextrose (Acumedia, Lansing, Michigan, EUA) suplementadas com cloranfenicol e incubadas a 35 °C por 5 dias. Os valores de CFM correspondem à menor concentração capaz de matar a cepa fúngica.

### 6.2.4 *Preparo do complexo de inclusão $\beta$ -CD/OEL*

O complexo de inclusão entre  $\beta$ -CD/OEL foi preparado pelo método de precipitação conforme Kringel et al. (2017). Uma amostra de 2 g de  $\beta$ -CD foi dissolvida em 50 mL de água destilada a 35°C e lentamente adicionada de 1,5 g de óleo essencial. A mistura foi mantida a 35°C com agitação constante durante 3h. Após esfriar até temperatura ambiente, a solução foi mantida a 5°C durante a noite. O material precipitado foi recuperado por filtração a vácuo. O precipitado foi lavado com etanol (99% de pureza) e seco em estufa com circulação de ar à 50 °C durante 24h. O complexo de inclusão obtido foi armazenado em refrigerador em frascos selados até o uso.

### 6.2.5 *Preparo das cápsulas de zeína e complexo de inclusão ( $\beta$ -CD/OEL)*

As cápsulas de zeína e complexo de inclusão  $\beta$ -CD/OEL foram preparadas pelo método de precipitação utilizando antissolvente segundo Zhong e Jin (2009), com adaptações. Todo processo foi realizado em temperatura ambiente. A solução de zeína foi preparada dissolvendo 10% de zeína (p/v) em 10 mL de uma solução aquosa de etanol 70%. A solução de zeína foi lentamente adicionada à 10 mL de soluções aquosas contendo diferentes concentrações do complexo de inclusão  $\beta$ -CD/OEL (2,5; 5,0 e 7,5% m/m, em relação à zeína), durante 5 min, para induzir a

precipitação das nanocápsulas zeína/complexo de inclusão. As suspensões resultantes de zeína/complexo de inclusão foram secas em *electrospraying* como descrito a seguir.

#### 6.2.6 *Obtenção das cápsulas de zeína/complexo de inclusão $\beta$ -CD/OEL por electrospraying*

As suspensões obtidas no item 6.2.5 foram colocadas em seringa plástica de 6 mL e bombeada (modelo 780100; Kd Scientific Inc., Holliston, MA, EUA) a um fluxo de 1 mL/h através de uma agulha de aço inoxidável de extremidade chata (Fisher Scientific, Ottawa, ON, Canadá). A agulha foi conectada a um eletrodo positivo de uma fonte de alta voltagem contínua (ES30R-5W/DM; Gamma High Voltage Research, EUA) à 20 kV. As cápsulas obtidas por *electrospraying* foram recolhidas numa placa coletora de aço inoxidável coberta com folha de alumínio. A distância entre a ponta da agulha e o coletor foi fixada em 20 cm. O processo de *electrospraying* foi conduzido a  $22 \pm 2^\circ\text{C}$  e 30% de umidade relativa do ambiente, dentro de uma câmara com controle de umidade e temperatura (MLR-350; SANYO Electric Co., Japão).

#### 6.2.7 *Viscosidade aparente e condutividade elétrica das soluções poliméricas*

A viscosidade aparente foi avaliada usando um viscosímetro digital Brookfield (Modelo DV-II, EUA). A condutividade elétrica das soluções foi determinada usando um medidor de condutividade (modelo CON500, Benchtop Meter, EUA) e expressa em  $\mu\text{S/cm}$ . Todas as medidas foram feitas à temperatura ambiente ( $23 \pm 2^\circ\text{C}$ ).

#### 6.2.8 *Potencial zeta*

O potencial zeta da suspensão foi medido pela técnica de espalhamento dinâmico de luz (DLS) (Zetasizer Nano, Malvern Instruments, Worcestershire, RU). As soluções poliméricas (item 6.2.5) foram diluídas 100 vezes em solução aquosa de etanol 70% e as medidas foram realizadas a  $25^\circ\text{C}$ .

#### 6.2.9 *Morfologia e distribuição de diâmetro das cápsulas*

A morfologia das cápsulas foi avaliada utilizando microscópio eletrônico de varredura (MEV, Modelo K550, Emitech, Ash-ford, Kent, RU) com aceleração de 12 kV. As amostras foram recobertas com ouro usando um metalizador a vácuo

(Denton Desk V, Denton Vacuum, EUA). O diâmetro médio e a distribuição dos diâmetros das cápsulas foram avaliados a partir das micrografias, selecionando aleatoriamente 100 objetos para medição, com o auxílio de um software de análise de imagem (ImageJ, National Institutes of Health, EUA).

#### 6.2.10 Eficiência de encapsulação (EE) do OEL

Considerando a maior uniformidade das cápsulas da suspensão contendo 5,0% do complexo de inclusão  $\beta$ -CD/OEL, a análise de EE foi realizada somente para esta amostra. A medida foi realizada conforme Ghasemi et al. (2017) com algumas modificações. Para a determinação do conteúdo de OEL superficial, dispersaram-se 0,5 g de amostra em 20 mL de hexano, misturou-se durante 20 min em agitador magnético e filtrou-se utilizando papel de filtro Whatman n° 41, seguido por análise espectrofotométrica a 231 nm. Para o conteúdo total de OEL, 0,5 g de amostra foram dissolvidos em 20 mL de água destilada e misturados até completa dissolução. Em seguida, adicionaram-se 20 mL de hexano à solução preparada e misturou-se durante mais 5 min. Esta solução foi centrifugada a 3500 rpm durante 20 min e o sobrenadante foi coletado para determinar o total de OEL encapsulado. A EE foi calculada conforme Equação 5.

$$EE (\%) = \frac{\text{Conteúdo total de OEL} - \text{Conteúdo de OEL na superfície}}{\text{Conteúdo total de OEL}} \times 100 \quad \text{Eq. (5)}$$

#### 6.2.11 Difração de raio-X (DRX)

Os difratogramas das amostras ( $\beta$ -CD, complexo de inclusão  $\beta$ -CD/OEL, zeína e cápsulas de zeína:complexo de inclusão  $\beta$ -CD/OEL) foram obtidos em difratômetro de raios-X (SSX-550, Shimadzu, Brasil) com Cu K  $\alpha$  ( $\lambda = 1,540 \text{ \AA}$ , 30 kV), na faixa de 2 a 50° (2 $\theta$ ) e 1 s<sup>-1</sup> em cada etapa.

#### 6.2.12 Elaboração dos bolos

A formulação dos bolos (Tabela 6) foi baseada no método 10-90.01 da AACC (2010), com algumas modificações.

**Tabela 6.** Formulação dos bolos controle, com OEL encapsulado e OEL livre.

Ingredientes (g/100g farinha de trigo)	Bolo controle*	Bolo com OEL encapsulado**	Bolo com OEL livre
Farinha de trigo	100	100	100
Açúcar	90	90	90
Sal	1	1	1
Ovos	41	41	41
Margarina	11	11	11
Leite	40	40	40
Fermento químico	5,2	5,2	5,2
OEL livre	-	-	0,6 <sup>a</sup>
OEL encapsulado	-	1,7 <sup>b</sup>	-

<sup>a</sup> Quantidade máxima de aromatizante permitido pela legislação <sup>b</sup> Calculado com base na eficiência de encapsulação; OEL: óleo essencial de laranja.

Para avaliação visual da incidência fúngica, foram produzidas três formulações de bolos: um bolo controle (sem OEL), um bolo com OEL encapsulado em zeína: complexo de inclusão  $\beta$ -CD/OEL (5% m/m) e um bolo com OEL livre. A concentração de complexo de inclusão  $\beta$ -CD/OEL utilizada (5% p/p) foi escolhida com base nos resultados anteriores de morfologia e EE. Para preparar os bolos, os ingredientes secos (farinha, sal e açúcar) foram misturados por 1 min utilizando batedeira planetária (KSM150PSOB Artisan, KitchenAid, Estados Unidos). Os demais ingredientes (ovos, leite e margarina) e o óleo essencial de laranja (livre e encapsulado) foram adicionados em duas etapas. Na primeira etapa a mistura foi realizada em baixa velocidade por 2 min para misturar a massa e a segunda etapa em velocidade média por 6 min para incorporar o ar na massa. Por fim, o fermento em pó foi adicionado e misturado por 30 s em baixa velocidade. A massa (30 g) foi distribuída em formas de alumínio untadas com margarina e assada em forno elétrico pré-aquecido, por 20 min a 180°C. Após o forneamento, os bolos foram resfriados por 3 h à temperatura ambiente ( $\pm 20^\circ\text{C}$ ), acondicionados em sacos de polipropileno e armazenados a 20°C para avaliação da estabilidade fúngica. As amostras de bolo foram fotografadas periodicamente para avaliar a incidência de fungos. A atividade de água ( $A_w$ ) dos bolos foi determinada no tempo zero e após a

primeira incidência fúngica, utilizando um medidor de atividade de água (LabTouch-aw, Novasina, Lachen, Suíça).

### 6.2.13 Análise estatística

As análises foram realizadas em triplicata, com exceção da difração de raios-X. Os erros foram relatados como desvio padrão. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de significância, usando análise de variância (ANOVA) no software Statistica 5.0. A comparação de dois grupos foi realizada pelo teste t com significância de 5%.

## 6.3 Resultados e discussão

### 6.3.1 Atividade antifúngica do OEL

As espécies de *Aspergillus* são frequentemente associadas à deterioração em produtos de panificação. Por estas razões, o gênero *Aspergillus* spp. foi escolhido para avaliar a atividade antifúngica do OEL neste estudo. A atividade antifúngica *in vitro* do OEL está apresentada na Tabela 7.

O óleo essencial de laranja inibiu 100% do crescimento dos isolados de *Aspergillus*, variando os valores de CIM e CFM de 45,24 a 90,47 mg/mL e 45,24 a > 180,95 mg/mL, respectivamente. Entre os fungos testados, *A. terreus* (MV 3529) foi o mais sensível ao OEL com valores semelhantes de CIM e CFM (45,24 mg/mL), seguido por *A. niger* mostrando a atividade fungistática e fungicida nas mesmas concentrações (90,47 mg/mL). O OEL inibiu todas as cepas de *A. fumigatus* testadas (CIM: 90,47 mg/mL), embora uma concentração maior tenha sido necessária para atingir um efeito letal (CFM  $\geq$ 180,95 mg/mL).

O gênero *Aspergillus* possui centenas de espécies comumente encontradas em ambientes ricos em oxigênio. Dados reportados na literatura mostram que óleos essenciais de citros possuem amplo espectro contra o gênero *Aspergillus*, incluindo *A. niger*, *A. flavus*, *A. fumigatus*, *A. terreus* e *A. parasiticus* (JING et al., 2014). As atividades antifúngicas do OEL podem ser atribuídas ao limoneno, um terpeno que é o principal componente (96%) do óleo essencial de laranja (KRINGEL et al., 2017; SIMAS et al., 2017). A propriedade antifúngica do limoneno está relacionada à sua capacidade de penetrar na parede celular fúngica e romper a membrana celular, causando vazamento citoplasmático, inibindo o crescimento micelial e induzindo eventual morte celular (JING et al., 2014; SIMAS et al., 2017; TAO et al., 2014).

**Tabela 7.** Concentração inibitória mínima (CIM) e concentração fungicida mínima (CFM) de OEL frente às espécies de *Aspergillus*.

<i>Aspergillus</i>	Cepas	CIM (mg/mL)	CFM (mg/mL)
<i>Aspergillus niger</i>	MV 3531	90,47	90,47
<i>Aspergillus niger</i>	M 1354	90,47	90,47
<i>Aspergillus terreus</i>	MV 3529	90,47	45,24
<i>Aspergillus fumigatus</i>	Af 10	90,47	180,95
<i>Aspergillus fumigatus</i>	Af 71	90,47	>180,95
<i>Aspergillus fumigatus</i>	Af 13073	90,47	180,95

\* A letra de cada número de cepa/ isolado está relacionada às seguintes coleções culturais: os isolados "MV" pertencem ao Centro de Diagnóstico e Pesquisa em Micologia Veterinária (Universidade Federal de Pelotas, UFPEL, RS, Brasil); Os isolados "M" pertencem à Faculdade de Medicina (Universidade Federal do Rio Grande, FURG, Rio Grande RS, Brasil); "Af" pertence ao *National Aspergillosis Center* (Manchester, Reino Unido).

### 6.3.2 Viscosidade aparente e condutividade elétrica das soluções poliméricas

A viscosidade aparente e a condutividade elétrica das soluções de zeína e do complexo de inclusão  $\beta$ -CD/OEL em diferentes concentrações estão demonstradas na Tabela 8.

**Tabela 8.** Viscosidade aparente e condutividade elétrica de soluções poliméricas com diferentes concentrações de complexo de inclusão  $\beta$ -CD /OEL

Complexo de inclusão*	Viscosidade aparente	Condutividade elétrica
(%: p/v)	(mPa.s <sup>-1</sup> )	( $\mu$ s.cm <sup>-1</sup> )
2,5	13,1 $\pm$ 0,2 <sup>a</sup>	178,8 $\pm$ 0,2 <sup>c</sup>
5,0	13,1 $\pm$ 0,2 <sup>a</sup>	236,6 $\pm$ 1,0 <sup>b</sup>
7,5	9,0 $\pm$ 0,1 <sup>b</sup>	259,3 $\pm$ 1,2 <sup>a</sup>

\*Média  $\pm$ desvio padrão. Médias com letras distintas na mesma coluna apresentam diferença estatisticamente significativa entre si ( $p < 0,05$ ).

Os valores de viscosidade aparente não foram significativamente diferentes ( $p > 0,05$ ) entre as amostras com concentrações do complexo de inclusão de 2,5 e 5,0% (p/v). No entanto, quando utilizado 7,5% (p/v) de complexo de inclusão, a viscosidade aparente diminuiu significativamente ( $p < 0,05$ ). Por outro lado, a condutividade elétrica aumentou à medida que a concentração do complexo de

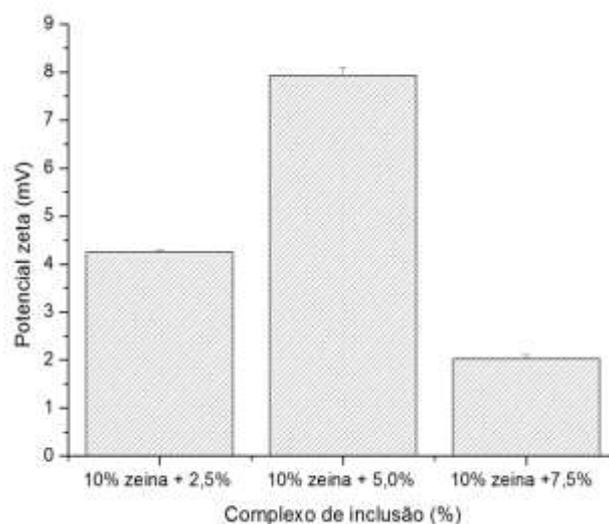
inclusão nas soluções de zeína aumentou. Segundo Bhushani e Anandharamakrishnan (2014), as concentrações do polímero afetam a viscosidade e a tensão superficial da solução e, portanto, influenciam no produto formado no *electrospraying*.

De acordo com Maron et al. (1959), a viscosidade da solução está diretamente relacionada à extensão do emaranhamento das cadeias das moléculas do polímero na solução. Assim, o aumento da viscosidade da solução polimérica tende a dificultar a formação de gotículas durante o *electrospraying*. Por outro lado, soluções com baixa concentração são diluídas para que não ocorra o emaranhamento da cadeia, quebrando-se em gotículas (BHUSHANI; ANANDHARAMAKRISHNAN, 2014; CHAKRABORTY et al., 2009).

Geralmente, a condutividade das soluções aumenta com o aumento da concentração do polímero, conseqüentemente soluções mais viscosas têm uma maior condutividade (SMEETS et al., 2017). Entretanto, neste estudo, embora a condutividade elétrica tenha sido proporcional à concentração do polímero, a viscosidade foi inversamente proporcional às soluções (Tabela 8).

### 6.3.3 Potencial zeta

O potencial zeta das soluções poliméricas está apresentado na Figura 19. Como mostrado na figura, o complexo de inclusão do  $\beta$ -CD/OEL 5,0% apresentou o maior valor de potencial zeta ( $7,94 \pm 0,04$  mV), indicando maior estabilidade em comparação com as soluções contendo 2,5% ( $4,25 \pm 0,15$  mV) e 7,5% ( $2,05 \pm 0,07$  mV) do complexo de inclusão  $\beta$ -CD/OEL. Os valores de potencial zeta indicam o nível de estabilidade da dispersão coloidal suspensa. A faixa de pontos isoelétricos da zeína está entre pH 5,8-6,5. Nesse pH, a carga de partículas é zero, o que leva à agregação das dispersões de partículas. As partículas ficam carregadas positivamente quando baixam o pH para 3 e carregam negativamente acima do ponto isoelétrico (CHATSIKVILI et al., 2017).



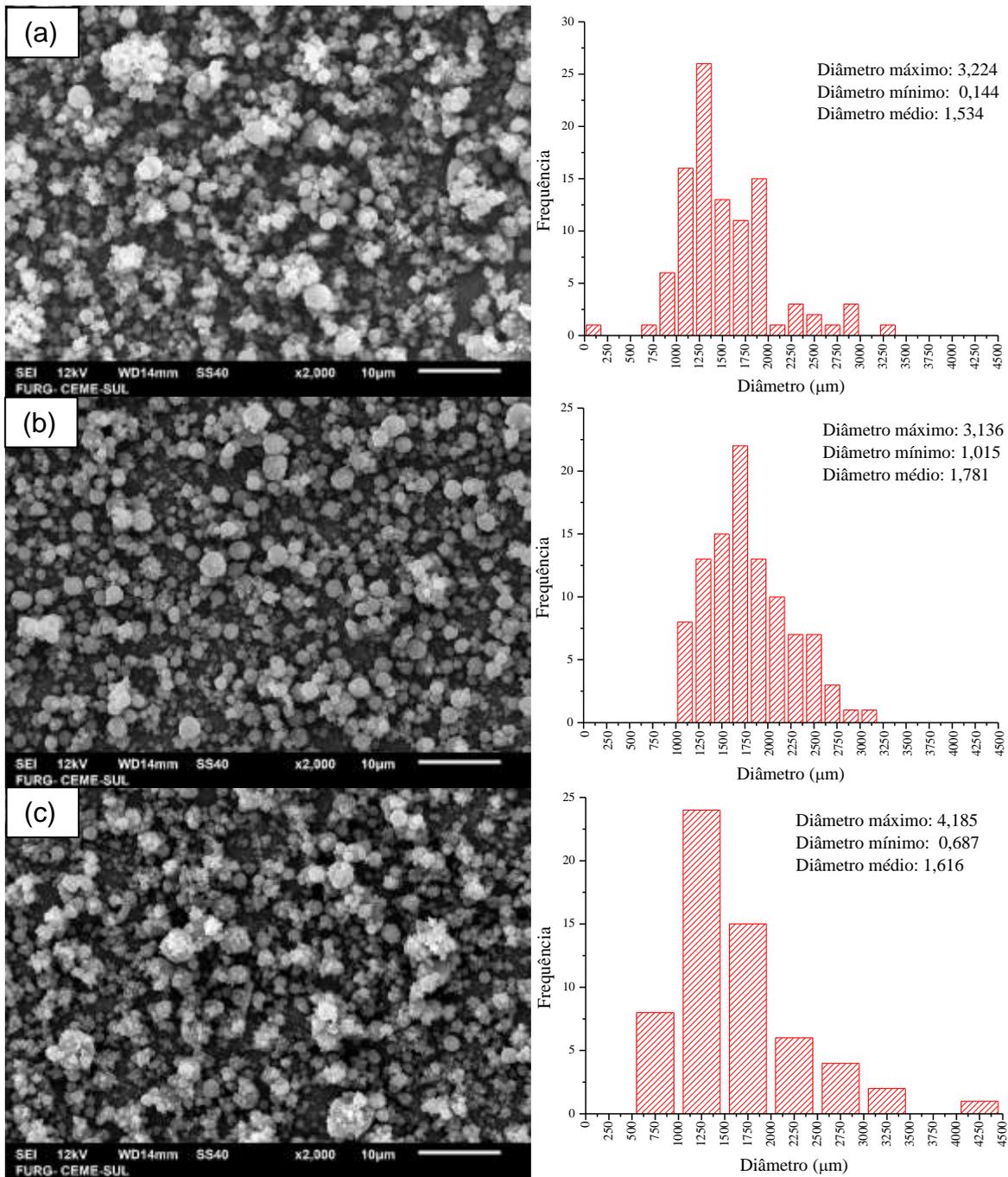
**Figura 19.** Potencial zeta (mV) das soluções poliméricas contendo diferentes concentrações de  $\beta$ -CD/OEL

Valores de potencial zeta superiores a  $\pm 30$  mV indicam partículas altamente carregadas (negativas ou positivas), formando dispersões estáveis fisicamente devido à repulsão eletrostática. Neste estudo, os valores do potencial zeta foram menores que  $\pm 30$  mV, indicando tendência de agregação de partículas, devido a níveis insuficientes de copolímeros para saturar completamente as superfícies das partículas (DAVIDOV-PARDO et al., 2015).

