



LÍVIO ANTÔNIO SILVA PEREIRA

**ÓLEOS ESSENCIAIS ENCAPSULADOS EM MATRIZES
COACERVADAS E POTENCIAL ANTIMICROBIANO PARA
APLICAÇÃO EM ALIMENTOS**

**LAVRAS – MG
2021**



LÍVIO ANTÔNIO SILVA PEREIRA

**ÓLEOS ESSENCIAIS ENCAPSULADOS EM MATRIZES COACERVADAS E
POTENCIAL ANTIMICROBIANO PARA APLICAÇÃO EM ALIMENTOS**

Tese apresentada à
Universidade Federal de
Lavras, como parte das
exigências do Programa de
Pós-graduação em Engenha-
ria de Biomateriais para a
obtenção do título de Doutor.

Comitê de orientação:

Professor Doutor Diego Alvarenga Botrel – Departamento de Ciência dos
Alimentos/Universidade Federal de Lavras

Professora Doutora Lizzy Ayra Alcântara Veríssimo - Departamento de Ciência dos
Alimentos/Universidade Federal de Lavras

Professor Doutora Roberta Hilsdorf Piccoli- Departamento de Ciência dos
Alimentos/Universidade Federal de Lavras

**LAVRAS – MG
2021**

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Pereira, Lívio Antônio Silva.

Óleos essenciais encapsulados em matrizes coacervadas e potencial antimicrobiano para aplicação em alimentos / Lívio Antônio Silva Pereira. - 2021.

101 p.

Orientador(a): Diego Alvarenga Botrel.

Coorientador (a): Lizzy Ayra Alcântara Veríssimo, Roberta Hilsdorf Piccoli.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Lavras, 2021.

Bibliografia.

1. microencapsulação. 2. óleos essenciais. 3. linguiça frescal. I. Botrel, Diego Alvarenga. II. Veríssimo, Lizzy Ayra Alcântara. III. Piccoli, Roberta Hilsdorf. IV. Título.

LÍVIO ANTÔNIO SILVA PEREIRA

**ÓLEOS ESSENCIAIS ENCAPSULADOS EM MATRIZES COACERVADAS E
AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIMICROBIANO PARA APLICAÇÃO EM
ALIMENTOS**

**ESSENTIAL OILS ENCAPSULATED IN COACERVATED MATRICES AND
ANTIMICROBIAL POTENTIAL FOR FOOD APPLICATIONS**

Tese apresentada à

Universidade Federal de Lavras
como parte das exigências do
Programa de Pós-graduação em
Engenharia de Biomateriais.

APROVADA EM 10 de maio de 2021.

Dr. Éric Keven Silva UNIFAL

Dr (a). Roberta Hilsdorf Piccoli UFLA

Dr (a). Heloísa Helena De Abreu Martins IFBA

Dr. Cassiano Rodrigues De Oliveira UFV

Professor Doutor Diego Alvarenga Botrel
Orientador

**LAVRAS
2021**

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pela saúde, pela calma e determinação para vencer os desafios.

Aos meus pais Francisco de Assis Pereira e Rita de Cássia Silva Pereira pela minha criação e exemplo de retidão e integridade e por todo apoio nas minhas escolhas e nos momentos mais difíceis.

A minha noiva Priscila de Castro e Silva por todo amor e ajuda técnica nas pesquisas e vida pessoal.

Ao Prof. Diego Alvarenga Botrel por ter aceitado me orientar. Sou eternamente grato pelo apoio e confiança. Grande ser humano e exemplo de mentor, sendo sempre extremamente gentil, equilibrado e acima e tudo humano.

A Prof^a. Lizzy Ayra Alcântara Veríssimo por me co-orientar, pelo carinho, atenção e ajuda técnica.

A Prof.^a Roberta Hilsdorf Piccoli por ser uma segunda mãe nos meus últimos anos de pós-graduação. Nos meus momentos mais difíceis tive sua mão estendida. Jamais esquecerei!

Aos amigos e colegas de trabalho Fernanda, Michele, Heloisa, Juliana, Nelma, e todos os demais do Laboratório de Microbiologia dos alimentos /DCA/UFLA e do Laboratório de Embalagens /DCA/ por deixar meus dias mais felizes e por me fazer amar a pesquisa.

Aos amigos e colegas da Orquestra de Cordas da UFLA e Coral Vozes do Campus por deixar minhas noites iluminadas e cheias de arte e alegria em especial ao Maestro Daniel Paes de Barros e aos amigos Ana Cláudia, Lucas e demais integrantes, minha eterna saudade!

A CAPES pelo auxílio financeiro disponibilizado para realização deste trabalho.

A todos que contribuíram diretamente ou indiretamente com equipamentos, metodologias, análises, críticas, sugestões e discussões para realização deste trabalho.

A todos o meu sincero e muito abrigado.