Além disso, segundo Liang et al. (2018), o aumento do potencial zeta mostra a maior interação entre os componentes das cápsulas de zeína. Assim, a solução contendo 5,0% do complexo de inclusão  $\beta$ -CD/OEL apresentou maior estabilidade e interação entre o complexo de inclusão  $\beta$ -CD/OEL e zeína, quando comparada com as soluções contendo 2,5% e 7,5% de complexo de inclusão  $\beta$ -CD/OEL.

#### 6.3.4 Morfologia e distribuição de diâmetro das cápsulas

As morfologias e a distribuição de tamanho das cápsulas estão apresentadas na Figura 20. As micrografias mostraram cápsulas de formato esférico e regulares. As cápsulas contendo 2,5 e 7,5% de complexo de inclusão  $\beta$ -CD/OEL (Figuras 20a e 20c) apresentaram estrutura menos uniforme com cápsulas mais agregadas.



**Figura 20.** Micrografias e distribuição do diâmetro das cápsulas preparadas com diferentes concentrações de  $\beta$ -CD/OEL. (a) 2,5%; (b) 5,0%; (c) 7,5%.

No método de precipitação antissolvente, a zeína torna-se insolúvel e precipita para formar nanopartículas quando a concentração de etanol diminui, resultando em estrutura menos ordenada (LI et al., 2013). Além disso, a agregação das cápsulas pode estar associada aos valores do potencial zeta, onde as soluções contendo 2,5 e 7,5% de  $\beta$ -CD/OEL apresentaram menor estabilidade e, conseqüentemente, maior tendência de agregação das cápsulas (Figura 20).

As cápsulas produzidas com 2,5 e 7,5% de complexo de inclusão  $\beta$ -CD/OEL mostraram rugosidade em sua superfície, o que pode estar associado ao encolhimento do material da parede durante o processo de secagem (CAMPELO et al., 2017). A morfologia das cápsulas é um importante parâmetro de qualidade visto que as estruturas fissuradas ou danificadas podem comprometer a estabilidade do material encapsulado (BOTREL et al., 2014).

O menor diâmetro médio encontrado foi de 1,534  $\mu\text{m}$  para cápsulas produzidas com 2,5% de complexo de inclusão  $\beta$ -CD/OEL e o maior diâmetro médio foi de 1,781  $\mu\text{m}$  para cápsulas com 7,5% de complexo de inclusão  $\beta$ -CD/OEL. Li et al. (2013) produziram nanopartículas de zeína com ou sem óleo essencial de timol pelo método antissolvente modificado e o mesmo comportamento foi relatado. Os autores observaram que quando as razões timol-zeína aumentaram de 0,1 para 0,4 (m/m), o tamanho das partículas aumentou de 160,8 para 264,3 nm. Segundo estes autores, em concentrações mais elevadas, o óleo essencial pode acumular na superfície da cápsula e aumentar a interação hidrofóbica, induzindo o comportamento de agregação.

A morfologia das cápsulas está diretamente relacionada à concentração de polímero, peso molecular e condutividade elétrica da solução. Geralmente, em soluções com menor diâmetro pode ser utilizada uma maior condutividade elétrica da solução e menor concentração de polímeros (GHORANI; TUCKER, 2015; SMEETS et al., 2017). Resultados semelhantes foram encontrados neste estudo, entretanto, além do menor diâmetro na menor concentração de polímero, a menor condutividade elétrica foi relatada (Tabela 8).

Zhong e Jin (2009) estudaram nanopartículas de zeína produzidas pelo mesmo método utilizado no presente estudo e também observaram estruturas regulares e esféricas, com tamanho de partícula variando de 100 a 200 nm. Segundo estes autores, se o tempo para o rompimento das gotículas durante o processo de *electrospraying* é menor do que o tempo de solidificação da zeína, nanopartículas de zeína esféricas tendem a se formar. Quando a solidificação da zeína ocorre antes do rompimento das gotículas ou se ocorre a coalescência parcial das gotículas, as estruturas irregulares tendem a ser predominantes.

Em outro estudo, Li et al. (2013) produziram nanopartículas de zeína antimicrobianas por meio de um método antissolvente modificado e observaram partículas coloidais esféricas e lisas, com tamanho entre 100 e 300 nm. As cápsulas

obtidas neste estudo também apresentaram formato esférico, porém com tamanho maior (Figuras 20a, 20b e 20c). A morfologia e o tamanho das partículas podem estar associados à relação zeína: óleo essencial e ao processo utilizado para a encapsulação (QUISPE-CONDORI et al., 2011).

### 6.3.5 Eficiência de encapsulação

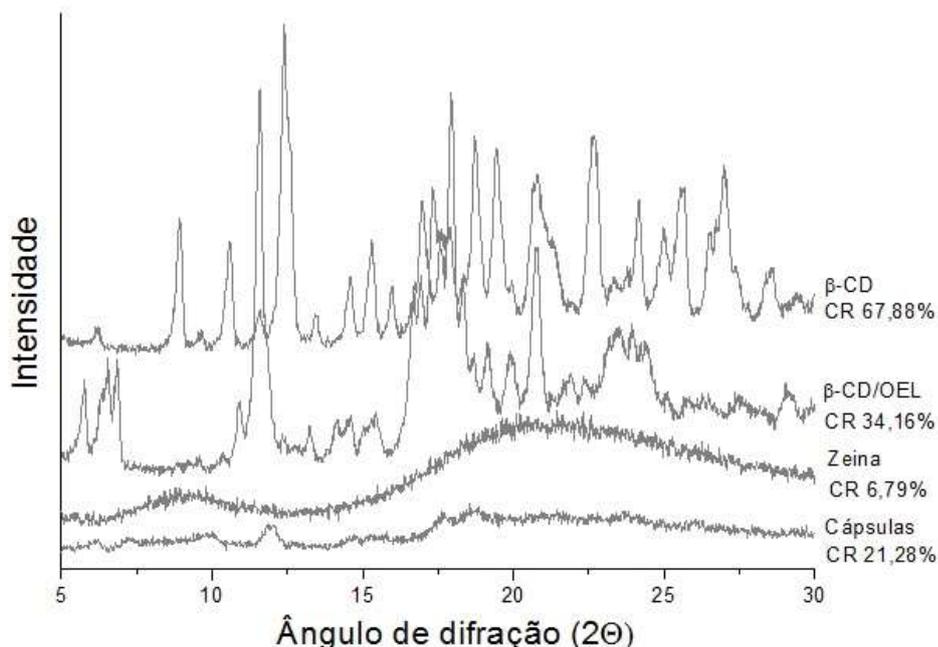
O complexo de inclusão  $\beta$ -CD/OEL e as cápsulas zeína:complexo de inclusão  $\beta$ -CD/OEL apresentaram os mesmos valores de eficiência de encapsulação, em torno de 35%. Este resultado mostra que o óleo essencial foi encapsulado principalmente no complexo de  $\beta$ -ciclodextrina e que o *electrospraying* não resultou na perda substancial do teor de óleo essencial.

Em estudo realizado por Wen et al. (2016), que avaliaram o complexo de inclusão entre óleo essencial de canela e  $\beta$ -ciclodextrina, os autores obtiveram EE de 10,8%, valor significativamente inferior ao reportado nesse estudo. Esta diferença pode estar relacionada com o método de encapsulação utilizado no presente estudo, resultando em maior valor de EE. Além de o método utilizado ser diferente (*electrospraying* x precipitação antissolvente), os óleos essenciais (óleo essencial de canela x OEL) e as matrizes também foram diferentes (ácido polilático x zeína), o que pode justificar as diferenças nos resultados encontrados.

Kfoury et al. (2015) relataram valores de EE de 60% e 80% para os complexos de inclusão entre  $\beta$ -CD e óleo essencial de estragão em proporções 3:1 e 6:1, respectivamente. Estes resultados podem ser atribuídos à razão molar utilizada ser mais elevada, bem como o método de secagem por liofilização utilizado, que minimiza as perdas por evaporação do óleo essencial. Abarca, et al. (2016) estudaram o complexo de inclusão entre 2-nonanona (2-NN) e  $\beta$ -ciclodextrina preparada por co-precipitação e relataram um EE variando entre 34,8% e 1,9%, utilizando razões molares de 1:0,5 e 1:2, respectivamente. De acordo com estes autores, a diferença significativa entre as razões molares usadas, pode ser atribuída à estrutura química e as propriedades físicas da molécula hospedeira, o tipo de interação entre a molécula e a  $\beta$ -CD ou o processo utilizado para sintetizar os complexos.

### 6.3.6 Difração de raio-X

Os padrões de raios-x da  $\beta$ -CD, do complexo de inclusão  $\beta$ -CD/OEL, da zeína e das cápsulas de zeína:complexo de inclusão  $\beta$ -CD/OEL estão apresentados na Figura 21.



**Figura 21.** Padrões de raios X da  $\beta$ -CD, do complexo de inclusão  $\beta$ -CD/OEO, da zeína e das cápsulas de zeína:complexo de inclusão  $\beta$ -CD / OEO.

Analisando os padrões de raio-X das amostras é possível observar um pico em formato acentuado entre  $8,92^\circ$  a  $28,52^\circ$  ( $2\theta$ ), característico da  $\beta$ -CD, indicando uma estrutura cristalina com cristalinidade relativa (CR) de 67,9%. No difratograma do complexo de inclusão  $\beta$ -CD/OEL foi observada a intensificação de alguns picos tais como  $11,60^\circ$ ,  $16,96^\circ$  à  $17,92^\circ$  e  $23,11^\circ$  à  $24,35^\circ$ , bem como uma diminuição em  $8,90^\circ$ ,  $25,62^\circ$ ,  $27,04^\circ$  e  $28,55^\circ$ . Além disso, foi observada mudanças nos padrões de difração entre  $\beta$ -CD/OEL e  $\beta$ -CD indicando a complexação com o OEL bem sucedida.

Os padrões de raios-X da zeína não apresentaram picos cristalinos, entretanto, duas estruturas largas em  $8,96^\circ$  e  $21,44^\circ$  foram observadas, mostrando suas propriedades amorfas, como pode ser confirmado pela CR de 6,8%. Nas cápsulas de zeína:complexo de inclusão  $\beta$ -CD/OEL, observou-se uma CR de 21,28% e um menor pico em  $17,07^\circ$ , confirmando o sucesso do processo de encapsulação.

Resultados semelhantes foram reportados por Liang et al. (2017), que relataram uma diminuição na intensidade dos picos na amostra encapsulada.

### 6.3.7 Incidência fúngica em bolos

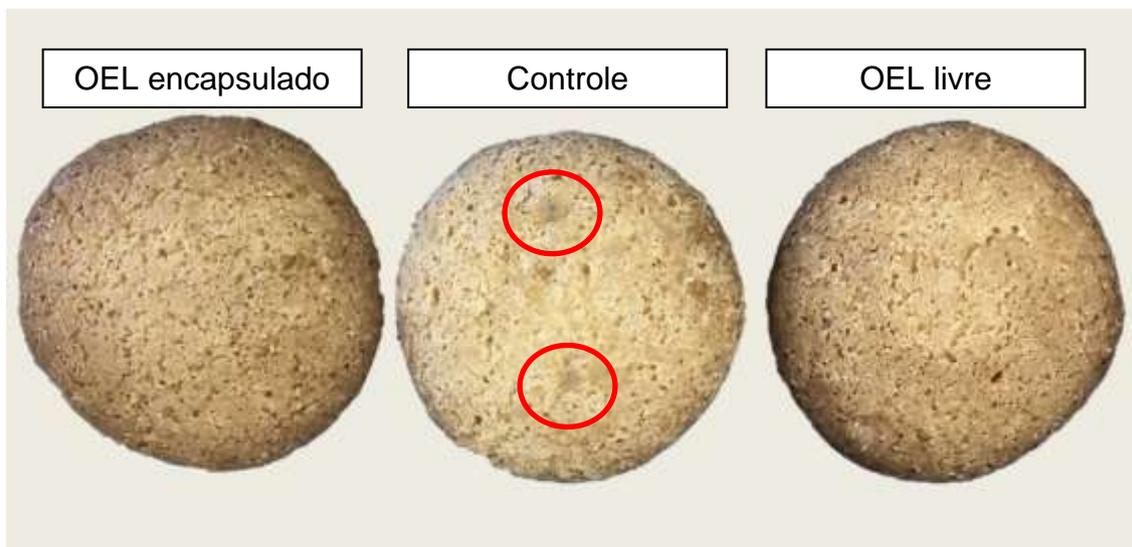
A primeira incidência fúngica foi detectada nas amostras do bolo controle, após 30 dias de armazenamento (Figura 22a). Os bolos formulados com o OEL encapsulado em cápsulas de zeína:complexo de inclusão  $\beta$ -CD/OEL, bem como os bolos elaborados com OEL livre apresentaram a primeira incidência fúngica após 150 dias de armazenamento (Figuras 22b). Todas as amostras apresentaram valores de  $a_w$  de aproximadamente 0,80, sem variação durante o tempo avaliado (0 e 30 dias). Isso sugere que a embalagem impediu a perda de umidade das amostras de bolo, em todas as amostras analisadas.

Os bolos industrializados são mais suscetíveis à deterioração por fungos devido ao longo tempo de armazenamento (>45 dias) e ao aumento de  $a_w$  (0,78 para 0,95). Sirisoontarak et al. (2017) e Gonçalves et al. (2018) relataram valores de  $a_w$  mais elevados do que o presente estudo para bolos tipo *chiffon*, sem ( $a_w$  0,85) e com ( $a_w$  0,87) óleo essencial de tomilho encapsulado. Segundo Sirisoontarak et al. (2017) bolos com aproximadamente 0,85 resultaram no crescimento de espécies de *Aspergillus*. Neste estudo, apesar dos bolos apresentarem valores similares de  $a_w$  (condição favorável ao crescimento fúngico), os bolos com OEL (livre e encapsulado) controlaram a incidência dos fungos, estendendo a vida útil do produto por 150 dias de armazenamento.

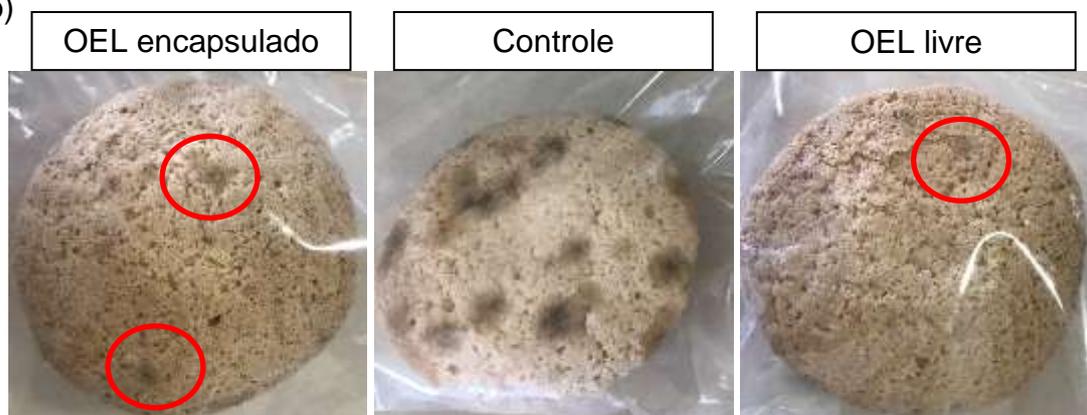
Debonne et al. (2018) avaliaram a atividade antifúngica *in vitro* de óleo essencial de tomilho (*Thymus zygis*) contra *A. niger* e *Penicillium paneum* e sua atividade em pão e massa de pão fermentada. Os autores concluíram que, apesar das propriedades antifúngicas promissoras do óleo essencial de tomilho, não foi observada um aumento efetivo na vida útil do pão. Além disso, as propriedades tecnológicas e de aroma do pão foram afetadas negativamente pelo óleo essencial de tomilho, sugerindo a importância de substituir a utilização destes óleos essenciais por outros menos aromáticos. Bozik et al. (2017) avaliaram a atividade antifúngica de diferentes óleos essenciais (canela, tomilho, orégano, cravo, capim-limão e gengibre) contra três cepas de *Aspergillus* e o efeito de tratamentos com óleo essencial no perfil sensorial de aveia. Eles observaram alta atividade antifúngica dos óleos essenciais, embora o forte aroma e sabor afetasse negativamente a

aceitação do consumidor. Com base nisso, o complexo de inclusão  $\beta$ -CD/OEL desenvolvido no presente estudo pode ser utilizado como um agente antifúngico alternativo.

(a)



(b)



**Figura 22.** Incidência fúngica nos bolos controle e com OEL livre e encapsulado após 30 dias(a) e 150 dias (b) de armazenamento.

As perdas econômicas nas indústrias de panificação por deterioração fúngica, bem como as exigências dos consumidores por alta qualidade, segurança e alimentos processados com vida útil prolongada e propriedades sensoriais preservadas, estimulam a busca por novos conservantes naturais (RIZZELLO et al., 2017). Neste contexto, o óleo essencial de laranja representa uma alternativa como conservante natural e como ingrediente alimentar. Além disso, há pouca evidência

de produtos de panificação com óleos essenciais e não há relatos na literatura sobre o bolo com óleo essencial de laranja encapsulado ou livre.

#### **6.4 Conclusão**

As cápsulas preparadas com 5,0% de complexo de inclusão  $\beta$ -CD/OEL por processo de precipitação antissolvente, seguido pela técnica de *electrospraying* exibiram um considerável efeito inibidor contra todas as espécies de *Aspergillus* testadas. O OEL, tanto na forma livre quanto encapsulada, retardou efetivamente a incidência fúngica dos bolos, prolongando a estabilidade fúngica de 30 para 150 dias. Esses resultados sugerem o potencial uso do óleo essencial de laranja como conservante antifúngico natural em alimentos.

#### **6.5 Estudos futuros**

Com base nos resultados obtidos neste estudo permanecem algumas questões que precisam ser respondidas por estudos futuros.

Tendo em vista os resultados obtidos no primeiro estudo (Capítulo 1) referentes à estabilidade do complexo de inclusão, que demonstraram que a  $\beta$ -ciclodextrina é capaz de reter cerca de 98,6% dos voláteis mesmo após 15 dias de armazenamento e dos resultados obtidos neste estudo, que mostraram que mesmo após o forneamento dos bolos o OEL ainda apresentava atividade antifúngica, adiando efetivamente a deterioração microbiológica destes e prolongando seu prazo de validade, pretende-se realizar o seguinte estudo futuro: Elaboração de pré-misturas de bolo, contendo o OEL na forma livre e encapsulado, avaliando o mecanismo de liberação dos voláteis durante o armazenamento, bem como a análise de voláteis no produto acabado, ou seja, no bolo após o forneamento, para conferir se permanece algum composto ativo do OEL que seja responsável pela inibição do crescimento de *Aspergillus*.