RESUMO

Os óleos essenciais têm atividade antimicrobiana sobre vários microrganismos patogênicos e deterioradores, entretanto, as atuais pesquisas indicam vários fatores que limitam sua aplicação. Portanto, a utilização de barreiras de proteção sobre estas substâncias voláteis é necessária. Neste trabalho foi desenvolvido um sistema encapsulante baseado em proteínas (soro de leite, soja e ervilha) em combinação com goma arábica para encapsulação de uma blenda de óleos essenciais (tomilho, orégano e cravo) por meio da técnica de coacervação complexa. Os coacervados foram produzidos variando suas proporções (1:1, 1:2, 1:3, 2:1, 3:1) e pH entre 3,0 e 6,0. Os óleos essenciais foram caracterizados por cromatografia gasosa a fim de identificar seus componentes majoritários (timol, carvacrol e eugenol, respectivamente). Foram feitas análises da concentração mínima bactericida (CMB) de cada óleo essencial e analisada sua mistura em diversas concentrações a fim de avaliar o sinergismo. Para *Listeria monocytogenes*, a CMB dos óleos essenciais foram 0,3125% de orégano e cravo e para o óleo de tomilho foi 0,6250%. Para *Weissella viridescens*, a CMB dos óleos essenciais foram 0,0780% de orégano, 0,15625% de cravo e 0,625% de tomilho. Ao misturar os óleos a CMB diminuiu em 50%. As micropartículas contendo óleos essenciais apresentaram ação antimicrobiana, apresentando halos de inibição de até 22,34 mm. O tamanho das microcápsulas variou entre 0,2 a 1,8 μm . A influência de liberação em meio de cultura de *Listeria monocytogenes* e *Weissella viridescens* foi avaliada e foi identificada liberação significativa de compostos das microcápsulas a partir de 180 min. Houve uma eficiência de encapsulação de até 83,5% para Proteína de soja/goma arábica, 73,97% para Isolado de soro/goma arábica e menor eficiência de 56% para Proteína de ervilha/goma arábica. Em um segundo momento, microcápsulas de Proteína de Soja/Goma arábica 1:1 com 1:1 de blenda de óleos essenciais de orégano (*Origanum vulgare*), tomilho (*Thymus vulgaris*) e cravo (*Syzygium aromaticum*) (1:1:2) foram aplicadas em linguiça frescal composta de carne de porco e toucinho e inoculadas com *Listeria monocytogenes*. As amostras foram embaladas a vácuo e armazenadas durante 15 dias a 7°C, com medições de 3 em 3 dias. Foi avaliado crescimento da *Listeria monocytogenes*. A partir do dia 6 é observado uma diminuição do crescimento microbiano em T1 e T2 e contínuo crescimento para T3 e o controle. Este perfil se manteve até o 15º dia com ausência de crescimento em T2 a partir do 9º dia indicando eliminação do microrganismo e inibição do crescimento microbiano em T1. Foi feita análise de cor dos parâmetros L*, a* e b*. Ao longo do tempo com a liberação dos óleos das microcápsulas houve interações entre a carne e a blenda de óleos ocasionando aumento da cor vermelha. Nas análises de pH ao longo dos dias T1 e T2 foi observada uma menor variação no pH, o que nos dá indícios de maior estabilidade no armazenamento em comparação aos demais tratamentos. Em geral as microcápsulas (T2) foram efetivas em relação a inibição de microrganismos avaliados e o estudo colabora com a melhor compreensão dos mecanismos de microencapsulação por coacervação complexa aplicado em matrizes alimentícias.

Palavras chave: coacervação, conservantes naturais; microencapsulação; liberação controlada; biopolímeros.

ABSTRACT

Essential oils have antimicrobial activity on various pathogenic and spoilage microorganisms, however, current research indicates several factors that limit their application. Therefore, the use of protective barriers on these volatile substances is necessary. In this work, an encapsulating system based on proteins (whey, soybean and pea) in combination with gum arabic was developed for encapsulating a blend of essential oils (thyme, oregano and clove) using the complex coacervation technique. Coacervates were produced varying their proportions (1:1, 1:2, 1:3, 2:1, 3:1) and pH between 3.0 and 6.0. Essential oils were characterized by gas chromatography in order to identify their major components (thymol, carvacrol and eugenol, respectively). Analyzes of the minimum bactericidal concentration (CMB) of each essential oil were performed and its mixture analyzed at different concentrations in order to assess synergism. For *Listeria monocytogenes*, the CMB of essential oils was 0.3125% oregano and clove and for thyme oil was 0.6250%. For *Weissella viridescens*, the CMB of essential oils were 0.0780% oregano, 0.15625% clove and 0.625% thyme. When mixing the oils the CMB decreased by 50%. The microparticles containing essential oils showed antimicrobial action, showing inhibition halos of up to 22.34 mm. The size of the microcapsules ranged from 0.2 to 1.8 μm . The influence of release in culture medium of *Listeria monocytogenes* and *Weissella viridescens* was evaluated and significant release of compounds from the microcapsules was identified from 180 min. There was an encapsulation efficiency of up to 83.5% for Soy protein/gum arabic, 73.97% for Whey isolate/gum arabic and a lower efficiency of 56% for Pea protein/gum arabic. In a second step, 1:1 Soy Protein/Gum Arabic microcapsules with a 1:1 blend of essential oils of oregano (*Origanum vulgare*), thyme (*Thymus vulgaris*) and clove (*Syzygium aromaticum*) (1:1:2) were applied to fresh sausage composed of pork and bacon and inoculated with *Listeria monocytogenes*. The samples were vacuum packed and stored for 15 days at 7°C, with measurements taken every 3 days. The growth of *Listeria monocytogenes* was evaluated. From day 6 onwards, a decrease in microbial growth is observed in T1 and T2 and continued growth in T3 and the control. This profile remained until the 15th day with no growth in T2 from the 9th day onwards, indicating elimination of the microorganism and inhibition of microbial growth in T1. Color analysis of L*, a* and b* parameters was performed. Over time, with the release of oils from the microcapsules, there were interactions between the meat and the blend of oils, causing an increase in the red color. In the pH analysis over days T1 and T2, a smaller variation in pH was observed, which gives us evidence of greater stability in storage compared to the other treatments. In general, microcapsules (T2) were effective in inhibiting the evaluated microorganisms and the study contributes to a better understanding of the mechanisms of microencapsulation by complex coacervation applied to food matrices.