**7 Capítulo 5 – Artigo a ser submetido**

**Armazenamento de pré-misturas de bolo contendo óleo essencial de laranja livre e encapsulado em  $\beta$ -ciclodextrina: efeito sobre as propriedades tecnológicas, sensoriais e de digestibilidade *in vitro***

Artigo escrito para o periódico *LWT-Food Science and Technology*

Qualis 2012-2016 em Ciência de Alimentos: A1

Fator de impacto: 3,13

ISSN 0023-6438



## Resumo

O óleo essencial de laranja (OEL) é amplamente utilizado como agente aromatizante em alimentos, no entanto, devido a sua susceptibilidade à oxidação e elevada volatilidade precisa ser protegido em materiais compatíveis com a sua aplicação. Nesse sentido, uma alternativa é a sua encapsulação em  $\beta$ -ciclodextrina, através da formação de complexos de inclusão. Objetivou-se com este estudo aplicar o OEL na forma livre e encapsulado em  $\beta$ -ciclodextrina em pré-misturas de bolo e avaliar a sua influência nas propriedades tecnológicas dos bolos. Além disso, a influência do OEL, de forma livre e encapsulada, nas propriedades sensoriais e de digestibilidade *in vitro* dos bolos também foi avaliada. As pré-misturas foram preparadas e acondicionadas em sacos de polietileno de baixa densidade e armazenadas em ambiente com temperatura controlada (20°C) por 6 meses. No tempo zero (dia da preparação da pré mistura), e após 3 e 6 meses de armazenamento das mesmas, as misturas foram usadas para a produção de bolos: um bolo controle (sem OEL), um bolo com OEL livre e um bolo com OEL encapsulado em  $\beta$ -CD ( $\beta$ -CD/OEL). Os bolos obtidos foram avaliados quanto às suas propriedades tecnológicas, no dia da produção e após 3 e 6 meses de armazenamento, através das seguintes análises: umidade; volume específico, cor e análise de perfil de textura (TPA). Além disso, foi realizada a análise de digestibilidade *in vitro* e análise sensorial dos bolos. O bolo com  $\beta$ -CD/OEL apresentou maior volume após armazenamento da respectiva pré-mistura por 6 meses; menor dureza (durante todos os tempos de armazenamento avaliados) e menor percentual de amido hidrolisado após digestibilidade *in vitro*. Por outro lado, o bolo com OEL livre foi o preferido por 60% dos julgadores e o que apresentou maior intensidade do sabor de laranja segundo resultados obtidos na análise sensorial.

**Palavras-chave:** armazenamento, bolos, digestibilidade, óleo essencial de laranja, propriedades tecnológicas, sensorial.



## 7.1 Introdução

Produtos de panificação quando armazenados em condições convencionais e sem uso de conservantes tendem a apresentar uma curta vida útil (3 a 4 dias) (PASSARINHO et al., 2014). O envelhecimento e a perda de qualidade destes produtos são resultantes principalmente do aumento da atividade de água do produto, levando à deterioração microbiológica e consequentes perdas econômicas (MORASSI et al., 2018). Com intuito de contornar esse problema, há anos vêm sendo utilizados diversos conservantes sintéticos (DEBONNE et al., 2018).

Contudo, o aumento de problemas de saúde relacionado ao uso de conservantes sintéticos e a busca por alimentos mais saudáveis tem impulsionado a demanda por produtos livres de aditivos sintéticos (Gonçalves et al., 2017). Essa tendência tem crescido cada vez mais na indústria de panificação, voltando à atenção principalmente o uso de compostos naturais (MARTINS; PINHO; FERREIRA, 2017; SIRISOONTARALAK et al., 2017).

Dentre os compostos naturais utilizados como conservantes em panificação, destacam-se os óleos essenciais de *citrus* (MAHATO et al., 2017), presentes em quantidades significativas na casca de frutas cítricas, sendo o limoneno o composto majoritário, representando mais de 95% dos compostos presentes no óleo essencial de laranja (KRINGEL et al., 2017; LI; LU, 2016). Além de possuir atividades antifúngicas e antibacterianas já comprovadas, o óleo essencial de laranja é comumente utilizado como agente aromatizante em alimentos (HUSSEIN et al., 2019).

Durante o processamento de suco de laranja são geradas grandes quantidades de subprodutos, sendo a casca da laranja o principal deles, podendo representar até 50-65% do peso total (MAHMOUD et al., 2016). Nesse sentido, a exploração de subprodutos do processamento de frutas cítricas e sua aplicação em alimentos é um campo promissor (MAHATO et al., 2018), particularmente em produtos de panificação, como bolos, que são produtos populares e amplamente consumidos (ZŁOTEK, 2018).

Dentre o gênero *Citrus*, a variedade *C. sinensis* Valencia é a principal variedade de laranja produzida no Brasil, que é o principal produtor e exportador de óleos essenciais de laranja (GONÇALVES et al., 2018). Embora amplamente utilizado na indústria de alimentos, o óleo essencial de laranja (OEL) na forma livre possui limitações tecnológicas devido à sua alta volatilidade e susceptibilidade à

oxidação na presença de luz, ar e umidade, acarretando na perda da qualidade e diminuição na vida de prateleira dos produtos e por isso, representam desafios consideráveis durante as formulações de alimentos e bebidas (CHEN et al., 2018; DONSI; FERRARI, 2016; WADHWA et al., 2017). Para superar esses desafios e minimizar o impacto nas propriedades organolépticas, o OEL precisa ser protegido em sistemas compatíveis com a sua aplicação em alimentos. (EVAGELIOU; SALIARI, 2017; GHASEMI et al., 2017; LI; LU, 2016).

Nesse sentido, uma alternativa para a proteção do OEL é a formação de complexos de inclusão com ciclodextrinas (CDs) (WADHWA et al., 2017). As CDs possuem uma estrutura característica particular, com cavidades internas hidrofóbicas e extremidades essencialmente hidrofílicas (SANTOS et al., 2017). Essa característica é responsável pela formação de complexos de inclusão com substâncias hidrofóbicas, alterando as suas características físicas e químicas (SHAO et al., 2014; TAO et al., 2014) e fornecendo estabilização e proteção para as moléculas, contra reações de degradação e oxidação (KFOURY et al., 2018a). Além das vantagens citadas acima, vale ressaltar que as CDs são inertes e não interferem nas propriedades biológicas das moléculas hóspedes (KFOURY et al., 2016; KFOURY et al., 2018b).

No entanto, para que se tenha uma proteção bem-sucedida, vários fatores devem ser considerados, a fim de prevenir a perda de aromas e garantir a liberação controlada durante o preparo e/ou armazenamento. Segundo Kfoury et al. (2016) a liberação de moléculas ativas encapsuladas em ciclodextrinas é principalmente influenciada por fatores ambientais específicos, como temperatura e umidade relativa (UR), sendo o “gatilho” da liberação ativado em temperaturas acima de 100°C e umidades relativas acima de 75%. Sendo assim, o bolo pode ser considerado uma matriz alimentar interessante para aplicação do OEL encapsulado em CDs.

Diante do exposto, objetivou-se com o estudo aplicar o OEL na forma livre e encapsulado em  $\beta$ -ciclodextrina em pré-misturas de bolo e avaliar a sua influência nas propriedades tecnológicas das pré-misturas e dos bolos durante o armazenamento, além de seu efeito nas propriedades sensoriais e de digestibilidade *in vitro* dos bolos.

## 7.2 Material e métodos

### 7.2.1 Materiais

Para a execução deste estudo foram utilizados os seguintes materiais: óleo essencial de laranja, obtido conforme descrito no item 6.2.2., a  $\beta$ -ciclodextrina comercial ( $\beta$ -CD; 97% de pureza) foi adquirida da Sigma-Aldrich (EUA) e os demais ingredientes para elaboração das pré-misturas e dos bolos no comércio local de Pelotas/RS. Este experimento foi realizado nos laboratórios do Departamento de Ciência e Tecnologia de Agroindustrial da Universidade Federal de Pelotas e no Laboratório de Análise Sensorial da mesma Universidade.

### 7.2.2 Preparo do complexo de inclusão

O complexo de inclusão entre  $\beta$ -CD/OEL foi preparado pelo método de precipitação, de acordo com a metodologia descrita por Kringel et al., (2017) com algumas modificações. Dissolveu-se uma amostra de 2 g de  $\beta$ -CD em 50 mL de água destilada mantida a 35°C em placa de aquecimento e adicionou-se lentamente 1,5 g de óleo essencial à solução quente. A mistura foi continuamente agitada e mantida a 35°C durante 3 h. A solução foi mantida durante 24 h sob refrigeração a 5°C. Recuperou-se o material precipitado por filtração sob vácuo. O precipitado foi lavado com etanol 99% e seco em estufa com circulação forçada de ar a 50°C durante 24 h. O complexo de inclusão obtido foi armazenado e refrigerado em frascos selados

### 7.2.3 Preparo das pré-misturas e dos bolos

A formulação das pré-misturas e dos bolos (Tabela 6) foi baseada no método 10-90.01 da AACC (2010) com algumas modificações. Foram produzidas três formulações de pré-misturas e seus respectivos bolos: um bolo controle (sem OEL), um bolo com OEL encapsulado em  $\beta$ -CD e um bolo com OEL livre. Para as pré-misturas foram utilizados os ingredientes descritos na tabela 6, exceto ovos, margarina e leite.

Para as pré-misturas os ingredientes devidamente pesados foram misturados em batedeira planetária (KSM150PSOB Artisan, KitchenAid, Estados Unidos) durante 10 min, até completa homogeneização. Após, as pré-misturas obtidas foram acondicionadas em sacos de polipropileno e armazenadas a 20°C para posteriores análises. Para preparar os bolos, os ingredientes secos (farinha, sal e açúcar) foram

misturados por 1 min utilizando batedeira planetária (KSM150PSOB Artisan, KitchenAid, Estados Unidos). Os demais ingredientes (ovos, leite e margarina) e o óleo essencial de laranja (livre e encapsulado) foram adicionados em duas etapas. Na primeira etapa a mistura foi realizada em baixa velocidade por 2 min para misturar a massa e a segunda etapa em velocidade média por 6 min para incorporar o ar na massa. Por fim, o fermento em pó foi adicionado e misturado por 30 s em baixa velocidade. A massa (50 g) foi distribuída em formas de alumínio untadas com margarina e assada em forno elétrico pré-aquecido, por 20 min a 180°C. Os bolos foram resfriados à temperatura ambiente por 1h antes das análises.

#### *7.2.4 Estabilidade ao armazenamento*

Para avaliar a estabilidade ao armazenamento as pré-misturas foram acondicionadas em sacos de polietileno de baixa densidade (Apêndice A) e armazenadas em ambiente com temperatura controlada (20°C). As pré-misturas e os bolos obtidos a partir destas foram avaliadas quanto às suas propriedades tecnológicas, no dia da produção e após 3 e 6 meses de armazenamento, através das seguintes análises: umidade das pré-misturas e dos bolos; volume específico, cor e análise de perfil de textura (TPA) dos bolos.

#### *7.2.5 Avaliação das propriedades tecnológicas*

##### *7.2.5.1 Umidade*

O teor de umidade (%) das pré-misturas e dos respectivos bolos foram determinados de acordo com o método 44-15.02 (AACC, 2010). As amostras foram secas em estufa a 105°C e pesadas com precisão e, intervalos de tempo regulares até se atingir um peso constante.

##### *7.2.5.2 Volume específico*

O volume específico (VE) ( $\text{g.mL}^{-1}$ ) dos bolos foi obtido pela razão entre o volume aparente (mL) e a massa do bolo (g) após assado e resfriado. O volume aparente foi determinado pelo método de deslocamento de sementes de painço, medindo-se o volume de sementes deslocadas em uma proveta (PIZZINATTO; CAMPAGNOLLI, 1993).

#### 7.2.5.3 Cor dos bolos

A cor do miolo dos bolos foi medida com colorímetro Minolta (CR-300). Definido pela CIE (Comissão Internacional de Iluminação) sendo registrados os valores  $L^*$  (luminosidade),  $a^*$  e  $b^*$  (coordenadas de cromaticidade), ângulo de leitura de  $10^\circ$  e iluminante  $D_{65}$ .

#### 7.2.5.4 Análise de perfil de textura (TPA)

A análise do perfil de textura (TPA) foi realizada em texturômetro (TA.XTplus, Stable Micro Systems, Reino Unido) equipado com uma sonda cilíndrica (20 mm de diâmetro), conforme metodologia descrita por Guadarrama-Lezama et al. (2016). As análises de textura foram realizadas 1 h após o forneamento dos bolos. Os bolos foram cortados em fatias de 25 mm que foram comprimidas a 40% da sua altura original, utilizando dois ciclos de compressão a uma velocidade de teste de  $1,7 \text{ mm s}^{-1}$ . Os seguintes parâmetros foram quantificados de acordo com as normas do software do equipamento e com base no gráfico resultante da análise: elasticidade (a altura que a amostra recupera durante o tempo que decorre entre o final do primeiro ciclo e o início do segundo ciclo), adesividade (a área de força negativa para o primeiro ciclo, representando o trabalho necessário para puxar o probe de compressão longe da amostra), coesividade (razão entre as áreas positivas durante o segundo e o primeiro pico); firmeza (força máxima do primeiro pico de compressão da curva de força x tempo) e resiliência (medida de recuperação da amostra após compressão).

#### 7.2.5.5 Digestibilidade *in vitro*

A digestão *in vitro* foi simulada de acordo com a metodologia descrita por Dartois et al. (2010), simulando condições gástricas e do intestino delgado. Inicialmente foram pesados 25 g de bolo e adicionados em 170 mL de água, estes foram misturados em liquidificador por aproximadamente 1 segundo para simular o processo de mastigação. Esta mistura foi então adicionada em um reator de vidro encamisado, com capacidade de 500 mL, mantido sob agitação mecânica (300 rpm) e conectado a um banho de circulação de água para manter a temperatura a  $37 \pm 1^\circ\text{C}$ . Os bolos foram digeridos por 30 minutos em fluido gástrico simulado (SGF), contendo pepsina (pH 1,2). Para realizar o segundo passo de digestão, foram adicionados à mistura da reação o fluido intestinal simulado (SIF) contendo

pancreatina, amiloglicosidase e a invertase a fim de simular a digestão no intestino delgado, durante 45 minutos (pH 6,8). Alíquotas de 0,5 mL foram retiradas nos tempos 0, 15 e 30 min de digestão durante a fase gástrica e a 0, 3, 6, 9, 12, 15, 20, 25, 30, 35, 40 e 45 min de digestão durante a fase intestinal e misturadas com 3 mL de etanol absoluto para paralisar a reação. As amostras foram incubadas com uma solução de amiloglicosidase / invertase antes de analisar a glicose utilizando o kit de glicose (GOPOD-FORMAT, K-GLUC 05/2008, Megazyme International Ireland Ltd., Ireland). Os resultados foram expressos como porcentagem de amido hidrolisado conforme Equação 6:

$$SH(\%) = \frac{Sh}{Si} = 0.9 \times \frac{Gp}{Si} \quad \text{Eq. (6)}$$

Onde: SH (%) é o percentual de amido hidrolisado (total); Sh é a quantidade de amido hidrolisado (g), Si é a quantidade inicial de amido (g); GP é a quantidade de glicose produzida (g). 0,9 é um fator de conversão (a partir do amido em glicose) o qual é geralmente calculado a partir do peso molecular do monômero de amido / peso molecular de glicose ( $162/180 = 0,9$ ) (DARTOIS et al., 2010; GOÑI et al., 1997).

Também foi calculada a cinética da hidrólise do amido durante a digestão simulada do intestino delgado (GOÑI et al., 1997) através da Equação 7:

$$C = C_{\infty}(1 - e^{-Kt}) \quad \text{Eq. (7)}$$

Onde C,  $C_{\infty}$  e k representam o percentual de amido hidrolisado, o percentual do equilíbrio da hidrólise (máximo de hidrólise obtido, onde a mesma atingiu o equilíbrio) e a constante cinética, respectivamente.

#### 7.2.5.6 Análise sensorial

Nos bolos com adição de óleo essencial de laranja livre e encapsulado em  $\beta$ -ciclodextrina foram realizados os testes de comparação pareada e preferência. Para realização do teste de comparação pareada as amostras foram codificadas com números aleatórios e apresentadas simultaneamente com ordenação balanceada (AB e BA). Foram disponibilizadas as fichas com os testes (Apêndice B) e um termo

de consentimento livre e esclarecido (Apêndice C) e foi solicitado aos julgadores que experimentassem as amostras da esquerda para a direita, utilizando bochecho com água entre as degustações, e que indicassem em ficha qual amostra apresentada apresentava a maior intensidade do atributo “sabor laranja”. O teste de comparação pareada seguiu o modelo bilateral, ou seja, quando não se sabe se existe diferença entre as amostras em relação a um atributo específico e desta forma, as mesmas amostras são apresentadas em ordem diferente aos julgadores. No teste de preferência, foi solicitado aos julgadores que indicasse qual sua amostra preferida em relação ao atributo “sabor laranja”.

Ambos os testes foram realizados com 60 julgadores não treinados, de ambos os gêneros, pertencentes à comunidade da Universidade Federal de Pelotas. As análises foram realizadas em cabines individuais, sob luz vermelha (para mascarar o atributo cor), onde cada provador recebeu as amostras codificadas com três dígitos escolhidos ao acaso e copo com água.

Os dados obtidos foram analisados através de tabela específica para tal teste, (bilateral,  $p=1/2$ ) com o objetivo de estabelecer o nível de significância em função da relação do número total de provadores e o número de julgadores concordantes (ABNT, 1994).

#### *7.2.6 Análise estatística*

Todas as análises foram realizadas em triplicata. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de significância, usando análise de variância (ANOVA) no software Statistica 5.0.

### **7.3 Resultados e Discussão**

#### *7.3.1 Teor de umidade das pré-misturas e dos bolos*

A umidade das pré-misturas e dos bolos ao longo do armazenamento de 6 meses, avaliados no tempo zero e após 3 e 6 meses, estão apresentadas na Tabela 9. Tanto as pré-misturas quanto os seus respectivos bolos apresentaram a mesma tendência de redução do teor de umidade durante o armazenamento. Entre as pré-misturas foi observada diferença estatisticamente significativa somente após 3 meses de armazenamento, onde a amostra controle (sem adição de OEL) apresentou menor teor de umidade (7,01%) comparada as amostras contendo OEL livre e contendo  $\beta$ -CD/OEL (ambas com 7,18% de umidade). Os resultados

encontrados para as pré-misturas demonstram um indicativo de armazenamento correto, com manutenção do teor umidade e cumprimento aos teores de umidade estabelecido pela legislação (RDC nº 263, Brasil, 2005) que preconiza que a umidade máxima aceitável para farinhas é de 15%. Comportamento semelhante foi encontrado por Gomes et al. (2014), que avaliaram a estabilidade de misturas para bolo sem glúten armazenadas por 240 dias, bem como a qualidade dos respectivos bolos prontos. Esses autores reportaram que as misturas para bolo sem glúten apresentaram boa estabilidade ao longo do armazenamento (240 dias), não havendo variação significativa do teor de umidade (variação máxima de 0,7%) e atribuíram essa estabilidade da umidade à baixa permeabilidade à umidade das embalagens multicamada metalizada utilizadas.

**Tabela 9.** Teor de umidade das pré-misturas e dos bolos durante o armazenamento.

Pré-misturas	Umidade (%)		
	Tempo de armazenamento (meses)		
	Inicial	3	6
Controle	7,99±0,45 <sup>aA</sup>	7,01±0,03 <sup>bB</sup>	6,57±0,30 <sup>aC</sup>
Contendo OEL livre	7,56±0,03 <sup>aA</sup>	7,18±0,05 <sup>aB</sup>	6,84±0,05 <sup>aC</sup>
Contendo β-CD/OEL	7,57±0,17 <sup>aA</sup>	7,18±0,03 <sup>aB</sup>	6,44±0,09 <sup>aC</sup>
<i>Bolos</i>	Inicial	3	6
Controle	40,66±0,15 <sup>aA</sup>	38,99±0,09 <sup>bB</sup>	30,09±0,23 <sup>bC</sup>
Contendo OEL livre	40,15±0,76 <sup>aA</sup>	38,77±0,22 <sup>bB</sup>	31,51±0,48 <sup>bC</sup>
Contendo β-CD/OEL	40,08±0,17 <sup>aA</sup>	39,49±0,14 <sup>aB</sup>	31,97±0,57 <sup>aC</sup>

Média ±desvio padrão. Médias com letras minúsculas distintas na mesma coluna apresentam diferença estatisticamente significativa entre os tratamentos ( $p < 0,05$ ). Médias com letras maiúsculas distintas na mesma linha apresentam diferença estatisticamente significativa entre os tempos de armazenamento ( $p < 0,05$ ).