Keywords: coacervation, natural preservatives; microencapsulation; controlled release; biopolymers.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	9
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	12
2.1	Óleos essenciais.....	12
2.2	Microencapsulação.....	13
2.2.1	Coacervação.....	16
2.2.2	Materiais encapsulantes.....	18
2.2.3	Microencapsulação de óleos essenciais em alimentos.....	22
2.2.4	Linguças frescas	23
	REFERÊNCIAS	25
	ARTIGO 1 - ESSENTIAL OILS ENCAPSULATED INTO COACERVATE MATRICES AND EVALUATION OF THEIR ANTIMICROBIAL POTENTIAL FOR APPLICATION IN FOOD	36
1.	INTRODUCTION.....	38
2.	MATERIALS AND METHODS.....	40
2.1	Materials.....	40
2.2	Standardization and maintenance of microorganisms and inocula.....	40
2.3	Profile and antimicrobial action of essential oil components	40
2.4	Microcapsule preparation and characterization	43
2.5	Antimicrobial activity of the microcapsules.....	46
2.6	Essential oil blend release studies	46
2.7	Statistical analysis.....	47
3	RESULTS AND DISCUSSION.....	47
3.1	Phytochemical characterization of the essential oil blend	47
3.2	Antimicrobial activity of the essential oils and their blends.....	48
3.3	Effect of pH and wall material proportion on coacervation yield	52
3.4	Morphological characterization of microcapsules.....	54
3.5	Determination of oil retention efficiency in microcapsules	56
3.6	Antimicrobial activity of the microcapsules.....	57

3.7	Essential oil blend release versus microorganism growth	58
4	CONCLUSION.....	60
5	ACKNOWLEDGMENT.....	60
	REFERENCES	61
	ARTIGO 2 – POTENCIAL ANTIMICROBIANO DE MICROCÁPSULAS DE PROTEÍNA DE SOJA/GOMA ARÁBICA CONTENDO BLEND DE ÓLEOS ESSENCIAIS PARA APLICAÇÃO EM LINGUIÇA FRESCAL.....	68
1	INTRODUÇÃO	69
2	MATERIAIS E MÉTODOS.....	70
2.1	Preparo das microcápsulas proteína de soja/goma arábica por coacervação complexa ..	70
2.2	Fabricação de linguiça frescal	71
2.3	Qualidade microbiológica	72
2.4	Medição da cor instrumental e pH.....	72
2.5	Análise estatística	72
3	RESULTADOS E DISCUSSÕES	73
3.1	Qualidade microbiológica	73
3.2	Medição da cor instrumental e pH.....	78
4	CONCLUSÃO	86
	REFERÊNCIAS	86
	CONCLUSÃO FINAL	100

PRIMEIRA PARTE

1 INTRODUÇÃO

Com o processo de globalização e a demanda por alta produção de alimentos, a segurança alimentar se tornou uma preocupação e requisito fundamental para a disponibilização de produtos alimentícios. A segurança dos alimentos tem sido tema de diversos estudos focados no desenvolvimento de novos processos e aprimoramento daqueles já existentes. Neste sentido, o uso de aditivos conservantes, a fim de manter os alimentos livres de microrganismos patogênicos e deteriorantes, tem sido altamente explorado na indústria de alimentos (FUNG, WANG, *et al.*, 2018).

Entretanto alguns destes conservantes, como os sais de nitrito, utilizados na conservação de produtos cárneos, lácteos e vegetais podem apresentar riscos à saúde se consumidos em grande quantidade e, principalmente, a longo prazo. Há diversos estudos demonstrando os efeitos nocivos causados por conservantes convencionais, como processos alérgicos, cancerígenos e problemas relacionados a hipertensão (ARBOATTI, OLIVARES, *et al.*, 2014, GRACIA-VALENZUELA, OROZCO-MEDINA, *et al.*, 2012, TOLDRA, 2007). Portanto, torna-se necessário o estudo de novas alternativas de conservantes a serem utilizados no processamento de alimentos, sendo os óleos essenciais potenciais candidatos.

Os óleos essenciais são substâncias sintetizadas, armazenadas e liberadas pelas plantas. Eles agem como conservantes antibacterianos e flavorizantes (ESPITIA, AVENA-BUSTILLOS, *et al.*, 2014, PERRICONE, ARACE, *et al.*, 2015). Destacam-se como alternativa no uso de conservantes sintéticos, já que nos últimos anos suas propriedades antimicrobianas e antioxidantes, vêm sendo comprovadas em diversos estudos. Muitos óleos essenciais, já possuem aplicação em escala industrial, principalmente nas áreas farmacêutica e alimentícia, como substitutos de antibióticos e na substituição parcial ou total de conservantes químicos (ORTIZ DE ELGUEA-CULEBRAS, SÁNCHEZ-VIOQUE, *et al.*, 2016). Entretanto, vários fatores limitam suas aplicações, tais como alterações sensoriais no produto, alta volatilidade e instabilidade em determinados meios através de componentes suscetíveis a degradação. A fim de mitigar estes problemas, técnicas de microencapsulação pode ser aplicadas por meio do uso de uma gama de biomateriais como proteínas e carboidratos (PAULO, SANTOS, 2017, VEIGA, APARECIDA DA SILVA-BUZANELLO, *et al.*, 2019).

Muitos biopolímeros vem sendo estudados dentre eles as proteínas vegetais. As

proteínas vegetais têm sido amplamente estudadas nos últimos anos, devido ao seu caráter renovável e biodegradável, e boas propriedades funcionais, como capacidade emulsificante, propriedades filmogênicas. Estes materiais estão ganhando espaço através de novos processos tecnológicos. São materiais que angariam proteção, colaboram na conservação e podem ser grandes aliados em processos envolvendo a aplicação de óleos essenciais em matrizes alimentícias. Proteínas extraídas da soja, ervilha, trigo, milho e cevada já provaram sua capacidade de proteger com eficiência vários ingredientes através de processos de microencapsulação. A utilização dessas proteínas oferece a possibilidade de alterar suas propriedades físico-químicas, como solubilidade, propriedades anfífilas, ligação ao óleo e à água. No que diz respeito à microencapsulação, a modificação das cadeias proteicas permite a obtenção de micropartículas com novas propriedades, diferentes das produzidas com outros materiais de parede (OSAMEDE AIROUYUWA, KAEWMANEE, *et al.*, 2019, SILVA-VÁZQUEZ, ARANA-SÁNCHEZ, *et al.*, 2013).

Dentre os métodos de encapsulação utilizados, a coacervação complexa ocorre através da formação de uma emulsão de dois materiais de natureza química distinta que interagem entre si formando coacervados através interações que ocasionam sua precipitação em faixas específicas de pH. Os complexos se concentram em gotículas coacervadas que irão sedimentar e coalescer para formar uma fase separada. A fase de coacervados exibe propriedades específicas que a distingue da solução original. Neste caso devido sua formação ocorrer por alterações no pH as microcápsulas podem permanecer estáveis por mais tempo (de acordo com o material) ocasionando uma liberação mais lenta do agente ativo (DE KRUIF, WEINBRECK, *et al.*, 2004, LOURENÇO, FRAQUEZA, *et al.*, 2020, PATEL, GOYAL, 2015).

Em meio às possibilidades de aplicação de óleos essenciais microencapsulados, ainda se faz necessário uma melhor compreensão de sua ação em matrizes alimentícias. Neste contexto este trabalho tem como foco a avaliação do processo de microencapsulação de óleos essenciais por coacervação complexa utilizando como agente encapsulante diferentes proteínas não convencionais e a avaliação do efeito antimicrobiano sobre *Listeria monocytogenes* e *Weissella viridescens*. Além disso, foi avaliado a aplicação das microcápsulas em uma matriz alimentícia tendo como modelo a linguiças frescal.

A escolha da linguiça frescal levou em consideração os fatores ocasionados por ambos os microrganismos em produtos cárneos. Classificadas como embutidos, as linguiças frescas passam por uma série de etapas de manipulação, as quais aumentam as chances de contaminações por diversos microrganismos. Em função da presença destes microrganismos,

linguiças frescas podem constituir sério risco a saúde pública, causando toxinfecções alimentares (AMAGLIANI, GIAMMARINI, *et al.*, 2007, MARQUES, BOARI, *et al.*, 2006, ZARRINGHALAMI, SAHARI, *et al.*, 2009). Neste contexto, este trabalho tem como objetivo o desenvolvimento e caracterização de microcápsulas por meio da técnica de coacervação complexa com diferentes materiais encapsulantes (Proteína de soja, Proteína de ervilha e Isolado de soro de leite / Goma arábica) contendo blenda de óleos essenciais (orégano, tomilho e cravo) e avaliar sua ação antimicrobiana *in vitro* e aplicada em linguiça fresca.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Óleos essenciais

Nos últimos anos plantas medicinais, condimentares e aromáticas e tem sido objeto de várias pesquisas. Óleos essenciais (EOS) são líquidos oleosos aromáticos obtidos a partir de material vegetal como flores, brotos, sementes, folhas e galhos. Há mais de 3000 espécies vegetais das quais se pode obter óleos essenciais. Cerca de 300 óleos são comercializados e destinados principalmente para o mercado de aromas e fragrâncias. Além de seu uso como flavorizante, muitos estudos já comprovam suas propriedades antimicrobianas, antioxidantes e antivirais (GRACIA-VALENZUELA, OROZCO-MEDINA, *et al.*, 2012).

A crescente demanda pelo consumo de alimentos mais saudáveis e com um apelo natural gerou uma renovação do interesse científico e pesquisas relacionadas aos óleos essenciais. Essa tendência por saudabilidade, abrange a redução da utilização de aditivos alimentares convencionais, entretanto, são necessários estudos com o foco de substituição dos conservantes sintéticos que garantem a conservação e a segurança alimentar por conservantes naturais como os óleos essenciais (CALO, CRANDALL, *et al.*, 2015).