Em relação à umidade dos bolos, no dia da produção não foi observada diferença estatística entre as amostras. Os bolos contendo β-CD/OEL armazenados após 3 e 6 meses apresentaram maior teor de umidade quando comparados aos bolos controle e contendo OEL livre. Este resultado pode estar relacionado à característica higroscópica da β-ciclodextrina e sua consequente tendência em absorver umidade (KFOURY et al., 2017).

Hussein et al. (2019) adicionaram óleo essencial de laranja não encapsulado, micro e nanoencapsulado em bolo tipo *pão de ló* e relataram que o bolo controle apresentou o maior teor de umidade, enquanto o bolo com óleo essencial não encapsulado apresentou o menor teor de umidade.

Ezhilarasi et al. (2014) analisaram o efeito da adição de extrato de fruta *Garcinia* encapsulado em diferentes materiais de parede na qualidade de pães e constataram que os pães com adição do extrato encapsulado apresentaram maior teor de umidade do que o pão controle, isso porque a incorporação das microcápsulas exigiam a adição de maior quantidade de água durante a preparação da massa.

Ahmed e Hussein (2012) avaliaram o efeito de extratos de canela e laranja sobre a qualidade físico-química, sensorial e microbiológica de pão-de-ló e reportaram que o teor de umidade diminuiu com o aumento da concentração dos extratos (0,03 a 0,30%) sendo, portanto, inferiores ao teor de umidade do bolo controle.

### 7.3.2 *Volume específico dos bolos*

Na Tabela 10 está apresentado o volume específico dos bolos durante o armazenamento. A adição do OEL, seja na forma livre ou encapsulada, não exerceu influência significativa sobre o volume específico dos bolos até 3 meses de armazenamento. Após seis meses de armazenamento houve diferença significativa entre todos os bolos, sendo o bolo com OEL livre o que apresentou o menor volume específico ( $4,58 \text{ g.mL}^{-1}$ ), seguido pelo bolo controle ( $5,48 \text{ g.mL}^{-1}$ ) e por fim pelo bolo com  $\beta$ -CD/OEL ( $6,73 \text{ g.mL}^{-1}$ ), que apresentou o maior volume específico.

Em relação ao tempo de armazenamento foi possível observar que o volume específico do bolo controle e do bolo com OEL livre não apresentou diferença significativa até os 3 meses de armazenamento, seguido de uma redução significativa deste parâmetro após 6 meses de armazenamento. Por outro lado, o volume específico do bolo com  $\beta$ -CD/OEL não apresentou diferença significativa durante o armazenamento.

**Tabela 10.** Volume específico dos bolos durante o armazenamento.

Bolos	Volume específico (g.mL <sup>-1</sup> )		
	Tempo de armazenamento (meses)		
	Inicial	3	6
Controle	6,68±0,54 <sup>aA</sup>	6,64±0,15 <sup>aA</sup>	5,48±0,20 <sup>bB</sup>
Contendo OEL livre	6,88±0,16 <sup>aA</sup>	6,83±0,21 <sup>aA</sup>	4,58±0,05 <sup>cB</sup>
Contendo β-CD/OEL	6,93±0,50 <sup>aA</sup>	6,70±0,25 <sup>aA</sup>	6,73±0,10 <sup>aA</sup>

Média ±desvio padrão. Médias com letras distintas na mesma coluna apresentam diferença estatisticamente significativa entre os tratamentos ( $p < 0,05$ ). Médias com letras maiúsculas distintas na mesma linha apresentam diferença estatisticamente significativa entre os tempos de armazenamento ( $p < 0,05$ ).

Debonne et al. (2018) também relataram uma redução do volume específico de pães após a adição de óleo essencial de tomilho. Segundo Martins; Pinho; Ferreira (2017), a redução do volume específico de produtos de pães e bolos pode ser devido à influência da rede de glúten na resistência da massa e retenção do gás produzido durante a fermentação. A partir desta afirmação, pode-se inferir que o óleo essencial de laranja na forma livre, enfraquece a rede de glúten, acarretando em uma menor capacidade de retenção de gás.

Comportamento oposto ao encontrado no presente estudo foi observado por Hussein et al. (2019), que obtiveram maior volume específico nos bolos (*pão de ló*) contendo óleo essencial de laranja não encapsulado e por Ezhilarasi et al. (2014) que relataram que o aumento da quantidade de compostos encapsulados diminuíram o volume específico de pão. Segundo estes autores, substâncias encapsuladas podem diminuir a concentração de glúten na formulação e diminuir a retenção de gases durante o processo de cozimento.

Por outro lado, Takeungwongtrakul; Benjakul; H-kittikun (2015) avaliaram as propriedades tecnológicas de pão com óleo de camarão encapsulado e reportaram que os pães com adição das cápsulas apresentaram maior volume específico quando comparado ao pão controle. Segundo esses autores isto se deve às possíveis interações entre o material de parede das cápsulas (concentrado proteico de soro e caseinato de sódio) e a massa do pão. Estas proteínas podem fortalecer a estrutura do pão via interação com o glúten, fazendo com que a rede de glúten da massa consiga reter o gás produzido na fermentação de forma mais eficiente e, desta forma, aumentar o volume do pão.

Ahmed; Hussein (2012) observaram que o pão-de-ló adicionado de extratos de canela ou laranja apresentou menor volume específico em comparação com a amostra de bolo controle. Além disso, os autores reportaram uma diminuição do volume específico de pão-de-ló com o aumento do período de armazenamento. Esse resultado foi justificado pela perda de água e de ar dos bolos durante o armazenamento. No presente estudo (Tabela 10) foi observado uma manutenção do volume específico dos bolos controle e com OEL livre até 3 meses de armazenamento, seguido por uma redução deste parâmetro após 6 meses. Por outro lado, o bolo contendo  $\beta$ -CD/OEL manteve o volume específico durante todo o período de armazenamento.

### 7.3.3 Cor dos bolos

Os parâmetros de cor ( $L^*$ ,  $a^*$  e  $b^*$ ) dos bolos durante o armazenamento estão apresentados na Tabela 11. Foi possível observar que o parâmetro de luminosidade ( $L^*$ ) diminuiu ao longo do armazenamento para os bolos controle e com OEL livre. Esta diminuição da luminosidade foi mais acentuada para o bolo com OEL livre, provavelmente devido à oxidação do mesmo ao longo do armazenamento. Hussein et al. (2019) também observou em seu estudo que o bolo com óleo essencial de laranja não encapsulado apresentava menor luminosidade quando comparado aos bolos controle e com óleo essencial micro e nanoencapsulado.

Com relação ao parâmetro  $a^*$ , que é a coordenada de cromaticidade vermelho/verde, não foram observadas diferenças significativas entre os bolos para todos os tempos de armazenamento avaliados. Em relação ao parâmetro  $b^*$ , coordenada de cromaticidade amarelo / azul foi observado um valor superior no bolo com OEL livre no tempo zero, e para os bolos controle e com adição de  $\beta$ -CD/OEL, o que representa uma maior intensidade da cor amarela nestes bolos. Em todos os bolos foi observado o aumento do parâmetro  $b^*$  durante o tempo de armazenamento, indicando um aumento da coloração amarela destes bolos.

Ahmed; Hussein (2012) também observaram uma redução da luminosidade do bolo tipo *pão de ló* com extrato de laranja ao longo dos dias de armazenamento; no entanto em relação ao parâmetro  $b^*$  foi notado comportamento oposto ao observado neste trabalho (Tabela 11), o bolo do tipo *pão de ló* com adição de extrato de laranja apresentou redução da cor amarelo com o passar dos dias.

**Tabela 11.** Parâmetros de cor (L\*, a\* e b\*) dos bolos durante o armazenamento.

<i>Bolos</i>	<i>Tempo zero</i>		
	L*	a*	b*
Controle	80,57±0,24 <sup>aA</sup>	-3,57±0,15 <sup>aA</sup>	19,77±0,84 <sup>a, bC</sup>
Contendo OEL livre	79,68±0,11 <sup>bA</sup>	-3,74±0,02 <sup>aA</sup>	20,66±0,34 <sup>aC</sup>
Contendo β-CD/OEL	79,68±0,06 <sup>bA</sup>	-3,66±0,06 <sup>aA</sup>	18,32±0,11 <sup>bC</sup>
<i>Bolos</i>	<i>3 meses</i>		
Controle	77,73±0,01 <sup>aB</sup>	-3,57±0,01 <sup>aA</sup>	21,64±0,27 <sup>bB</sup>
Contendo OEL livre	74,28±1,35 <sup>bB</sup>	-3,57±0,01 <sup>aA</sup>	22,55±0,31 <sup>aB</sup>
Contendo β-CD/OEL	75,03±0,02 <sup>bB</sup>	-3,43±0,02 <sup>aA</sup>	20,90±0,10 <sup>bB</sup>
<i>Bolos</i>	<i>6 meses</i>		
Controle	75,09±0,89 <sup>aC</sup>	-3,93±0,15 <sup>aA</sup>	24,23±0,41 <sup>aA</sup>
Contendo OEL livre	66,46±1,32 <sup>bC</sup>	-3,74±0,26 <sup>aA</sup>	23,04±0,76 <sup>aA</sup>
Contendo β-CD/OEL	75,37±0,81 <sup>aB</sup>	-3,93±0,12 <sup>aA</sup>	23,62±1,00 <sup>aA</sup>

Média ± desvio padrão. Médias com letras minúsculas distintas na mesma coluna apresentam diferença estatisticamente significativa entre os tratamentos ( $p < 0,05$ ). Médias com letras maiúsculas distintas na mesma coluna apresentam diferença estatisticamente significativa entre os tempos de armazenamento ( $p < 0,05$ ).

Comunian et al. (2017) não observaram nenhuma relação aparente nos valores de luminosidade entre a presença e/ou ausência de microcápsulas de compostos bioativos, ou em relação à sua forma de adição (encapsulados ou não encapsulados) em iogurtes. Debonne et al. (2018) também não observaram nenhum efeito significativo da adição do óleo de tomilho no dia da produção dos pães; no entanto, após o armazenamento, foi possível observar uma diferença gradual de cor para os pães com óleo de tomilho.

#### 7.3.4 Análise de perfil de textura (TPA)

Os parâmetros de textura (dureza, adesividade, elasticidade, coesividade e resiliência) dos bolos durante o armazenamento estão apresentados na Tabela 12. Dentre os parâmetros de textura, a dureza do miolo é a característica mais importante, sendo amplamente utilizada como um índice para determinar a qualidade de produtos de panificação. Quanto maior o valor de dureza maior é a força é necessária para romper a estrutura do bolo (EZHILARASI et al., 2014).

O bolo com  $\beta$ -CD/OEL apresentou os menores valores de dureza em todos os tempos de armazenamento, sendo considerado, portanto, mais macio do que os bolos controle e com OEL livre. Entre os bolos controle e com OEL não foi observada diferença significativa na dureza no dia da produção e após 3 meses de armazenamento. No entanto após 6 meses de armazenamento o bolo com OEL livre apresentou uma dureza significativamente superior ao bolo controle.

O aumento significativo da dureza do bolo com OEL livre durante o armazenamento pode ser atribuído às possíveis interações entre o fermento químico e o OEL. Uma vez que, a partir do momento em que o fermento químico é misturado aos demais ingredientes, suas reações já podem iniciar, ainda que em baixa escala, devido a baixa umidade e a temperatura ambiente durante o armazenamento, mas já acarretando em diminuição da sua posterior atividade durante a cocção dos bolos (GOMES et al., 2014).

De acordo com KRINGEL et. al. (2017), existe uma correlação inversa entre o volume específico e a textura, desta forma quanto maior o volume do bolo, menor será sua dureza. Os resultados encontrados no presente trabalho estão de acordo com essa afirmação, uma vez que o bolo com  $\beta$ -CD/OEL apresentou o maior volume específico (Tabela 10) e o menor valor de dureza após seis meses de armazenamento (Tabela 12).

De forma geral, todos os bolos apresentaram a mesma tendência: aumento da dureza ao longo do tempo de armazenamento. Contudo, esse aumento da dureza foi mais acentuado no bolo contendo OEL livre. Segundo Gómez et al. (2010), o acréscimo da dureza durante o armazenamento se deve ao processo de envelhecimento do bolo, resultando em mudanças físicas causadas pela redistribuição de umidade durante o armazenamento. Esta afirmação está de acordo com os resultados encontrados no presente trabalho, onde os bolos que apresentaram maiores valores de dureza ao final do armazenamento, também apresentaram menor teor de umidade (Tabela 9), o que torna o produto mais seco e conseqüentemente, mais duro.

**Tabela 12.** Análise de perfil de textura dos bolos durante o armazenamento.

Bolos	<i>Tempo zero</i>				
	Dureza (g)	Adesividade	Elasticidade (mm)	Coesividade (g.mm)	Resiliência
Controle	454,70±20,40 <sup>aC</sup>	-1,81±0,12 <sup>aA</sup>	0,88±0,01 <sup>aA</sup>	0,62±0,01 <sup>aA</sup>	0,30±0,01 <sup>aA</sup>
Contendo OEL livre	434,63±13,97 <sup>aC</sup>	-1,06±0,04 <sup>bC</sup>	0,86±0,01 <sup>aA</sup>	0,63±0,01 <sup>aA</sup>	0,30±0,01 <sup>aA</sup>
Contendo β-CD/OEL	310,46±6,28 <sup>bC</sup>	-1,20±0,07 <sup>bC</sup>	0,87±0,01 <sup>aA</sup>	0,66±0,01 <sup>aA</sup>	0,31±0,01 <sup>aA</sup>
<i>3 meses de armazenamento</i>					
Controle	661,09±6,22 <sup>aB</sup>	-1,85±0,28 <sup>bA</sup>	0,85±0,01 <sup>aA</sup>	0,63±0,01 <sup>aA</sup>	0,28±0,01 <sup>aA</sup>
Contendo OEL livre	617,70±8,99 <sup>aB</sup>	-2,39±0,16 <sup>aB</sup>	0,85±0,01 <sup>aA</sup>	0,63±0,01 <sup>aA</sup>	0,28±0,01 <sup>aA</sup>
Contendo β-CD/OEL	548,97±7,29 <sup>bB</sup>	-1,88±0,32 <sup>bA</sup>	0,85±0,02 <sup>aA</sup>	0,61±0,01 <sup>aA</sup>	0,29±0,01 <sup>aA</sup>
<i>6 meses de armazenamento</i>					
Controle	762,21±31,54 <sup>bA</sup>	-1,64±0,26 <sup>bB</sup>	0,88±0,06 <sup>aA</sup>	0,61±0,01 <sup>aA</sup>	0,31±0,01 <sup>aA</sup>
Contendo OEL livre	1517,17±16,14 <sup>aA</sup>	-10,96±0,03 <sup>aA</sup>	0,87±0,01 <sup>aA</sup>	0,54±0,01 <sup>bB</sup>	0,22±0,01 <sup>bB</sup>
Contendo β-CD/OEL	621,67±2,02 <sup>cA</sup>	-1,70±0,17 <sup>bA</sup>	0,87±0,02 <sup>aA</sup>	0,64±0,01 <sup>aA</sup>	0,29±0,01 <sup>aA</sup>

\*Média ±desvio padrão. Médias com letras minúsculas distintas na mesma coluna apresentam diferença estatisticamente significativa entre os tratamentos ( $p < 0,05$ ). Médias com letras maiúsculas distintas na mesma coluna apresentam diferença estatisticamente significativa entre os tempos de armazenamento ( $p < 0,05$ ).

O processo de envelhecimento de bolos é decorrente principalmente da redistribuição de umidade e da retrogradação do amido, o que acarreta no aumento da firmeza do miolo (KRINGEL et al., 2017). Nesse sentido, pode-se inferir que a  $\beta$ -CD pode atuar como um “agente anti-envelhecimento” em bolos. Este efeito pode ser atribuído à sua capacidade de ligação com água e às suas interações com o amido, inibindo a retrogradação e retardando o processo redistribuição de água durante o armazenamento (WANG et al., 2015) o que conseqüentemente retarda o processo de endurecimento dos bolos. A capacidade da  $\beta$ -CD em retardar a retrogradação de amido já foi reportada anteriormente por Tian et al. (2009).

A adição do OEL livre nos bolos influenciou no parâmetro adesividade, apresentando maiores valores após 3 e 6 meses de armazenamento. A adesividade denotava a propriedade de “colagem” entre superfícies de diferentes materiais (Feng et al., 2016) estimando a “pegajosidade” do bolo. Em relação ao parâmetro elasticidade não foram observadas diferenças significativas entre os bolos durante o armazenamento.

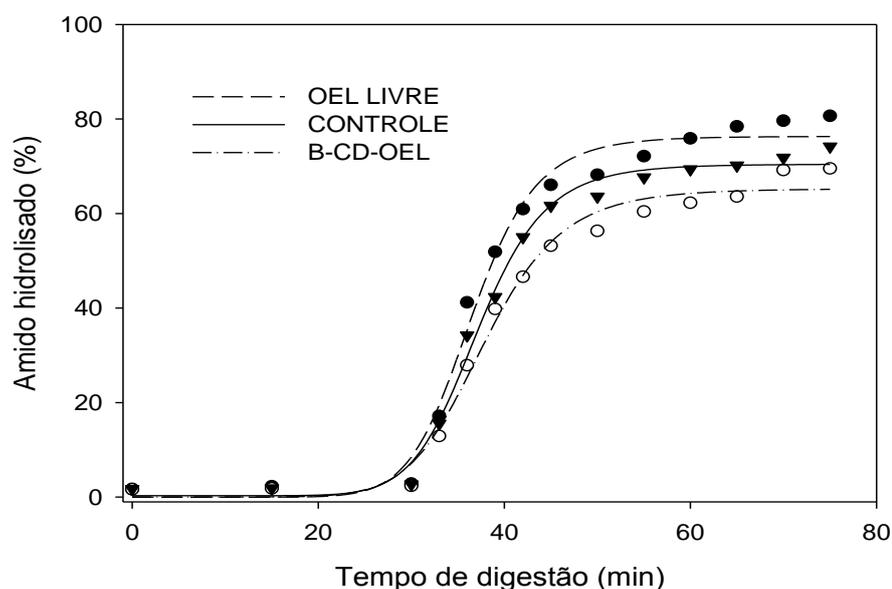
Arslan-Tontu; Erbas; Gorgulu (2018) reportaram que o aumento da dureza de bolos está diretamente associado com uma diminuição na coesividade de amostras de bolo. Esta afirmação corrobora com os resultados encontrados no presente trabalho, onde o bolo com OEL livre apresentou o maior valor de dureza, acompanhado pelo menor valor de coesividade ao final do armazenamento. O parâmetro resiliência foi afetado somente pela adição do OEL livre após 6 meses de armazenamento.

Segundo Gómez et al. (2010), bolos armazenados após o seu forneamento perdem significativamente a qualidade da textura a partir do segundo dia de armazenamento. Neste sentido, o armazenamento dos bolos com  $\beta$ -CD/OEL na forma de pré- misturas possibilita a sua comercialização por um maior período de tempo, além de garantir a manutenção das suas características tecnológicas.

#### 7.3.5. *Digestibilidade in vitro*

Na Figura 23 está apresentado a digestibilidade dos bolos expressos na forma de percentual de hidrólise do amido durante a digestão gastrointestinal simulada. Durante os 30 primeiros minutos de digestão gástrica não foi observada digestibilidade devido à ausência de enzimas que hidrolisam o amido. Após a adição do suco intestinal ao sistema, observou-se 15,54% de amido hidrolisado no bolo

controle, 17,18% no bolo com OEL livre e 12,94% no bolo com  $\beta$ -CD/OEL. Ao final da digestão, o bolo contendo OEL livre apresentou o maior percentual de amido hidrolisado (82,10%), seguido pelo bolo controle com 73,80% e pelo bolo com  $\beta$ -CD/OEL, que apresentou o menor percentual de amido hidrolisado (69,10%) (Tabela 13), enquanto a constante cinética (k) foi pouco afetada pela adição de OEL, tanto na forma livre quanto encapsulada, não sendo observadas diferenças significativas entre os bolos.



**Figura 23.** Digestão *in vitro* dos bolos controle, com OEL livre e com  $\beta$ -CD/OEL.

**Tabela 13.** Parâmetros da cinética de hidrólise do amido nos bolos.

Bolos	$C_{\infty}$ (%)	$k \times 10^{-2}$ ( $\text{min}^{-1}$ )
Controle	$73,80 \pm 3,27^b$	$10,40 \pm 1,62^a$
OEL livre	$82,10 \pm 3,10^a$	$11,30 \pm 1,57^a$
B-CD/OEL	$69,10 \pm 0,54^b$	$8,90 \pm 0,55^a$

Média  $\pm$ desvio padrão. Médias com letras distintas na mesma coluna apresentam diferença estatisticamente significativa entre si ( $p < 0,05$ ).

O menor percentual de amido hidrolisado encontrado no bolo com  $\beta$ -CD/OEL pode ser justificado pela interação da  $\beta$ -ciclodextrina com o amido, dificultando a ação das enzimas amilolíticas e conseqüentemente reduzindo o percentual de amido hidrolisado. Segundo Zhan; Tian; Tong (2013), as ciclodextrinas podem interagir

com moléculas de amido, mais precisamente com a amilose, via formação de complexo amilose-CDs.

Além disso, as ciclodextrinas podem atuar como fibras alimentares, influenciando a digestão do amido pela redução da sua taxa de degradação, o que impede o excesso de absorção de glicose e conseqüentemente reduz o índice glicêmico dos alimentos (CHEW; TAN; NIAMG, 2018; OH; BAE; LEE, 2014).

### 7.3.6 Análise sensorial dos bolos

Os perfis de sabor e aroma dos alimentos são considerados os principais fatores sensoriais que orientam a preferência dos consumidores em relação a um produto específico (YANG et al., 2018). A análise sensorial realizada teve por objetivo analisar o efeito da adição de óleo essencial de laranja (OEL), seja na forma livre ou encapsulada, na intensidade do atributo “sabor de laranja” em bolos tipo *pão de ló*, bem como na preferência dos julgadores em relação a este sabor, visto que OEL é agente aromatizante comumente utilizado em alimentos (HUSSEIN et al., 2019).

Para avaliar a intensidade de um atributo sensorial específico recomenda-se o teste de comparação pareada, o qual se baseia no número de julgamentos totais comparado ao número de julgadores concordantes (STONE et al., 2012).

Ao analisar os resultados obtidos na análise sensorial para o teste de comparação pareada, observou-se que 40 julgadores indicaram o bolo contendo o OEL livre como sendo a amostra com maior intensidade do sabor de laranja. Utilizando a tabela específica para tal teste, bilateral ( $p=1/2$ ), onde com um número de 60 julgadores, o número de respostas concordantes deve ser igual a 39, ou seja, no mínimo 39 julgadores deveriam julgar tal amostra como sendo a que apresenta a maior intensidade do sabor laranja, para caracterizar diferença significativa a um nível de 5%, pode-se concluir que o bolo com OEL livre apresenta a maior intensidade do atributo “sabor laranja”. Desta forma, pode-se inferir que a encapsulação do óleo essencial de laranja em  $\beta$ -ciclodextrina mascara o sabor de laranja, tornando-o menos acentuado quando comparado à adição do óleo essencial na forma livre.

Comunian et al. (2017) desenvolveram um iogurte funcional com óleo de echium, fitoesterol e ácido sinápico na forma livre e encapsulada e verificaram que em relação ao atributo sabor, o tratamento com as microcápsulas adicionadas

apresentou aceitação semelhante ao tratamento controle (sem adição de compostos bioativos) com escores médios de 6,73 e 6,65, respectivamente, seguido do tratamento contendo os compostos bioativos na forma livre (não encapsulados) com uma pontuação média de 6,21. Segundo os autores, a incorporação dos compostos bioativos encapsulados no produto melhorou o sabor em comparação com os compostos na sua forma livre, isto porque o óleo de echium pode apresentar um sabor desagradável, após certo tempo de exposição ao oxigênio.

Segundo Sawale et al. (2017), a concentração de compostos altamente aromáticos, como óleos essenciais, pode atingir o valor do limiar de percepção dos julgadores, levando à alterações da percepção sensorial dos mesmos.

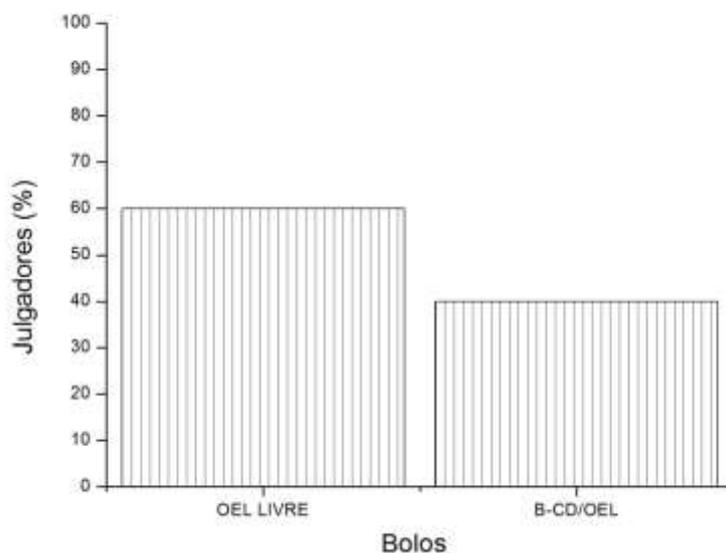
Tumbas Šaponjac et al. (2016) encapsularam compostos bioativos extraídos de bagaço de cereja em proteínas de soro de leite e soja e aplicaram em cookies. Os resultados da avaliação sensorial demonstraram que os cookies com a maior concentração de compostos bioativos encapsulados aumentou a intensidade do sabor associado às cerejas frescas, o que provocou reações positivas entre os avaliadores. As amostras contendo os compostos bioativos encapsulados em proteína de soro de leite foram descritas como tendo aroma de cereja mais acentuado do que as amostras encapsuladas em proteína de soja.

Nas fichas de avaliação sensorial, os julgadores também realizaram alguns comentários com relação à doçura dos bolos, mencionando, por exemplo, que o bolo contendo OEL livre além de apresentar a maior intensidade do sabor de laranja, era caracterizado também pela menor doçura. Comportamento semelhante foi relatado por Lončarević et al. (2018), onde a adição de suco de amora encapsulado apresentou impacto significativo ( $p < 0,05$ ) no sabor do chocolate branco, sendo observado a maior intensidade do sabor frutado em com concentrações mais altas de encapsulado acompanhado pela menor intensidade da doçura.

No teste de preferência, o bolo contendo OEL livre foi considerado o preferido por 36 dos 60 julgadores (60% dos julgadores); 24 optaram pelo bolo contendo OEL encapsulado em  $\beta$ -ciclodextrina (40% dos julgadores) (Figura 23). Este resultado mostra que os julgadores preferem bolos com maior intensidade do sabor de laranja, uma vez que o bolo com OEL livre também foi considerado o bolo que apresentava sabor de laranja mais acentuado.

Debonne et al. (2018) aplicaram óleo essencial de tomilho (*Thymus zygis*) em pão e massa de pão fermentada e reportaram que o aroma do pão foi afetado

negativamente pela adição do óleo essencial de tomilho. Bozik et al. (2017) avaliaram o efeito de diferentes óleos essenciais (canela, tomilho, orégano, cravo, capim-limão e gengibre) no perfil sensorial de aveia. Os autores reportaram que o forte aroma e sabor promovido pelos óleos essenciais afetaram de maneira negativa a aceitação do consumidor. Desta forma, o OEL pode ser utilizado como aromatizante natural em produtos de panificação, sem alterações indesejáveis das características de sabor de aroma.



**Figura 24.** Análise sensorial de preferência dos bolos contendo OEL na forma livre e em encapsulada como complexo de inclusão com  $\beta$ -ciclodextrina.

#### 7.4 Conclusão

A aplicação do OEL na forma livre e encapsulado em  $\beta$ -ciclodextrina em pré-misturas de bolo afetou as propriedades tecnológicas, sensoriais e de digestibilidade *in vitro* dos bolos, sendo esta influência mais pronunciada com o aumento do tempo de armazenamento das pré-misturas. De forma geral, a aplicação do OEL encapsulado em  $\beta$ -ciclodextrina acarretou em maior volume específico dos bolos, após armazenamento da respectiva pré-mistura por 6 meses; menor dureza dos bolos (durante todos os tempos de armazenamento avaliados) e menor percentual de amido hidrolisado após digestibilidade *in vitro*. Por outro lado, o bolo com OEL livre foi o preferido por 60% dos julgadores e o que apresentou maior intensidade do sabor de laranja segundo a análise sensorial.

## 7.5 Estudos futuros

Com base nos resultados obtidos neste estudo permanecem algumas questões que precisam ser respondidas por estudos futuros. Para avaliar a possível interação sugerida entre a  $\beta$ -CD e o amido, seria interessante analisar os bolos através de espectroscopia Raman, uma técnica que fornece informações importantes sobre a estrutura das moléculas e sobre a interação com outras moléculas, fornecendo uma análise qualitativa e quantitativa da composição dos bolos. Além disso, a avaliação da liberação do OEL encapsulado em  $\beta$ -CD durante a digestão *in vitro* poderia ser avaliada, a fim de avaliar a resistência da  $\beta$ -CD frente às condições gastrointestinais; a partir desta análise também pode quantificar o índice glicêmico, o amido rapidamente e lentamente digerível, bem como o amido resistente presente nos bolos.

## 8 Considerações finais

As diferenças observadas na composição química, na estabilidade térmica e na morfologia entre o óleo essencial livre, a mistura física e o complexo de inclusão, mostraram que houve a formação do complexo de inclusão e demonstram a necessidade do método de precipitação utilizado para garantir a interação entre a  $\beta$ -CD e o OEL. O alto índice de retenção de voláteis do OEL quando complexados com  $\beta$ -CD, demonstrou sua eficácia na redução de perdas por volatilização, o que amplia a sua aplicação em alimentos.

A germinação aumentou a atividade enzimática de todas as amostras, bem como o rendimento de CDs, possibilitando a aplicação do amido de trigo germinado como um substrato promissor na produção de ciclodextrinas, agregando valor a este produto que, normalmente, não é utilizado pela indústria de alimentos. Além disso, o complexo de inclusão formado entre CDs/OEL melhorou significativamente a estabilidade térmica do óleo essencial de laranja, promovendo sua proteção em altas temperaturas, o que possibilita encapsular compostos altamente voláteis e instáveis a altas temperaturas.

As cápsulas contendo zeína e complexo de inclusão  $\beta$ -CD/OEL exibiram um considerável efeito inibidor contra todas as espécies de *Aspergillus* testadas. O OEL, tanto na forma livre quanto encapsulada, adiou efetivamente a deterioração microbiológica dos bolos, prolongando o prazo de validade de 30 para 150 dias. Esses resultados sugerem o potencial uso do óleo essencial de laranja como conservante antifúngico natural em alimentos.

A aplicação do OEL na forma livre e encapsulado em  $\beta$ -ciclodextrina em pré-misturas de bolo afetou as propriedades tecnológicas, sensoriais e de digestibilidade *in vitro* dos bolos, sendo esta influência mais pronunciada com o aumento do tempo de armazenamento das pré-misturas. O bolo com  $\beta$ -CD/OEL apresentou maior volume após armazenamento da respectiva pré-mistura por 6 meses; menor dureza e menor percentual de amido hidrolisado após digestibilidade *in vitro*. Por outro lado, na análise sensorial, o bolo com OEL livre foi o preferido por 60% dos julgadores.



## APÊNDICE A

Pré-misturas de bolo acondicionadas em sacos de polietileno de baixa densidade.





## APÊNDICE B

Fichas utilizadas para a aplicação da análise sensorial.

Nome: \_\_\_\_\_ Data: \_\_\_\_\_

Produto: Bolo de laranja

Por favor, avalie as amostras da esquerda para direita e circule o código da amostra que apresentar a maior intensidade do sabor de laranja.

Amostras

1ª avaliação	<b>423</b>	<b>230</b>
--------------	------------	------------

---

2ª avaliação	<b>145</b>	<b>809</b>
--------------	------------	------------

Comentários: \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_.

Por favor, avalie as amostras da esquerda para direita e circule o código da amostra de sua preferência.

**145**    **809**

Comentários: \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_.



## APÊNDICE C

Termo de consentimento livre e esclarecido apresentado na análise sensorial.

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Pelo presente consentimento livre e esclarecido, eu \_\_\_\_\_, declaro que fui informado(a), de forma clara e detalhada, dos objetivos, da justificativa e da forma de trabalho desta pesquisa, através de encontro individual e livre de qualquer forma de constrangimento e coerção.

Projeto: Encapsulação do óleo essencial de laranja para aplicação em bolos

**OBJETIVOS:** Fui informado (a) de que o objetivo desta pesquisa é avaliar a influência do óleo essencial de laranja, na forma livre ou encapsulada, no sabor de bolo inglês; cujos resultados serão mantidos em sigilo e somente serão usados para fins de pesquisa.

**PROCEDIMENTOS:** Fui informado (a) de que receberei amostras do produto (bolo), para que eu avalie as características sensoriais do produto.

**RISCOS E POSSÍVEIS REAÇÕES:** Fui informado (a) de que existem riscos a portadores da doença celíaca, uma vez que este produto possui glúten. Declaro que não possuo nenhum tipo de intolerância (doença celíaca) e/ou reação adversa a este produto.

**BENEFÍCIOS:** O benefício de participar da pesquisa relaciona-se ao fato que os resultados serão incorporados ao conhecimento científico e posteriormente a situações de ensino-aprendizagem.

**PARTICIPAÇÃO VOLUNTÁRIA:** A minha adesão à pesquisa ocorrerá de forma voluntária e nenhum tipo de penalidade será aplicado caso não seja do meu interesse participar.

**CONFIDENCIALIDADE:** Estou ciente que a minha identidade permanecerá confidencial durante o estudo e que os dados coletados só serão utilizados para fins de pesquisa.

**CONSENTIMENTO:** Ciente das informações citadas anteriormente, eu concordo em participar da avaliação sensorial dos produtos elaborados na pesquisa.

ASSINATURA: \_\_\_\_\_

DATA: \_\_\_ / \_\_\_ / \_\_\_\_\_

ASSINATURA DOS PESQUISADORES RESPONSÁVEIS:

Pesquisadores: Dianini Hüttner Kringel

Professor supervisor Dr<sup>a</sup>. Elessandra da Rosa Zavareze

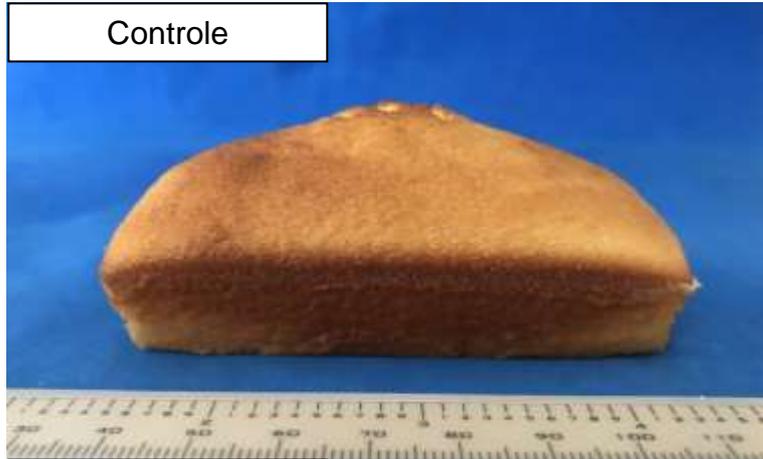
Universidade Federal de Pelotas.



## APÊNDICE D

Fotos dos bolos controle, com OEL livre e com  $\beta$ -CD/OEL no dia da produção.

Controle



OEL livre



B-CD/OEL





## Referências bibliográficas

- AACCI. American Association of Cereal Chemists International. Approved Methods of Analysis, Eleventh ed. AACC International, St Paul, MN, USA, 2010.
- ABARCA, R. L.; RODRÍGUEZ, F. J.; GUARDA, A.; GALOTTO, M. J.; BRUNA, J. E. Characterization of beta-cyclodextrin inclusion complexes containing an essential oil component. **Food Chemistry**, v. 196, p. 968-975, 2016.
- AHMED, Z.S.; HUSSEIN, A.M.S. Utilization of Cinnamon and Orange Extracts to Improve the Microbial Quality and Shelf Life of Sponge Cakes. **Australian Journal of Basic and Applied Sciences**, v. 6(8), p. 665-672, 2012.
- ALPARSLAN, Y.; YAPICI, H, H.; METIN, C.; BAYGAR, T.; GÜNLÜ, A.; BAYGAR, T. Quality assessment of shrimps preserved with orange leaf essential oil incorporated gelatina. **LWT - Food Science and Technology**, v. 72, p. 457-466, 2016.
- ALVES-PRADO, H. F.; CARNEIRO, A. A. J.; PAVEZZI, F. C.; GOMES, E.; BOSCOLO, M.; FRANCO, C. M. L.; SILVA, R. Production of cyclodextrins by CGTase from *Bacillus clausii* using different starches as substrates. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 146, p. 3-13, 2008.
- ANANDHARAMAKRISHNAN, C. Drying techniques for nanoencapsulation. **Techniques for Nanoencapsulation of Food Ingredients**, v. 1, p. 51–60, 2014.
- ANAYA-CASTRO, M.A.; AYALA-ZAVALA, J.F.; MUÑOZ-CASTELLANOS, L., HERNÁNDEZ-OCHOA, L.; PEYDECASTAING, J.; DURRIEU, V.  $\beta$ -Cyclodextrin inclusion complexes containing clove (*Eugenia caryophyllata*) and Mexican oregano (*Lippia berlandieri*) essential oils: Preparation, physicochemical and antimicrobial characterization. **Food Packaging and Shelf Life**, v. 14, p. 96-101, 2017.
- ARSLAN-TONTUL, S.; ERBAS, M.; GORGULU, A. The Use of Probiotic-Loaded Single- and Double-Layered Microcapsules in Cake Production. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, 2018. <https://doi.org/10.1007/s12602-018-9467-y>.
- ASCHERI, D.P.R.; MARQUEZ, M.O.M.; MARTUCCI, M.T. Microencapsulação de óleo essencial de laranja: Seleção de material de parede. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 23, p. 1-6, 2003.
- Associação Brasileira de Normas Técnicas - ABNT. Teste de comparação pareada em análise sensorial– NBR 13088. Rio de Janeiro: ABNT; 1994.

ASTRAY, G.; GONZALEZ-BARREIRO, C.; MEJUTO, J. C.; RIAL-OTERO, R.; SIMALGÁNDARA, J. A review on the use of cyclodextrins in foods. **Food Hydrocolloids**, v. 23, p. 1631–1640, 2009.

AYTAC, Z.; YILDIZ, Z.I.; KAYACI-SENIRMAK, F.; TEKINAY, T.; UYAR, T. Electrospinning of cyclodextrin/linalool-inclusion complex nanofibers: Fast-dissolving nanofibrous web with prolonged release and antibacterial activity. **Food Chemistry**, v. 231, p. 192-201. 2017.

BARANZELLI, J.; KRINGEL, D. H.; COLUSSI, R.; PAIVA, F. F.; ARANHA, B. C.; MIRANDA, M. Z.; ZAVAREZE, E. R.; DIAS, A. R. G. Changes in enzymatic activity, technological quality and gammaaminobutyric acid (GABA) content of wheat flour as affected by germination. **LWT - Food Science Technology**, v. 90, p. 483-490, 2018.