Muitos óleos essenciais provavelmente evoluíram nas plantas como parte de defesa a ataques naturais de predadores e microrganismos. Sua atividade antimicrobiana está diretamente correlacionada com a presença dos seus componentes bioativos. A composição dos óleos essenciais é complexa, podendo possuir até 60-80 componentes químicos diferentes. Quimicamente são formados por estruturas de terpenos, sesquiterpenos, fenólicos, fenilpropanóicos, alifáticos não terpenos, heterocíclicos; e funções químicas de álcoois, cetonas, aldeídos, ácidos carboxílicos, ésteres, óxidos, acetatos e essa complexidade sinérgica é que promove seus efeitos antimicrobianos e antioxidantes. A composição dos óleos essenciais de qualquer planta em particular é dependente da hora da colheita e insolação, das condições de crescimento como ambiente e clima e de qual parte da planta é usada: flores, folhas e hastes, cascas, madeira, frutas inteiras, semente ou raízes (MÜLLER, BUCHBAUER, 2011).

O efeito antimicrobiano dos óleos essenciais vem sendo testado contra uma grande variedade de microrganismos ao longo dos anos, mas seus mecanismos de ação ainda não são completamente compreendidos. Os óleos essenciais possuem formação complexa através de seus vários componentes e sua atividade antimicrobiana não pode ser confirmada com base

apenas na ação de um composto. No entanto a predominância de 2 ou mais compostos majoritários definem a funcionalidade de cada óleo e suas possíveis aplicações. Vários estudos afirmam que a capacidade antimicrobiana de um óleo se deve ao fato do mesmo penetrar através de membranas bacterianas para o interior da célula, mas sua natureza fenólica também provoca resposta antimicrobiana contra diversos microrganismos, ocorrendo mudanças na permeabilidade da membrana celular e interferindo nos mecanismos fisiológicos do microrganismo (BENKEBLIA, 2004, MA, LUO, *et al.*, 2015).

Diversos estudos na literatura relataram as ações antimicrobianas dos óleos essenciais. Baratta et al.(1998) avaliaram o potencial antimicrobiano de diversos óleos essenciais (*Cananga odorata*, *Boswellia thurifera*, *Cymbopogon citratus*, *Marjorana hortensis*, *Ocimum basilicum*, *Rosmarinus officinalis*, *Cinnamomum zeylanicum* e *Citrus limon*) em diferentes fungos e bactérias. Os óleos apresentaram consideráveis efeitos inibitórios contra todos os microrganismos testados. Nos estudos de Hsouna et al.(2011), o perfil fitoquímico do óleo essencial de *Ceratonia siliqua* foi avaliado, sendo detectados 25 diferentes componentes. O óleo apresentou atividade antimicrobiana de moderada a forte contra 13 bactérias e 8 estirpes de fungos. Além disso foi verificado um efeito satisfatório de sua ação contra patógenos alimentares como a *Listeria monocytogenes* inoculada em carne bovina picada e armazenada a 7 °C por 10 dias. Yemiş & Candoğan(2017), avaliaram os efeitos inibitórios de filmes de proteína de soja incorporados com óleos essenciais de tomilho e orégano contra *Escherichia coli* O157: H7, *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus in vitro* e em carne fresca durante armazenamento refrigerado a 7°C por 14 dias. Efeitos inibitórios foram observados a partir de 3% v/v de óleos essenciais. Este estudo demonstrou a eficácia do uso de óleos essenciais como agente conservante em produtos cárneos.

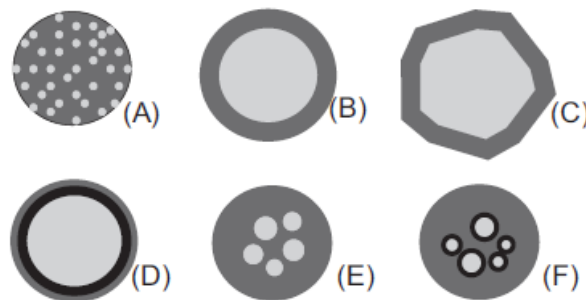
2.2 Microencapsulação

A tecnologia associada a modificação da liberação de princípios ativos (aromas, corantes, fármacos) é ampla, dentre elas há os processos de microencapsulação. A microencapsulação é um processo complexo que permite incorporar, a um material, novas propriedades funcionais como liberação controlada ou gradativa de determinado aditivo e mascarar aromas através de um revestimento que age como barreira a fatores externos. O material encapsulado pode ser um líquido ou um sólido chamado de núcleo ou de agente ativo, e o material encapsulante chamado de material de parede ou matriz geralmente é um

polissacarídeo, proteína, goma ou uma combinação de biopolímeros. Os materiais encapsulantes ou de parede mais utilizados na área alimentícia são polímeros como carboidratos, celulose e derivados, lipídeos, proteínas e alguns materiais inorgânicos (BAKRY, ABBAS, *et al.*, 2016).

As partículas podem ser classificadas por tamanho em 3 tipos: macro ($> 5000 \mu\text{m}$), micro ($0,2 - 5000 \mu\text{m}$) e nano ($< 0,2 \mu\text{m}$). Quanto à morfologia, as micropartículas obtidas por microencapsulação podem ser classificadas por dois tipos diferentes: microcápsulas e microesferas (JYOTHI SRI, SEETHADEVI, *et al.*, 2012, TIMILSENA, WANG, *et al.*, 2017). Na microesfera, (Figura 1- A) classificado como sistema matricial, o material presente no núcleo; encontra-se disperso pela matriz e pequena fração do agente ativo pode ficar exposta as condições externas. Na microcápsula (Figura 1- B-F) classificado como sistema tipo reservatório, o núcleo é concentrado na região central, circundado pelo material de parede formando uma camada protetora e podem ainda apresentar núcleos múltiplos. O termo “microencapsulação” é utilizado tanto para microcápsulas quanto para microesferas. Na figura 1 é apresentado alguns modelos de microcápsulas (UMER, NIGAM, *et al.*, 2011).

Figura 1- Modelos de micropartículas. (A) matriz (microesfera); (B) microcápsula simples; (C) simples, irregular; (D) duas paredes; (E) vários núcleos; (F) agrupamento de microcápsulas.



Fonte: Gibbs et al. (1999).

Os primeiros registros da utilização de técnicas de encapsulações são datados de 1930. Na área alimentícia os estudos se iniciaram a partir da década de 60 no Instituto de Pesquisa Southwest, Estados Unidos, com a microencapsulação de óleos essenciais para prevenir a perda de aroma. Ao longo do tempo esta tecnologia foi sendo explorada para microencapsulação de corantes, temperos, acidulantes, vitaminas e minerais (LUZZI, 1970).

Huq *et al.*, (2015) em seus estudos com óleo essencial de orégano (*Origanum compactum*; $250\mu\text{g} / \text{ml}$), óleo essencial de canela (*Cinnamomum cassia*; $250\mu\text{g} / \text{ml}$) e nisina

(16µg / ml) foram usados isoladamente ou em combinação para avaliar sua eficiência para inibir o crescimento de *Listeria monocytogenes* em presunto. A microencapsulação das formulações antimicrobianas foi realizada para verificar o potencial efeito do polímero em proteger a eficiência antimicrobiana durante o armazenamento. A microencapsulação dos óleos essenciais e tratamento com irradiação γ em combinação mostrou efeito antimicrobiano sinérgico durante o armazenamento em produtos de carne. Neste caso foi comprovado que a microencapsulação potencializou os efeitos da irradiação em combinação com os óleos. Rutz et al.(2017) estudaram a combinação de métodos de microencapsulação e secagem a fim de garantir melhorias no processo. Os autores utilizaram óleo de palmeira microencapsulado, contendo alto teor de carotenóides, em combinação com materiais encapsulantes como quitosana /goma xantana e quitosana / pectina, utilizando o método complexo de coacervação, seguido de atomização e liofilização. As micropartículas atomizadas apresentaram forma esférica e tamanho irregular, e as micropartículas liofilizadas, forma e tamanho irregulares. A liofilização resultou em menores perdas de carotenoides e maior rendimento e eficiência de encapsulação. Além disso, o perfil de liberação na água e no fluido gastrointestinal foi satisfatório

Os custos de produção fazem com que técnicas de microencapsulação seja vista com receio pelo setor alimentício, sendo necessário maiores estudos para minimizar este fator. Do ponto de vista tecnológico, um sistema ideal de microencapsulação de componentes ativos deve se beneficiar de:

- **Ingredientes alimentares:** o sistema de administração deve ser formulado com ingredientes de qualidade alimentar, possivelmente todos naturais. Em particular, um grande desafio é adição de alguns dos polímeros e surfactantes utilizados na indústria mantendo boas condições de solubilidade/ homogeneização e condições de estabilidade.
- **Incorporação de alimentos:** o sistema de entrega deve ser capaz de incorporar os compostos bioativos nas matrizes alimentares com elevada estabilidade físico-química e impacto mínimo nas propriedades sensoriais do produto.
- **Proteção contra degradação:** o sistema de entrega deve ser capaz de proteger os compostos bioativos encapsulados da interação com outros ingredientes alimentares, bem como da degradação devido à temperatura, luz, pH, durante a fabricação dos alimentos e no armazenamento,
- **Captação e biodisponibilidade:** o sistema de distribuição deve maximizar a absorção dos compostos encapsulados após o consumo e seu transporte para os locais de ação. Além do mais, é desejável liberação controlada em resposta a estímulos ambientais específicos

- Reprodução em escala industrial: a fabricação dos sistemas de entrega deve ser facilmente escalável para a produção industrial (SESSA, 2011).

Há inúmeras técnicas de encapsulação de um agente ativo, e são utilizadas de acordo com o tipo de matriz e com o ambiente a ser aplicado. A combinação entre o agente encapsulante e o encapsulado pode ser física, química ou físico-química.

São métodos físicos o *spray drying*, o qual consiste na secagem de gotículas líquidas contracorrente de ar quente, *spray cooling* feita por solidificação de gotículas líquidas por resfriamento e extrusão que é o modelamento de microesferas por forças mecânicas. Dentre os métodos químicos, destacam-se a inclusão molecular onde ocorre a encapsulação de certas moléculas por outras e a polimerização interfacial onde há reação de polimerização no limite entre duas soluções, uma delas com o material ativo em suspensão. Entre os métodos físico-químicos há o envolvimento lipossômico onde ocorre a encapsulação por membranas lipídicas e o método de coacervação (simples e complexa) (BAKRY, ABBAS, *et al.*, 2016, JAMEKHORSHID, SADRAMELI, *et al.*, 2014, MORTAZAVIAN, RAZAVI, *et al.*, 2007).

2.2.1 Coacervação

A coacervação é um fenômeno físico-químico entre biopolímeros onde ocorre uma separação de duas fases líquidas em sistemas coloidais. Em condições ideais a fase mais concentrada é o coacervado e a outra fase é a solução de equilíbrio. (YAN, ZHANG, 2014).