BELLO-PÉREZ, L.A.; MONTEALVO, M.G.M.; ACEVEDO, E.A. **Almidón: definición, estructura y propiedades**. In: LAJOLO, F.M.; MENEZES, E.W. Carbohidratos em alimentos regionales iberoamericano. São Paulo: Edusp, cap. 1, p. 17-46, 2006.

BEMILLER, J. N. Starch: Structure and Properties. **Carbohydrate Chemistry for Food Scientists**. 2 ed. St. Paul, MN: AACC International, 2009.

BHANDARI, B. R.; D'ARCY, B. R.; BICH, L. L. T. Lemon oil to  $\beta$ -cyclodextrin ratio effect on the inclusion efficiency of  $\beta$ -cyclodextrin and the retention of oil volatiles in the complex. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, p. 1494-1499, 1998.

BHUSHANI, J. A.; ANANDHARAMAKRISHNAN, C. Electrospinning and electrospaying techniques: Potential food based applications. **Trends in Food Science & Technology**, v. 38, n. 1, p. 21–33, 2014.

BHUSHANI, J.A.; KURREY, N.K.; ANANDHARAMAKRISHNAN, C. Nanoencapsulation of green tea catechins by electrospaying technique and its effect on controlled release and in-vitro permeability. **Journal of Food Engineering**, v. 199, p. 82-92, 2017.

BOTREL, D.A.; DE BARROS FERNANDE, R.V.; BORGES, S.V.; YOSHIDA, M.I. Influence of wall matrix systems on the properties of spray-dried microparticles containing fish oil. **Food Research International**, v. 62, p. 344-352, 2014.

BOUKROUFA, M.; BOUTEKEDJIRET, C.; PETIGNY, L.; RAKOTOMANOMANA, N.; CHEMAT, F. Bio-refinery of orange peels waste: A new concept based on integrated green and solvent free extraction processes using ultrasound and microwave

techniques to obtain essential oil, polyphenols and pectin. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 24 ,72–79, 2015.

BOZIK, M.; CÍSAROVÁ, M.; TANCINOVÁ, D.; KOURIMSKÁ, L.; HLEBA, L.; KLOUCEK, P. Selected essential oil vapours inhibit growth of *Aspergillus* spp. in oats with improved consumer acceptability. **Industrial Crops and Products**, v. 98, p.146–152. 2017.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 263, de 22 de setembro de 2005. Aprova o regulamento técnico para produtos de cereais, amidos, farinhas e farelos. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília, DF, v. 142, n. 184, p. 368-369, 23 set. 2005. Seção 1.

BROWN, L.K.; WIERSMA, A.T.; OLSON, E.L. Preharvest sprouting and  $\alpha$ -amylase activity in soft winter wheat. **Journal Cereal Science**, v. 79, p.311-318. 2018.

BUSTAMANTE, J.; STEMPOORT, S.V.; GARCÍA-GALLARRETA, M.; HOUGHTON, J.A.; BRIERS, H.K.; BUDARIN, V.L.; MATHARU, A.S.; CLARK, J.H. Microwave assisted hydro-distillation of essential oils from wet citrus peel waste. **Journal of Cleaner Production**, v. 137, p. 598-605, 2016.

CAI, L.; SHI, Y.C.; RONG, L.; HSIAO, B.S. Debranching and crystallization of waxy maize starch in relation to enzyme digestibility. **Carbohydrate Polymers**, v. 81, p. 385-393, 2010.

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

CAMPELO, P.H.; DO CARMO, E.L.; ZACARIAS, R.D.; YOSHIDA, M.I.; FERRAZ, V.P.; FERNANDES, R.V.B.; BOTREL, D.A., BORGES, S.V. Effect of dextrose equivalent on physical and chemical properties of lime essential oil microparticles. **Industrial Crops and Products**, v. 102, p.105-114, 2017.

CARNEIRO, A.A.P.; Alves-Prado, H.F.; Gomes, E.; Da Silva, R. Escurecimento enzimático em alimentos: ciclodextrinas como agente antiescurecimento. **Alimentos e Nutrição**, v. 17, 3, p. 345-352, 2006.

CELEBIOGLU, A.; UYAR, T. Electrospinning of nanofibers from non-polymeric systems: Electrospun nanofibers from native cyclodextrins. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 404, 1–7, 2013.

CEREDA, M.P. **Culturas de tuberosas amiláceas latino-americanas**. São Paulo: Fundação Cargill, 2002, 540 p.

CHAKRABORTY, S.; LIAO, I.C.; ADLER, A.; LEONG, K.W. Electrohydrodynamics: A facile technique to fabricate drug delivery systems. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 61, p. 1043–1054, 2009.

CHATSISVILI, N.; PHILIPSE, A.P.; LOPPINET, B.; TROMP, R.H. Colloidal zein particles at water-water interfaces. **Food Hydrocolloids**, v. 65, p.17-23, 2017.

CHEN, H.; ZHONG, Q. A novel method of preparing stable zein nanoparticle dispersions for encapsulation of peppermint oil. **Food Hydrocolloids**, v. 43, p. 593-602, 2015.

CHEN, S.; XU, C.; MAO, L.; LIU, F.; SUN, C.; DAI, L.; GAO, Y. Fabrication and characterization of binary composite nanoparticles between zein and shellac by anti-solvent co-precipitation. **Food and Bioproducts Processing**, v.107, p. 88–96, 2018.

CHEW, S. C.; TAN, C. P.; NYAM, K. L. *In-vitro* digestion of refined kenaf seed oil microencapsulated in  $\beta$ -cyclodextrin/gum arabic/sodium caseinate by spray drying. **Journal of Food Engineering**, v. 225, p. 34–41, 2018.

CIOBANU A.; MALLARD I.; LANDY D.; BRABIE G.; NISTOR D.; FOURMENTIN S. Retention of aroma compounds from *Mentha piperita* essential oil by cyclodextrins and crosslinked cyclodextrin polymers. **Food Chemistry**, v. 138, p.291–297, 2013.

CLSI-Clinical and Laboratory Standards Institute (2008). **Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi**. M38-a2 Guideline. Approved Standard, third ed., Wayne, PA, USA.

COMUNIAN, T. A.; CHAVES, I. E.; THOMAZINI, M.; MORAES, I. C. F.; FERRO-FURTADO, R.; DE CASTRO, I. A.; FAVARO-TRINDADE, C. S. Development of functional yogurt containing free and encapsulated echium oil, phytosterol and sinapic acid. **Food Chemistry**, v. 237, p. 948–956, 2017.

CORRADINI, E.; LOTTI, C.; MEDEIROS, E.S.; CARVALHO, A.J.F.; CURVELO, A.A.S.; MATTOSO, L.H.C. Estudo Comparativo de Amidos Termoplásticos Derivados do Milho com Diferentes Teores de Amilose. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 15, n. 4, 268-273, 2005.

COSTA, P.; MEDRONHO, B.; GONÇALVES, S.; ROMANO, A. Cyclodextrins enhance the antioxidant activity of essential oils from three Lamiaceae species. **Industrial Crops and Products**, v. 70, 341–346, 2015.

CUSHEN, M.; KERRY, J.; MORRIS, M.; CRUZ-ROMERO, M.; CUMMINS, E. Nanotechnologies in the food industry - recent developments, risks and regulation. **Trends in Food Science and Technology**, v. 24, 1, p. 30-46, 2012.

DARTOIS, A.; SINGH, J.; KAUR, L.; SINGH, H. Influence of guar gum on the in vitro starch digestibility-rheological and Microstructural characteristics. **Food Biophysics**, v.5, n. 3, p. 149–160, 2010.

DAVIDOV-PARDO, G.; JOYE, I.J.; MCCLEMENTS, D.J. Encapsulation of resveratrol in biopolymer particles produced using liquid antisolvent precipitation. Part 1: Preparation and characterization. **Food Hydrocolloids**, v. 45, p. 309-316. 2015.

DE BRIER, N.; HEMDANE, S.; DORNEZ, E.; GOMAND, S. V.; DELCOUR, J. A.; COURTIN, C. M. Structure, chemical composition and enzymatic activities of pearlins and bran obtained from pearled wheat (*Triticum aestivum* L.) by roller milling. **Journal of Cereal Science**, v. 62, p. 66–72, 2015.

DEBONNE, E.; BOCKSTAELE, F.V.; DE LEYN, I.; DEVLIEGHERE, F.; EECKHOUT, M.. Validation of *in vitro* antifungal activity of thyme essential oil on *Aspergillus niger* and *Penicillium paneum* through application in par-baked wheat and sourdough bread. **LWT - Food Science and Technology**, v. 87, p. 368-378, 2018.

DECOCK G.; LANDY D.; SURPATEANU G.; FOURMENTIN S. Study of the retention of aroma components by cyclodextrins by static headspace gas chromatography. **Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry**, v. 62, p. 297–302, 2008.

DELCOUR, J.A.; HOSENEY, R.C. **Principles of Cereal Science and Technology**, third ed. AACC International, St. Paul, MN, USA, 2010.

DEVI, N.; SARMAH, M.; KATHUN, B.; MAJI, T.K. Encapsulation of active ingredients in polysaccharide–protein complex coacervates. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 239, p.136-145, 2017.

DIMA, C.; DIMA, S. Essential oils in foods: extraction, stabilization, and toxicity. **Current Opinion in Food Science**, v. 5, p. 29-35, 2015.

DONSÌ, F.; ANNUNZIATA, M.; SESSA, M.; FERRARI, G. Nanoencapsulation of essential oils to enhance their antimicrobial activity in foods. **LWT-Food Science and Technology**, v. 44, p. 1908-1914, 2011.

DONSÌ, F.; FERRARI, G. Essential oil nanoemulsions as antimicrobial agents in food- A review. **Journal of Biotechnology**, v. 233, p.106-120, 2016.

DUCHÊNE, D.; BOCHOT, A. Thirty years with cyclodextrins. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 514, p. 58-72, 2016.

DURA, A.; ROSELL, C. Physico-chemical properties of corn starch modified with cyclodextrin glycosyltransferase. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 87, p. 466–472, 2016.

EL ASBAHANI, A.; MILADI, K.; BADRI, W.; SALA, M.; AÏT ADDI, E.H.; CASABIANCA, H.; EL MOUSADIK, A.; HARTMANN, D.; JILALE, A.; RENAUD, F.N.R.; ELAISSARI, A. Essential oils: From extraction to encapsulation: Review. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 483, p. 220-243, 2015.

EVAGELIOU, V.; SALIARI, D. Limonene encapsulation in freeze dried gellan systems. **Food Chemistry**, v. 223, p. 72-75, 2017.

EZHILARASI, P. N.; KARTHIK, P.; CHHANWAL, N.; ANANDHARAMAKRISHNAN, C. Nanoencapsulation techniques for food bioactive components: a review. **Food Bioprocess Technology**, v. 6, p. 628–647, 2013.

EZHILARASI, P.N.; INDRANI, D.; JENA, B.S; ANANDHARAMAKRISHNAN. C. Microencapsulation of Garcinia fruit extract by spray drying and its effect on bread quality. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.94, p. 1116-1123, 2014.

FAN, H.; WU, Q.; SIMON, J.E.; LOU, S.N.; HO, C.T. Authenticity analysis of citrus essential oils by HPLC-UV-MS on oxygenated heterocyclic components. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 23, p. 30-39, 2015.

FATHI, M.; MARTIN, A.; MCCLEMENTS, D. J. Nanoencapsulation of food ingredients using carbohydrate based delivery systems. **Trends in Food Science & Technology**, v. 39, p. 18-39, 2014.

FENYVESI, E.; SZENTE, L. Nanoencapsulation of flavors and aromas by cyclodextrins. **Nanotechnology in the Agri-Food Industry**, v.2, cap.18, 2016, 769-792.

FERNG, L-H.; LIOU, C-M.; YEH, R.; CHEN, S.H. Physicochemical property and glycemic response of chiffon cakes with different rice flours. **Food Hydrocolloids**, v. 53, p. 172-179, 2016.

GALVÃO, J. G.; SILVA, V. F.; FERREIRA, S. G.; FRANÇA, F. R. M.; SANTOS, D. A.; FREITAS, L. S.; ALVES, P. B.; ARAÚJO, A. A. S.; CAVALCANTI, S. C. H.; NUNES, R. S.  $\beta$ -cyclodextrin inclusion complexes containing *Citrus sinensis* (L.) Osbeck essential oil: An alternative to control *Aedes aegypti* larvae. **Thermochimica Acta**, v. 608, p. 14–19, 2015.

GARCÍA-MORENO, P.J.; OZDEMIR, N.; STEPHANSEN, K.; MATEIU, R.V.; ECHEGOYEN, Y.; LAGARON, J.M.; CHRONAKIS, I.S.; JACOBSEN, C.

Development of carbohydrate-based nano-microstructures loaded with fish oil by using electrohydrodynamic processing. **Food Hydrocolloids**, v. 69, p. 273-285, 2017.

GARCÍA-SEGOVIA, P.; BARRETO-PALACIOS, V.; BRETÓN, J.; MARTÍNEZ-MONZÓ, J. Microencapsulation of essential oils using  $\beta$ -cyclodextrin: Applications in gastronomy. **Journal of Culinary Science and Technology**, v. 9, n 4, p. 150-157, 2011.

GHASEMI, S.; JAFARI, S.M.; ASSADPOUR, E.; KHOMEIRI, M. Production of pectin-whey protein nano-complexes as carriers of orange peel oil. **Carbohydrate Polymers**, v. 177, p. 369–377, 2017.

GHORANI, B.; TUCKER, N. Fundamentals of electrospinning as a novel delivery vehicle for bioactive compounds in food nanotechnology. **Food Hydrocolloids**, v. 51, p. 227–240, 2015.

GOMES, L.O.F.; SANTIAGO, R.A.C.; KOAKUZU, S.N.; BASSINELLO, P.Z. Microbiological and physicochemical stability of gluten-free cake mixtures and quality of ready cakes for consumption. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 17(4), p. 283-295, 2014.

GÓMEZ, M.; RUIZ-PARÍS, E.; OLLETE, B.; PANDO, V. Modeling of texture evolution of cakes during storage. **Journal of Texture Studies**, v. 41(1), p. 17-33, 2010.

GOMEZ-ESTACA, J.; BALAGUER, M.P.; GAVARA, R.; HERNANDEZ-MUNOZ, P. Formation of zein nanoparticles by electrohydrodynamic atomization: Effect of the main processing variables and suitability for encapsulating the food coloring and active ingredient curcumin. **Food Hydrocolloids**, v. 28, p. 82-91. 2012.

GÓMEZ-GALVÁN, F.; PÉREZ-ÁLVAREZ, L.; MATAS, J.; ÁLVAREZ-BAUTISTA, A.; POEJO, J.; DUARTE, C, M.; RUIZ-RUBIO, L.; VILA-VILELA, J, L.; LEÓN, L, M. Preparation and characterization of soluble branched ionic cyclodextrins and their inclusion complexes with triclosan. **Carbohydrate Polymers**, v.142, p. 149–157, 2016.

GOMEZ-MASCARAQUE, L.G.; MORFIN, R.C.; PEREZ-MASI, R.; SANCHEZ, G.; LOPEZ-RUBIO, A. Optimization of electrospraying conditions for the microencapsulation of probiotics and evaluation of their resistance during storage and *in-vitro* digestion. **LWT-Food Science and Technology**, v. 69, p. 438-446, 2016.

GONÇALVES, D.; TESCHKE, M. E. E.; KOSHIMA, C. C.; GONÇALVES, C. B.; OLIVEIRA, A. L.; RODRIGUES, C. E. C. Fractionation of orange essential oil using liquid–liquid extraction: Equilibrium data for model and real systems at 298.2 K. **Fluid Phase Equilibria**, v. 399, p. 87-97, 2015.

GONÇALVES, N.; PENA, F.L.; SARTORATTO, A., DERLAMELINA, C.; DUARTE, M.C.T.; ANTUNES, A.E.C.; PRATA, A.S. Encapsulated thyme (*Thymus vulgaris*) essential oil used as a natural preservative in bakery product. **Food Research International**, 96, p.154-160, 2017.

GONÇALVES, D.; COSTA, P.; RODRIGUES, C.E.C.; RODRIGUES, A.E.; Effect of *Citrus sinensis* essential oil deterpenation on the aroma profile of the phases obtained by solvent extraction. **The Journal of Chemical Thermodynamics**, v. 116, p. 166-175. 2018.

GOÑI, I.; GARCIA-ALONSO, A.; SAURA-CALIXTO, F. A starch hydrolysis procedure to estimate glycemic index. **Nutrition Research**, v. 17, n.3, p. 427–437, 1997.

GUADARRAMA-LEZAMA, A. Y.; CARRILLO-NAVAS, H.; PÉREZ-ALONSO, C.; VERNON-CARTER, E. J.; ALVAREZ-RAMIREZ, J. Thermal and rheological properties of sponge cake batters and texture and microstructural characteristics of sponge cake made with native corn starch in partial or total replacement of wheat flour. **LWT - Food Science and Technology**, v. 70, p. 46–54, 2016.

GUPTA, R.; MOHAPATRA, H.; GOSWAMI, V. K.; CHAUHAN, B. Microbial  $\alpha$ -amylases: a biotechnological perspective. **Process Biochemistry**, p.1-18, 2003.

GUPTA S.; KHAN S.; MUZAFAR M.; KUSHWAHA M.; YADAV AK.; GUPTA AP. **Encapsulation: entrapping essential oil/flavors/aromas in food**. In: Grumezescu AM, editor. San Diego, USA: Encapsulations Academic Press. p 229–68. 2016

HANDFORD, C.E.; DEAN, M.; HENCHION, M.; SPENCE, M.; ELLIOTT, C.T.; CAMPBELL, K. Implications of nanotechnology for the agri-food industry: Opportunities, benefits and risks. **Trends in Food Science & Technology**, v. 40, p. 226-241, 2014.

HASHTJIN, A. M.; ABBAS, S. Nano-emulsification of orange peel essential oil using sonication and native gums. **Food Hydrocolloids**, v. 44, p. 40-48, 2015.

HE, X.; HWANG, H.M. Nanotechnology in food science: Functionality, applicability, and safety assessment. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 24, p. 671-681, 2016.

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

HO, B.T.; JOYCE, D.C.; BHANDARI, B.R. Release kinetics of ethylene gas from ethylene- $\alpha$ - cyclodextrin inclusion complexes. **Food Chemistry**, v. 129, p.259–66, 2011.

HUNDRE, S.Y.; KARTHIK, P.; ANANDHARAMAKRISHNAN, C. Effect of whey protein isolate and  $\beta$ -cyclodextrin wall systems on stability of microencapsulated vanillin by spray–freeze drying method. **Food Chemistry**, v. 174, p. 16–24, 2015.

HUSSEIN, A.M.S.; MAHMOUD, K.F.; HEGAZY, N.A.; KAMIL, M.M.; MOHAMMAD, A.A.; MEHAYA, F.M. Efficiency of micro and nano encapsulated orange peel essential oils on quality of sponge cake. **Journal of Environmental Science and Technology**, 10.3923/jest.2019, 2019.

IBRAHIM, A.S.S., EL-TAYEB, M.A., ELBADAWI, Y.B., & AL-SALAMAH, A.A. Effects of substrates and reaction conditions on production of cyclodextrins using cyclodextrin glucanotransferase from newly isolated *Bacillus agaradhaerens* KSU-A11. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 14, 5, p. 1-12, 2011.

JIN, H., YAN, J., PENA, R. J., XIA, X.C., MORGOUNOV, A., HAN, L. M., ZHANG, Y., HE, Z. H. Molecular detection of high- and low-molecular weight glutenin subunit genes in common wheat cultivars from 20 countries using allele-specific markers. **Crop Pasture Science**, v. 62, p. 746-754, 2011.

JING, L.; LEI, Z.; LI, L.; XIE, R.; XI, W.; GUAN, Y.; SUMMER, L.W.; ZHOU, Z.; Antifungal Activity of Citrus Essential Oils. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, p. 3011-3033, 2014.