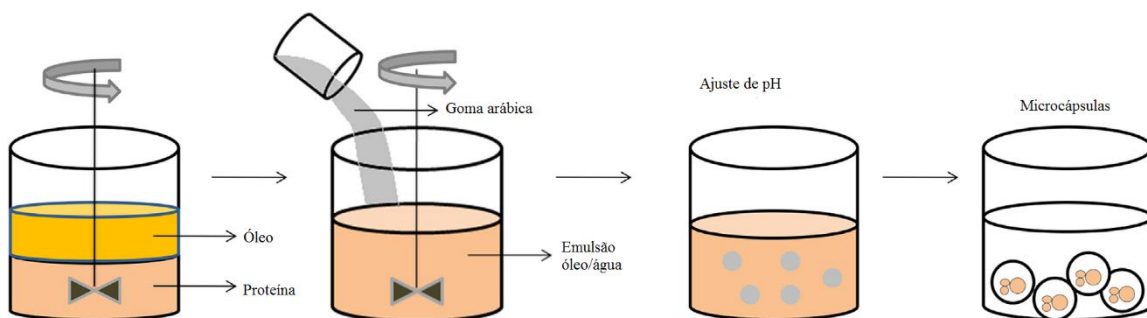
Dentre os métodos de microencapsulação, a criação de cápsulas proteicas de tamanhos específicos também pode ser alcançada pela separação de fases em solução em vez de emulsificação. Sistemas coloidais, incluindo soluções poliméricas, têm propensão a sofrer coacervação. Neste caso uma solução composta de uma fase homogênea (biopolímeros mais agente ativo) se separa em duas fases líquidas onde uma das quais é o solvente essencialmente puro e o outro contém o soluto. Este contexto é baseado na diminuição da solubilidade do biopolímero, induzindo o mesmo a precipitação ou a formação de microcápsulas contendo o agente ativo. A fim de melhorar a estabilidade das cápsulas formadas através da coacervação, em alguns casos, para proteínas instáveis, um agente de reticulação é usado antes da adição do polímero incompatível (SHIMAbNOVICH *et al.*, 2014).

Os biopolímeros mais utilizados nos processos de coacervação são aqueles que possuem boa solubilidade em meio aquoso, densidades de cargas adequadas como a gelatina, alginato, albumina, caseína, ágar, gomas e pectinas. Entretanto atualmente a utilização de proteínas

vegetais tem crescido nos últimos anos. É comum complexos de biopolímeros serem termodinamicamente instáveis, resultando na separação de fases das misturas homogêneas em duas fases distintas e quimicamente incompatíveis. Dependendo do tipo de biopolímero utilizado e sua constituição física, o processo de separação pode ser feito de duas formas diferentes: segregativa e associativa. Na forma segregativa a separação ocorre quando há interação repulsiva entre os biopolímeros, e o sistema é dividido em duas fases com uma delas enriquecida com um tipo de biopolímero (TOLSTOGUZOV, 1991). Na forma associativa, a interação é naturalmente atrativa, o sistema demonstra uma região clara de duas fases onde os biopolímeros permanecem ligados e concentrados de forma seletiva, deixando um diluente sobrenadante pobre em polímero no topo (PATHAK, PRIYADARSHINI, *et al.*, 2017).

Dois tipos de coacervação são observadas: coacervação simples e coacervação complexa. Na coacervação simples, a separação de fases é induzida pela adição de incompatibilidade, e solventes parcialmente solúveis como acetona e álcoois na solução polimérica aquosa, enquanto a coacervação complexa é causada por interações associativas entre dois biopolímeros carregados com cargas opostas. Uma das vantagens da coacervação complexa é sua capacidade de sustentar altas concentrações de material de parede (DE KRUIF, WEINBRECK, *et al.*, 2004, THIES, 2007).

Figura 2. Processo de coacervação complexa com o uso de goma arábica e uma proteína.



Fonte: Comunian et al. (2016).

A coacervação complexa (Figura 2) ocorre quando dois ou mais biopolímeros com cargas opostas são misturados em um solvente onde eles interagem, e se precipitam coexistindo com o sobrenadante que é uma fase pobre em polímero. Os primeiros estudos foram efetuados com gelatina e goma arábica (MADAN, 1978, MENG, CLOUTIER, 2014). A interação dos biopolímeros é dependente da natureza eletrostática, densidade de carga molecular, pH e força

iônica. Outro fator determinante é a proporção de mistura dos dois polímeros porque a interação eletrostática depende da concentração de mistura ou das regiões ativas disponíveis nos biopolímeros. Por exemplo, sob altas concentrações de sal, as macromoléculas possuem baixa carga superficial e, portanto, ocorre fraca coacervação complexa (JAMEKHORSHID, SADRAMELI, *et al.*, 2014).

Ao misturar um par de polímeros de cargas opostas, há formação de um complexo eletrostático e esses complexos podem ser "solúveis" ou "insolúveis". Os complexos "insolúveis" se precipitam formando os coacervados, ainda ocorrendo um fenômeno chamado de amadurecimento de Ostwald. Esse processo descreve a tendência de as partículas menores se fundirem umas às outras até que uma partícula grande seja formada, resultando na formação de uma camada distinta de coacervação. Como consequência há uma fase superconcentrada, enquanto a outra fase contém uma solução muito diluída dos biopolímeros (PRIFTIS, LAUGEL, *et al.*, 2012).