JU, J.; XU, X.; XIE, Y.; GUO, Y.; CHENG, Y.; QIAN, H.; YAO, W. Inhibitory effects of cinnamon and clove essential oils on mold growth on baked foods. **Food Chemistry**, v. 240, p. 850-855, 2018.

KAJLA, P.; SHARMA, A.; SOOD, D.R. Effect of germination on proximate principles, minerals and antinutrients of flaxseeds. **Asian Journal of Dairy and Food Research**, v. 36, p. 52-57, 2017.

KALITA, D.; SARMA, B.; SRIVASTAVA, B. Influence of germination conditions on malting potential of low and normal amylose paddy and changes in enzymatic activity and physico chemical properties. **Food Chemistry**, v. 220, p. 67–75, 2017.

KAMIMURA, J.A.; SANTOS, E.H.; HILL, L.E.; GOMES, C.L. Antimicrobial and antioxidant activities of carvacrol microencapsulated in hydroxypropyl-beta-cyclodextrin. **LWT - Food Science and Technology**, v. 57, p. 701-709, 2014.

KAYACI, F.; UYAR, T. Encapsulation of vanillin/cyclodextrin inclusion complex in electrospun polyvinylalcohol (PVA) nanoweb: Prolonged shelf-life and high temperature stability of vanillin. **Food Chemistry**, v. 133, p. 641-649, 2012a.

KAYACI, F.; UYAR, T. Electrospun zein nanofibers incorporating cyclodextrins, **Carbohydrate Polymers**, v.90, p. 558– 568, 2012b.

KFOURY, M.; AUEZOVA, L.; GREIGE-GERGES, H.; FOURMENTIN, S. Complexation of estragole as pure compound and as main component of basil and tarragon essential oils with cyclodextrins. **Carbohydrate Polymers**, v. 118, p.156–164, 2014.

KFOURY, M.; AUEZOVA, L.; GREIGE-GERGES, H.; FOURMENTIN, S. Promising applications of cyclodextrins in food: Improvement of essential oils retention, controlled release and antiradical activity. **Carbohydrate Polymers**, v.131, p. 264–272, 2015a.

KFOURY, M.; AUEZOVA, L.; RUELLAN, S.; GREIGE-GERGES, H.; FOURMENTIN, S. Complexation of estragole as pure compound and as main component of basil and tarragon essential oils with cyclodextrins. **Carbohydrate Polymers**, v.118, p. 156–164, 2015b.

KFOURY, M.; AUEZOVA, L.; GREIGE-GERGES, H.; LARSEN, K.L.; FOURMENTIN, S. Release studies of trans-anethole from  $\beta$ -cyclodextrin solid inclusion complexes by Multiple Headspace Extraction. **Carbohydrate Polymers**, v.151, p. 1245–1250, 2016.

KFOURY, M.; LANDY, D.; RUELLAN, S.; AUEZOVA, L.; GREIGE-GERGES, H.; FOURMENTIN, S. Nootkatone encapsulation by cyclodextrins: Effect on water solubility and photostability. **Food Chemistry**, v. 236, p. 41–48, 2017.

KFOURY, M.; AUEZOVA, L.; GREIGE-GERGES, H.; FOURMENTIN, S. Encapsulation in cyclodextrins to widen the applications of essential oils. **Environmental Chemistry Letters**. <https://doi.org/10.1007/s10311-018-0783-y>. 2018a.

KFOURY, M.; AUEZOVA, L.; GREIGE-GERGES, H.; FOURMENTIN, S. Cyclodextrins for Essential Oils Applications. In: **Cyclodextrin Applications in**

**Medicine, Food, Environment and Liquid Crystals.** Environmental Chemistry for a Sustainable World, Editora ECSW, volume 17, 81-123, 2018b.

KHORSHIDIAN, N.; YOUSEFI, M.; KHANNIRI, E.; MORTAZAVIAN, A.M. Potential application of essential oils as antimicrobial preservatives in cheese. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 45, p. 62-72, 2018.

KHOSHAKHLAGH, K.; KOOCHEKI, A.; MOHEBBI, M.; ALLAFCHIAN, A. (). Development and characterization of electrosprayed Alyssum homolcarpum seed gum nanoparticles for encapsulation of D-limonene. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 490, p. 562–575, 2017.

KNIGHT, W.; OLSON, R. M. Wheat starch: production, modification, and uses. In R. L. Whistler, J. N. BeMiller, E. F. Paschall (Eds.). **Starch chemistry and technology**, New York: Academic Press, 1984, 491-506.

KRINGEL, D.H.; ANTUNES, M.D.; KLEIN, B.; CRIZEL, R.L.; WAGNER, R.; OLIVEIRA, R.P.; DIAS, A.R.G.; ZAVAREZE, E.R. Production, characterization, and stability of orange or eucalyptus essential oil/ $\beta$ -cyclodextrin inclusion complex. **Journal of Food Science**, v.82, p. 2598-2605, 2017.

KURKOV, S. V.; LOFTSSON, T. Cyclodextrins, Review. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 453, p.167-180, 2013.

LI, K.; YIN, S.; YIN, Y.; TANG, C.; YANG, X.; WEN, S. Preparation of water-soluble antimicrobial zein nanoparticles by a modified antisolvent approach and their characterization. **Journal of Food Engineering**, v. 119, p. 343-352, 2013.

LI, Z.; CHEN, S.; GU, Z. CHEN J.; WU, J. Alpha-cyclodextrin: Enzymatic production and food applications. **Trends in Food Science & Technology**, v. 35, p.151-160, 2014.

LI, W.; GAO, J.; WU, G.; ZHENG, J.; OUYANG, S.; LUO, Q.; ZHANG. G. Physicochemical and structural properties of A- and B-starch isolated from normal and waxy wheat: Effects of lipids removal. **Food Hydrocolloids**, v. 60, p. 364-373, 2016.

Li, P. H.; Lu, W. C.Effects of storage conditions on the physical stability of D-limonene nanoemulsion. **Food Hydrocolloids**, v. 53, p. 218–224, 2016.

LI, Y.; WU, C.; WU, T.; WANG, L.; CHEN, S.; DING, T.; HU, Y. Preparation and characterization of citrus essential oils loaded in chitosan microcapsules by using different emulsifiers. **Journal of Food Engineering**, v. 217, p.108-114, 2018.

LIANG, H.; YUAN, Q.; VRIESEKOOOP, F.; V, F. Effects of cyclodextrins on the antimicrobial activity of plant-derived essential oil compounds. **Food Chemistry**, v. 135, p.1020-1027, 2012.

LIANG, J.; YAN, H.; WANG, X.; ZHOU, Y.; GAO, X.; PULIGUNDLA, P.; WAN, X. Encapsulation of epigallocatechin gallate in zein/chitosan nanoparticles for controlled applications in food systems. **Food Chemistry**, v. 231, p. 19-24, 2017.

LIANG, Q.; REN, X.; ZHANG, X.; HOU, T., Chalamaiah, M., Ma, H., & Xu, B. Effect of ultrasound on the preparation of resveratrol-loaded zein particles. **Journal of Food Engineering**, v. 221, p. 88-94, 2018.

LIBRÁN, C.M.; CASTRO, S.; LAGARON, J.M. Encapsulation by electrospray coating atomization of probiotic strains. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 39, p. 216-222, 2017.

LIMA, P.S.S.; LUCCHESI, A.M.; ARAÚJO-FILHO, H.G.; MENEZES, P.P.; ARAÚJO, A.A.S.; QUINTANS-JÚNIOR, L.J.; QUINTANS, J.S.S. Inclusion of terpenes in cyclodextrins: Preparation, characterization and pharmacological approaches: Review. **Carbohydrate Polymers**, v. 151, p. 965-987, 2016.

LONČAREVIĆ, I.; PAJIN, B.; FIŠTEŠ, A.; TUMBAS ŠAPONJAC, V.; PETROVIĆ, J.; JOVANOVIĆ, P.; VULIĆ, J.; ZARIĆ, D. Enrichment of white chocolate with blackberry juice encapsulate: Impact on physical properties, sensory characteristics and polyphenol content. **LWT- Food Science and Technology**, v. 92, p. 458–464, 2018.

MAHATO, N.; SHARMA, K.; KOTESWARARAO, R.; SINHA, M.; BARAL, E.; CHO, M.H. Citrus essential oils: Extraction, authentication and application in food preservation. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, 10.1080/10408398.2017.1384716, 2017.

MAHATO, N.; SHARMA, K.; SINHA, M.; CHO, M. H. Citrus waste derived nutra-/pharmaceuticals for health benefits: Current trends and future perspectives. **Journal of Functional Foods**, v. 40, p. 307–316, 2018.

MAHMOUD, K.F.; IBRAHIM, M.A.; MERVAT, E-D.; SHAABAN, H.A.; KAMIL, M.M.; HEGAZY, N.A. Nano-encapsulation efficiency of lemon and orange peels extracts on cake shelf life. **American Journal of Food Technology**, v. 11(3), p. 63-75, 2016.

MALMO, C.; LA STORIA, A.; MAURIELLO, G. Microencapsulation of *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 cells coated in alginate beads with chitosan by spray drying to use as a probiotic cell in a chocolate souffle. **Food Bioprocess Technology**, v. 6, p. 795-805, 2013.

MAN, R.C.; ISMAIL, A.F.; FUZI, S.F.Z.M.; GHAZALI, N, F.; ILLIAS, R.M. Effects of culture conditions of immobilized recombinant *Escherichia coli* on cyclodextrin glucanotransferase (CGTase) excretion and cell stability. **Process Biochemistry**, v. 51, p. 474- 483, 2016.

MANGOLIM, C.; MORIWAKI, C.; NOGUEIRA, A. C.; SATO, F.; BAESSO, M.L.; A NETO, A.M.; MATIOLI, G. Curcumin- $\beta$ -cyclodextrin inclusion complex: Stability, solubility, characterisation by FT-IR, FT-Raman, X-ray diffraction and photoacoustic spectroscopy, and food application. **Food Chemistry**, v. 153, p. 361–370, 2014.

MANINGAT, C. C.; SEIB, P. A.; BASSI, S. D.; WOO, K. S.; LASATER, G. D. Wheat starch: Production, properties, modification and uses. Whistler, R. L., BeMiller, J. N. **Starch chemistry and technology**. 3 ed., New York: Academic Press, 2009, p. 441-491

MARON, S.H.; NAKAJIMA, N., KRIEGER, I.M. Study of Entanglement of Polymers in Solution by Viscosity Measurements. **Journal of Polymer Science Part A**, v. 37, p. 1-18. 1959.

MARQUES, H.M.C. A review on cyclodextrin encapsulation of essential oils and volatiles. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 25, p. 313-323, 2010.

MARTINS, M.R.F.M.; VEIGA, F. Promotores de permeação para a liberação transdérmica de fármacos: uma nova aplicação para as ciclodextrinas. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.38, 1, p. 33-53, 2002.

MARTINS, R. F.; HATTI-KAUL, R. *Bacillus agaradhaerens* LS-3C cyclodextrin glycosyltransferase: activity and stability features. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 33, p. 819-827, 2003.

MARTINS, Z.E.; PINHO, O.; FERREIRA, I.M.P.L.V.O. Food industry by-products used as functional ingredients of bakery products. **Trends in Food Science & Technology**, v. 67, p. 106-128, 2017.

MATENCIO, A.; HERNÁNDEZ-GIL, C.J.G.; GARCÍA-CARMONA, F.; LOPÉZ-NICOLÁS, J.M. Physicochemical, thermal and computational study of the encapsulation of ruminic acid by natural and modified cyclodextrins. **Food Chemistry**, v. 216, p. 289-295, 2017.

MATHEW, S.; ADLERCREUTZ, P. Regioselective glycosylation of hydroquinone to  $\alpha$ -arbutin by cyclodextrin glucanotransferase from *Thermoanaerobacter* sp. **Biochemical Engineering Journal**, v. 79, p. 187-193, 2013.

MCKIE, V. A.; MCCLEARY, B. V. A rapid, automated method for measuring  $\alpha$ -amylase in pre-harvest sprouted (sprout damaged) wheat. **Journal of Cereal Science**, v. 64, p. 70–75, 2015.

MENDES, A.C.; STEPHANSEN, K.; CHRONAKIS, I.S. Electrospinning of food proteins and polysaccharides. **Food Hydrocolloids**, v. 68, p. 53-68, 2017.

MENEZES, P. P.; SERAFINI, M. R.; SANTANA, B. V.; NUNES, R. S.; QUINTANS, L. K.; SILVA, G. F.; MEDEIROS, I. A.; MARCHIORO, M.; FRAGA, B.P.; SANTOS, M. R.V.; ARAÚJO, A. A. S. Solid-state  $\beta$ -cyclodextrin complexes containing geraniol. **Thermochimica Acta**, v. 548, p. 45–50, 2012.

MIAO, M.; LI, R.; HUANG, C.; YE, F.; JIANG, B.; ZHANG, T. Structural modification and characterisation of a sugary maize soluble starch particle after double enzyme treatment. **Carbohydrate Polymers**, v. 122, p. 101-107, 2015.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, 31, 426-428, 1959.

MOOMAND, K.; LIM, L. Oxidative stability of encapsulated fish oil in electrospun zein fibres. **Food Research International Journal**, v. 62, p. 523–532, 2014.

MORASSI, L.L.P.; BERNARDI, A.O.; AMARAL, A.L.P.M.; CHAVES, R.D.; SANTOS, J.L.P.; COPETTI, M.V.; SANT'ANA, A.S. Fungi in cake production chain: Occurrence and evaluation of growth potential in different cake formulations during storage. **Food Research International**, v. 106, p. 141–148, 2018.

MORIWAKI, C.; MAZZER, C.; PAZZETTO, R.; MATIOLI, G. Produção, purificação e aumento da performance de ciclodextrina glicosiltransferases para produção de ciclodextrinas. **Química Nova**, v.32, n.9, p. 2360-2366, 2009.

MORIWAKI, C.; MANGOLIM, C. S.; RUIZ, G. B.; MORAIS, G. B.; BAESSO, M. L.; MATIOLI, G. Biosynthesis of CGTase by immobilized alkalophilic bacilli and crystallization of beta-cyclodextrin: Effective techniques to investigate cell immobilization and the production of cyclodextrins. **Biochemical Engineering Journal**, v. 83, p. 22–32, 2014.

MUNHUWEYI, K.; CALEB, O.J.; VAN REENEN, A.J.; OPARA, U.L. Physical and antifungal properties of  $\beta$ -cyclodextrin microcapsules and nanofibre films containing cinnamon and oregano essential oils. **LWT-Food Science and Technology**, v. 87, p. 413-422, 2018.

- MURA, P. Analytical techniques for characterization of cyclodextrin complexes in the solid state: A review. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.113, p. 226-238, 2015.
- MURALIKRISHNA, G.; NIRMALA, M. Cereal  $\alpha$ -amylases an overview. **Carbohydrate Polymers**, v.60, p. 163-173, 2005.
- MURIA, S. R.; CHEIRSILP, B.; KITCHA, S. Effect of substrate concentration and temperature on the kinetics and thermal stability of cyclodextrin glycosyltransferase for the production of  $\beta$ -cyclodextrin: Experimental results vs. mathematical model. **Process Biochemistry**. v. 46, p. 1399-1404, 2011.
- NEDOVIC, V.; KALUSEVIC, A.; MANOJLOVIC, V.; LEVIC, S.; BUGARSKI, B. An overview of encapsulation technologies for food Applications. **Procedia Food Science**, v. 1, p. 1806 -1815, 2011.
- NEO, Y. P.; RAY, S.; JIN, J.; GIZDAVIC-NIKOLAIDIS, M.; NIEUWOUDT, M. K.; LIU, D.; QUEK, S.Y. Encapsulation of food grade antioxidant in natural biopolymer by electrospinning technique: A physicochemical study based on zein–gallic acid system. **Food Chemistry**, v. 136, p. 1013-1021, 2016.
- NODA, T.; TAKIGAWA, S.; MATSUURA-ENDO, C.; SAITO, K.; TAKATA, K.; TABIKI, T.; WICKRAMASINGHE, H.A.M.; YAMAUCHI, H. The physicochemical properties of partially digested starch from sprouted wheat grain. **Carbohydrate Polymers**, v. 56, p. 271–277, 2004.
- OLIVEIRA, V. E.; ALMEIDA, E. W. C.; CASTRO, H. V.; EDWARDS, H. G. M.; SANTOS, H. F.; OLIVEIRA, L. F. C. Carotenoids and  $\beta$ -cyclodextrin inclusion complexes: Raman spectroscopy and theoretical investigation. **Journal of Physical Chemistry**, v. 115, p. 8511-8519, 2011.
- OSORIO-TOBÓN, J.F.; SILVA, E.K.; MEIRELES, M.A.A. Nanoencapsulation of flavors and aromas by emerging technologies. **Nanotechnology in the Agri-Food Industry**, vol.2, cap.3, 2016, 89-126.
- PASSARINHO, A.T.P.; DIAS, N.F.; CAMILLOTO, G.P.; CRUZ, R.S.; OTONI, C.G.; MORAES, A.R.F.; SOARES, N.F.F. Sliced bread preservation through oregano essential oil-containing sachet. **Journal of Food Process Engineering**, v. 37, p. 53–62, 2014.
- PÉREZ, S.; BERTOFT, E. The molecular structure of starch components and their contribution to the architecture of starch granule: a comprehensive review. **Starch/Stärke**, 62, 8, p. 389-420, 2010.

- PINKAEW, H.; THONGNGAM, M.; WANG, Y-J.; NAIVIKUL, O. Isolated rice starch fine structures and pasting properties changes during pre-germination of three Thai paddy (*Oryza sativa L.*) cultivars. **Journal Cereal Science**, v. 70, p. 116-122, 2016.
- PINKAEW, H.; WANG, Y-J.; NAIVIKUL, O. Impact of pre-germination on amylopectin molecular structures, crystallinity, and thermal properties of pre-germinated brown rice starches. **Journal Cereal Science**, v. 73, p.151-157, 2017.
- PIZZINATTO, A.; MAGNO, C. P. R. S.; CAMPAGNOLLI, D. M. F.; VITTI, P.; LEITAO, R. F. F. **Avaliação tecnológica de produtos derivados de farinha de trigo (pão, macarrão, biscoito)**. Campinas, 3ª Edição, 54 p, 1993.
- POMERANZ, Y. Chemical composition of kernel structures. In: POMERANZ, Y. **Wheat: chemistry and technology**. St. Paul (USA): AACC, 3(1), 1988, 68-114.
- POPINIGIS, F. **Fisiologia da semente**. Brasília: AGIPLAN, 1985, 289p.
- QUISPE-CONDORI, S.; SALDAÑA, M.D.A.; TEMELLI, F. Microencapsulation of flax oil with zein using spray and freeze drying. **LWT – Food Science and Technology**, v. 44, p.1880-1887, 2011.
- RADÜNZ, M.; HELBIG, E.; BORGES, C.D.; VALENTE, GANDRA, T.K.V.; GANDRA, E.A. A Mini-Review on Encapsulation of Essential Oils. **Journal of Analytical & Pharmaceutical Research**, v. 7, p.85, 2018.
- RAKMAI, J.; CHEIRSILP, B.; PRASERTSAN, P. Enhanced thermal stability of cyclodextrin glycosyltransferase in alginate-gelatin mixed gel beads and the application of  $\beta$ -cyclodextrin production. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 4, p. 717-726, 2015.
- RAKMAI, J.; CHEIRSILP, B. Continuous production of  $\beta$ -cyclodextrin by cyclodextrin glycosyltransferase immobilized in mixed gel beads: Comparative study in continuous stirred tank reactor and packed bed reactor. **Biochemical Engineering Journal**, v. 105, p. 107-113, 2016.
- RANI, K. U.; PRASADA RAO, U. J. S.; LEELAVATHI, K.; HARIDAS RAO, P. Distribution of Enzymes in Wheat Flour Mill Streams. **Journal of Cereal Science**, v. 34, p. 233–242, 2001.
- RIBEIRO-SANTOS, R.; ANDRADE, M.; SANCHES-SILVA, A. Application of encapsulated essential oils as antimicrobial agents in food packaging. **Current Opinion in Food Science**, v.14, p. 78-84, 2017.
- RIBES, S.; FUENTES, A.; TALENS, P.; BARAT, J.M.; FERRARI, G.; DONSI, F. Influence of emulsifier type on the antifungal activity of cinnamon leaf, lemon and

bergamot oil nanoemulsions against *Aspergillus niger*. **Food Control**, v. 73 p. 784-795, 2017.

RIZZELLO, C.G.; VERNI, M.; BORDIGNON, S.; GRAMAGLIA, V.; GOBBETTI, M. Hydrolysate from a mixture of legume flours with antifungal activity as an ingredient for prolonging the shelf-life of wheat bread. **Food Microbiology**, v. 64, p. 72-82, 2017.

ROBYT, J. F. Enzymes and Their Action on Starch. In: Whistler, R. L., BeMiller, J. N. **Starch chemistry and technology**. 3 ed. New York: Academic Press, 2009, p. 237-292.

ROCHA, T.S.; DEMIATE, I.M.; FRANCO, C.M.L. Características estruturais e físico-químicas de amidos de mandioca-salsa (*Arracacia xanthorrhiza*), **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, p. 620-628, 2008.

RODRÍGUEZ, J.; MARTÍN, M. J.; RUIZ, M. A.; CLARES, B. Current encapsulation strategies for bioactive oils: From alimentary to pharmaceutical perspectives. **Food Research International**, v. 83, p. 41–59, 2016.

ROMÁN, L.; DURA, A.; MARTÍNEZ, M, M.; ROSELL, C, M.; GÓMEZ, M. Combination of extrusion and cyclodextrin glucanotransferase treatment to modify wheat flours functionality. **Food Chemistry**, v.199, p. 287-295, 2016.

ROSA, C.G.; MACIEL, M.V.O.B.; CARVALHO, S.M.; MELO, A.P.Z.; JUMMES, B.; SILVA, T.; MARTELLI, S.M.; VILLETTI, M.A.; BERTOLDI, F.C.; BARRETO, P.L.M. Characterization and evaluation of physicochemical and antimicrobial properties of zein nanoparticles loaded with phenolics monoterpenes. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v.481, p. 337–344, 2015.

ROSICKA-KACZMAREK, J.; MAKOWSKI, B.; NEBESNY, E.; TKACZYK, M.; KOMISARCZYK, A.; NITA, Z. Composition and thermodynamic properties of starches from facultative wheat varieties. **Food Hydrocolloids**, v. 54, p. 66-76, 2016.

RUIZ, B.; FLOTATS, X. Citrus essential oils and their influence on the anaerobic digestion process: An overview. **Waste Management**, v. 34, p. 2063-2079, 2014.

RUTZ, J. K.; BORGES, C. D.; ZAMBIAZI, R. C.; ROSA, C.G.; SILVA, M.M. Elaboration of microparticles of carotenoids from natural and synthetic sources for applications in food. **Food Chemistry**, v. 202, p. 324-333, 2016.

SAKINAH, A. M. M.; ISMAIL, A. F.; HASSAN, O.; ZULARISAM, A.W.; ILLIAS, R. M. Influence of starch pretreatment on yield of cyclodextrins and performance of ultrafiltration membranes. **Desalination**, v. 239, p. 317-333, 2009.

SAKINAH, A.M.M.; ISMAIL, A.F.; ILLIAS, R.M.; ZULARISAM, A.W.; HASSAN, O.; MATSUURA, T. Effect of substrate and enzyme concentration on cyclodextrin production in a hollow fibre membrane reactor system. **Separation and Purification Technology**, v. 124, p. 61–67, 2014.

SAMAPUNDO, S.; DEVLIEGHERE, F.; VROMAN, A.; EECKHOUT, E. Antifungal properties of fermentates and their potential to replace sorbate and propionate in pound cake. **International Journal of Food Microbiology**, v. 237, p.157–163, 2016.

SAMAN, P.; VÁZQUEZ, J. A.; PANDIELLA, S. S. Controlled germination to enhance the functional properties of rice. **Process Biochemistry**, v. 43, p. 1377-1382, 2008.

SANTOS, E. H.; KAMIMURA, J. A.; HILL, J. E.; GOMES, C. L. Characterization of carvacrol beta-cyclodextrin inclusion complexes as delivery systems for antibacterial and antioxidant applications, **LWT - Food Science and Technology**, v. 60, p. 583-592, 2015.

SANTOS, C.; BUERA, P.; MAZZOBRE, F. Novel trends in cyclodextrins encapsulation. Applications in Food Science. **Current Opinion in Food Science**, v. 16, p. 106–113, 2017.

SAWALE, P. D.; PATIL, G. R.; HUSSAIN, S. A.; SINGH, A. K.; SINGH, R. R. B. Effect of incorporation of encapsulated and free Arjuna herb on storage stability of chocolate vanilla dairy drink. **Food Bioscience**, v. 19, p. 142–148, 2017.

SCHÖFFER, J.N.; KLEIN, M. P.; RODRIGUES, R.C.; HERTZ, P. F. Continuous production of  $\beta$ -cyclodextrin from starch by highly stable cyclodextrin glycosyltransferase immobilized on chitosan. **Carbohydrate Polymers**, v. 98, p. 1311– 1316, 2013.

SCHÖFFER, J.N.; MATTE, C.R.; CHARQUEIRO, D.S.; MENEZES, E.W.; COSTA, T.M.H.; BENVENUTTI, E.V.; RODRIGUES, R.C.; HERTZ, P.F. Directed immobilization of CGTase: The effect of the enzyme orientation on the enzyme activity and its use in packed-bed reactor for continuous production of cyclodextrins. **Process Biochemistry**, v. 58, p. 120-127, 2017.

SHAO, P.; ZHANG, J.; FANG, Z.; SUN, P. Complexing of chlorogenic acid with  $\beta$ -cyclodextrins: Inclusion effects, antioxidative properties and potential application in grape juice, **Food Hydrocolloids**, v. 41, p.132-139, 2014.

SHISHIR, M.R.I.; XIE, L.; SUN, C.; ZHENG, X.; CHEN, W. Advances in micro and nano-encapsulation of bioactive compounds using biopolymer and lipid-based

transporters – A review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 78, p. 34-60, 2018.

SHRESTHA, M.; HO, T.M.; BHANDARI, B.R. Encapsulation of tea tree oil by amorphous beta-cyclodextrin powder. **Food Chemistry**, v. 221, p. 1474-1483, 2017.

SIMAS, D.L.R.; AMORIM, S.H.B.M.; GOULART, F.R.V.; ALVIANO, C.S.; ALVIANO, D.S.; SILVA, A.J.R. Citrus species essential oils and their components can inhibit or stimulate fungal growth in fruit. **Industrial Crops and Products**, v. 98, p. 108–115. 2017.

SINGH, K.; KAYASTHA, A. M.  $\alpha$ -Amylase from wheat (*Triticum aestivum*) seeds: Its purification, biochemical attributes and active site studies. **Food Chemistry**, v. 162, p. 1-9, 2014.

SINGH, A.; SHARMA, S.; SINGH, B. Effect of germination time and temperature on the functionality and protein solubility of sorghum flour. **Journal Cereal Science**, v. 76, p. 131-149, 2017.

SIRISOONTARALAK, P.; SUTHIRAK, P.; PAPAKA, K.; VONGSAWASDI, P. Development of shelf stable chiffon cake using gamma irradiation. **LWT – Food Science and Technology**, v. 75, p.78-84, 2017.

SMEETS, A.; CLASEN, C.; VAN DEN MOOTER, G. Electrospraying of polymer solutions: Study of formulation and process parameters. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 119, p. 114-124, 2017.

SOLÓRZANO-SANTOS, F.; MIRANDA-NOVALES, M. G. Essential oils from aromatic herbs as antimicrobial agents. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 23, p. 136-141, 2012.

SOTELO-BOYÁS, M.; CORREA-PACHECO, Z.; BAUTISTA-BAÑOS, S.; GÓMEZ, Y. Release study and inhibitory activity of thyme essential oil-loaded chitosan nanoparticles and nanocapsules against foodborne bacteria. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.103, p. 409-414, 2017.

STONE, H.; BLEIBAUM, R.N.; THOMAS, H.A. **Sensory Evaluation Practices**. 4 ed. San Diego: Academic Press, 2012. 438 p.

SUN, C.; DAI, L.; HE, X.; LIU, F.; YUAN, F.; GAO, Y. Effect of heat treatment on physical, structural, thermal and morphological characteristics of zein in ethanol-water solution. **Food Hydrocolloids**, v. 58, p.11-19, 2016.

- SVENSSON, D.; ULVENLUND, S.; ADLERCREUTZ, P. Efficient synthesis of a long carbohydrate chain alkyl glycoside catalyzed by cyclodextrin glycosyltransferase (CGTse). **Biotechnology and Bioengineering**, v.104, n. 5, p. 854-861, 2009.
- TALEGAONKAR, S.; PANDEY, S.; RAI, N.; RAWAT, P.; SHARMA, P.; KUMARI, N. Exploring nanoencapsulation of aroma and flavors as new frontier in food technology. **Nanotechnology in the Agri-Food Industry**, vol.2, cap.2, 2016, 47-88.
- TAKEUNGWONGTRAKUL, S.; BENJAKUL, S.; H-KITTIKUNB, A. Characteristics and oxidative stability of bread fortified with encapsulated shrimp oil. **Italian Journal of Food Science**, v. 27, 2015.
- TAO, F.; HILL, L. E.; PENG, Y.; GOMES, C. L. Synthesis and characterization of  $\beta$ -cyclodextrin inclusion complexes of thymol and thyme oil for antimicrobial delivery applications. **LWT - Food Science and Technology**, v. 59, p. 247-255, 2014.
- TESTER, R.F.; KARKALAS, J.; QI, X. Starch- composition, fine structure and architecture. **Journal Cereal Science**. v. 39, p. 151-165, 2004.
- TIAN, Y.; LI, Y.; MANTHEY, F. A.; XU, X.; JIN, Z.; DENG, L. Influence of  $\beta$ -cyclodextrin on the short-term retrogradation of rice starch. **Food Chemistry**, v. 116(1), p. 54–58, 2009.
- TROTTA, F.; ZANETTI, M.; CAMINO, G. Thermal degradation of cyclodextrins. **Polymer Degradation and Stability**, v. 69, p. 373-379, 2000.
- TUMBAS ŠAPONJAC, V.; ĆETKOVIĆ, G.; ČANADANOVIĆ-BRUNET, J.; PAJIN, B.; DJILAS, S.; PETROVIĆ, J.; LONČAREVIĆ, I.; STAJČIĆ, S.; VULIĆ, J. Sour cherry pomace extract encapsulated in whey and soy proteins: Incorporation in cookies. **Food Chemistry**, v. 207, p. 27–33, 2016.
- VAN DER VEEN, B.A., UITDEHAAG, J.C.M., DIJKSTRA, B.W., & DIJKHUIZEN, L. Engineering of cyclodextringlycosyl transferase reaction and product specificity. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1543, p. 336–360, 2000.
- VAN HUNG, P.; MAEDA, T.; YAMAMOTO, S.; MORITA, N. Effects of germination on nutritional composition of waxy wheat. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 92, p. 667–672, 2011.
- VEGA-LUGO, A. C.; LIM, L. T. Controlled release of allyl isothiocyanate using soy protein and poly (lactic acid) electrospun fibers. **Food Research International**, v. 42, n. 8, p. 933–940, 2009.

- VELÁZQUEZ-NUÑEZ, M.J.; AVILA-SOSA, R.; PALOU, E.; LÓPEZ-MALO, A. Antifungal activity of orange (*Citrus sinensis* var. Valencia) peel essential oil applied by direct addition or vapor contact. **Food Control**, v.31, p.1-3, 2013.
- VELMURUGAN, P.; GANESHAN, V.; NISTHER, N.F.; JONNALAGADDA, R.R. Encapsulation of orange and lavender essential oils in chitosan nanospherical particles and its application in leather for aroma enrichment. **Surfaces and Interfaces**, v. 9, p. 124–132, 2017.
- VENTURINI, C. G.; NICOLINI, J.; MACHADO, C.; MACHADO, V. G. Propriedades e aplicações recentes das ciclodextrinas, **Química nova**, v. 31, 2, p. 360-368, 2008.
- VILANOVA, N.; SOLANS, C. Vitamin A Palmitate- $\beta$ -cyclodextrin inclusion complexes: Characterization, protection and emulsification properties. **Food Chemistry**, v. 175, p. 529-535, 2015.
- VITAGLIONE, P.; TROISE, A.D.; DE PRISCO, A.C.; MAURIELLO, G.L., GOKMEN, V.; FOGLIANO, V. **Use of Microencapsulated Ingredients in Bakery Products: Technological and Nutritional Aspects**. In: Microencapsulation and Microspheres for Food Applications, 301-311. Academic Press, 2015.
- VOS, P.D.; FAAS, M.M.; SPASOJEVIC, M.; SIKKEMA, J. Encapsulation for preservation of functionality and targeted delivery of bioactive food components. **International Dairy Journal**, v. 20, p. 292–302, 2010.
- WADHWA, G.; KUMAR, S.; CHHABRA, L.; MAHANT, S.; RAO, R. Essential oil–cyclodextrin complexes: an updated review. **Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry**, v. 89, p. 39-58, 2017.
- WANG, J.; CAO, Y.; SUN, B.; WANG, C. Physicochemical and release characterisation of garlic oil- $\beta$ -cyclodextrin inclusion complexes. **Food Chemistry**, v. 127, p. 1680-1685, 2011.
- WANG, L.; WU, D.; CHEN, J.; WU, J. Enhanced production of  $\gamma$ -cyclodextrin by optimization of reaction of  $\gamma$ -cyclodextrin glycosyltransferase as well as synchronous use of isoamylase. **Food Chemistry**, v.141, p. 3072-3076, 2013.
- WANG, S. J.; LUO, H.; ZHANG, J.; ZHANG, Y.; HE, Z. H.; WANG S. Alkali-induced changes in functional properties and *in vitro* digestibility of wheat starch: The role of surface proteins and lipids. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, p. 3636-3643, 2014.

WANG, S.; LI, C.; COPELAND, L.; NIU, Q.; WANG, S. Starch Retrogradation: A Comprehensive Review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v.14, p. 568-585, 2015.

WANG, H.; HAO, L.; WANG, P.; CHEN, M.; JIANG, S.; JIANG, S. Release kinetics and antibacterial activity of curcumin loaded zein fibers. **Food Hydrocolloids**, v. 63, p. 437-446, 2017.

WANG, P.; LIU, K.; GU, Z.; YANG, R. Enhanced  $\gamma$ -aminobutyric acid accumulation, alleviated componential deterioration and technofunctionality loss of germinated wheat by hypoxia stress. **Food Chemistry**, v. 269, p. 473-479, 2018.

WANI, T.A.; MASOODI, F.A.; WANI, I.A. The possible nomenclature of encapsulated products. **Food Chemistry**, v. 234, p. 119-120, 2017.

WEN, P.; ZHU, D.; FENG, K.; LIU, F.; LOU, W.; LI, M.; ZONG, M.; WU, H. Fabrication of electrospun polylactic acid nanofilm incorporating cinnamon essential oil/ $\beta$ -cyclodextrin inclusion complex for antimicrobial packaging. **Food Chemistry**, v. 196, p. 996-1004, 2016.

WEN, P.; ZONG, M-H.; LINHARDT, R.J.; FENG, K.; WU, H. Electrospinning: A novel nano-encapsulation approach for bioactive compounds- A review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 70, p. 56-68, 2017.

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

XU, J.; ZHANG, H.; GUO, X.; QIAN, H. The impact of germination on the characteristics of brown rice flour and starch. **Journal Science Food Agriculture**, v. 92, p. 380-387, 2011.

YANG, H.; FENG, K.; WEN, P.; ZONG, M.; LOU, W.; WU, H. Enhancing oxidative stability of encapsulated fish oil by incorporation of ferulic acid into electrospun zein mat. **LWT - Food Science and Technology**, v. 84, p. 82-90, 2017.

YANG, Y.; ZHAO, C.; TIAN, G.; LU, C.; LI, C.; BAO, Y.; TANG, Z.; MCCLEMENTS, D.J.; XIAO, H.; ZHENG, J. Characterization of physical properties and electronic sensory analyses of citrus oil-based nanoemulsions. **Food Research International**, v. 109, p. 149-158, 2018.

YAO, Z-C.; CHANG, M-W.; AHMAD, Z.; LI, J-S. Encapsulation of rose hip seed oil into fibrous zein films for ambient and on demand food preservation via coaxial electrospinning. **Journal of Food Engineering**, v. 191, p. 115-123, 2016.

- YILDIZ, Z.Y.; CELEBIOGLU, A.; KILIC, M.E.; DURGUN, E.; UYAR, T. Menthol/cyclodextrin inclusion complex nanofibers: Enhanced water solubility and high-temperature stability of menthol. **Journal Food Engineering**, v. 224, p. 27-36, 2018.
- YONEMOTO, P.G.; CALORI-DOMINGUES, M.A.; FRANCO, C.M.L. Efeito do tamanho dos grânulos nas características estruturais e físico-químicas do amido de trigo. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, 4, p. 761-771, 2007.
- ZAEIM, D.; SARABI-JAMAB, M.; GHORANI, B.; KADKHODAE, R.; TROMP, R.H. Electro spray assisted fabrication of hydrogel microcapsules by single- and double-stage procedures for encapsulation of probiotics. **Food and Bioprocess Processing**, v. 102, p. 250-259, 2017.
- ZAMANI, M.; PRABHAKARAN, M. P.; RAMAKRISHNA, S. Advances in drug delivery via electrospun and electrospayed nanomaterials. **International Journal of Nanomedicine**, v. 8, p. 2997–3017, 2013.
- ZAVAREZE, E.R.; DIAS, A.R.G. Impact of heat-moisture treatment and annealing in starches: A review. **Carbohydrate Polymers**, v. 83, p. 317–328, 2011.
- ZHAN, J.; TIAN, Y.; TONG, Q. Preparation and slowly digestible properties of  $\beta$ -cyclodextrins ( $\beta$ -CDs)-modified starches. **Carbohydrate Polymers**, v. 91(2), p. 609–612, 2013.
- ZHANG, W.; LI, X.; YU, T.; YUAN, L.; RAO, G.; LI, D.; MU, C. Preparation, physicochemical characterization and release behavior of the inclusion complex of trans-anethole and  $\beta$ -cyclodextrin. **Food Research International**, v. 74, p. 55-62, 2015.
- ZHANG, Y.; GUO, Q.; FENG, N.; WANG, J.; WANG, S.; HE, Z. Characterization of A- and B-type starch granules in Chinese wheat cultivars. **Journal of Integrative Agriculture**, v. 15, 10, p. 2203–2214, 2016.
- ZHANG, S.; ZHANG, H.; XU, Z.; WU, M.; XIA, W.; ZHANG, W. Chimonanthus praecox extract/cyclodextrin inclusion complexes: Selective inclusion, enhancement of antioxidant activity and thermal stability. **Industrial Crops and Products**, v. 95, p. 60-65, 2017.
- ZHEKOVA B., DOBREV, G., STANCHEV, V., & PISHTIYSKI I. Approaches for yield increase of  $\beta$ -cyclodextrin formed by cyclodextrin glucanotransferase from *Bacillus megaterium*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 25, n 46, p. 1043-1049, 2009.

ZHONG, Q.; JIN, M. Zein nanoparticles produced by liquid-liquid dispersion. **Food Hydrocolloids**, v. 23, p. 2380-2387, 2009.

ZHU, G.; XIAO, Z.; ZHOU, R.; ZHU, Y. Study of production and pyrolysis characteristics of sweet orange flavor- $\beta$ -cyclodextrin inclusion complex. **Carbohydrate Polymers**, v.105, p. 75–80, 2014. ZHU, F. Encapsulation and delivery of food ingredients using starch based systems. **Food Chemistry**, v. 229, p. 542-552, 2017.

ZŁOTEK, U. Antioxidative, potentially anti-inflammatory, and antidiabetic properties, as well as oxidative stability and acceptability, of cakes supplemented with elicited basil. **Food Chemistry**, v. 243, p. 168–174, 2018.