2.2.2 Materiais encapsulantes

2.2.2.1 Goma arábica

A goma arábica é um polímero altamente solúvel em água, extraído de árvores da família das acácias, *Acacia Senegal* e *Acacia seyal*, e é encontrado em países árabes, como Sudão e países africanos. É um material composto de duas frações, cadeia de polissacarídeos, correspondente a uma maior parte da sua estrutura (D-galactose, L-arabinose, L-ramnose, ácido D-glucurônico) e outra fração composta por teores de proteína, o que corresponde a cerca de 2% da massa total. A fração protéica da goma arábica também apresenta carga, no entanto, devido à sua pequena proporção, essa mudança de carga é desprezível em relação a carga total da goma arábica. Sua estrutura é altamente ramificada e as unidades de ácido urônico ocorrem com mais frequência, tendo caráter ácido e sendo responsável pela parte hidrofílica do polímero, enquanto a estrutura protéica é responsável pela parte hidrofóbica da goma arábica. Possuindo, portanto, caráter anfifílico, a goma arábica pode atuar como emulsionante (BUTSTRAEN, SALAÛN, 2014, XIAO, LIU, *et al.*, 2014).

Na indústria de alimentos, a goma arábica é amplamente utilizada como estabilizante, emulsionante e espessante, e atua como agente fixador de sabor. Além disso, é um material muito utilizado nos processos de encapsulação com o uso em diferentes combinações de

materiais de parede. A goma arábica é carregada negativamente, por isso é muito útil para o encapsulamento de agentes hidrofóbicos uma vez que possui capacidade emulsionante. Por formar soluções de baixa viscosidade em alta concentração, sua utilização facilita o processo em diversas técnicas de microencapsulação. (MCNAMEE, O'RIORDAN, *et al.*, 1998).

Sendo um dos principais materiais utilizados na área de microencapsulação, há diversos trabalhos encontrados na literatura. Li et al.(2013) investigou a melhoria da atividade antibacteriana de óleo moxa (*Artemisia vulgaris*) em microcápsulas de gelatina- goma arábica. Neste estudo, o óleo essencial de moxa foi encapsulado nas microcápsulas usando a técnica de coacervação complexa para melhorar a capacidade antibacteriana do óleo de moxa. Foram investigadas as propriedades físicas, incluindo a morfologia da superfície, o tamanho de partícula, o carregamento do fármaco, bem como o perfil de liberação e a atividade antimicrobiana das microcápsulas em *Staphylococcus aureus*. Os resultados mostraram que as microcápsulas contendo o óleo de moxa apresentava aparência relativamente esférica. O óleo de moxa demonstrou ser gradualmente liberado das microcápsulas. O estudo antibacteriano revelou que a inserção do óleo nas microcápsulas gerou maior inibição do crescimento de *Staphylococcus aureus*. Nos estudos de García-Saldaña et al., (2016) foi avaliado a microencapsulação de sulforafano a partir de extratos de semente de brócolis por complexos de gelatina / goma arábica e gelatina / pectina. O uso de polímeros de qualidade alimentar para microencapsulação de sulforafano foi estudado por um método de coacervação complexo utilizando a interação de polímeros carregados de forma oposta como gelatina / goma arábica e gelatina / pectina. A eficiência de encapsulação foi superior a 80%. Os materiais utilizados neste trabalho se mostraram eficientes na proteção do sulforafano.

2.2.2.2 Proteína de soja

As proteínas de origem vegetal estão entre os principais biopolímeros encontrados na natureza. Dentre estas, a proteína de soja tem a vantagem de ser economicamente competitiva, biodegradável, além do Brasil ser um dos maiores exportadores de soja do mundo o que facilita sua disponibilidade no mercado (EMBRAPA, 2013, SINGH, KUMAR, *et al.*, 2008).

A soja é um produto amplamente cultivado em todo mundo, contém, em média, cerca de 40% de proteína e 20% de óleo em base seca. De acordo com Comunian; Favaro-Trindade, 2016, o isolado de proteína de soja usado em alimentos para seres humanos é obtido a partir de farinha de soja desengordurada, que contém cerca de 50% de proteína em uma base seca.

Destaca-se por ser um subproduto na produção de óleo de soja, abundante, barato e renovável. Possui propriedades emulsificantes além de ter excelentes qualidades nutricionais. Isso permite sua incorporação em produtos alimentares além de possuírem propriedades semelhantes a algumas proteínas animais. A proteína de soja é composta de 9 aminoácidos essenciais (Lisina/metionina/cistina/triptofano/tronina/ isoleucina / leucina /fenilalanina/valina) e proporciona muitos benefícios funcionais. Possui ainda a ação de promover a retenção de umidade e sabor de alimentos, também melhorar a textura de muitos alimentos de uma variedade de carnes, sobremesas congeladas e até mesmo queijo (SINGH, KUMAR, *et al.*, 2008). O isolado de proteína de soja, por ser uma proteína de baixo custo e com ampla disponibilidade, está sendo muito explorada como material de parede em processos de encapsulação. No trabalho de Jun-Xia; Hai-Yan; Jian (2011) foi avaliado a microencapsulação de óleo de laranja pelo método de coacervação complexa utilizando proteína de soja e goma arábica. A proteína de soja foi exposta ao ultrassom para aumentar a solubilidade antes do uso e as microcápsulas foram secas pelo método spray-drying. Verificou-se que o pH ideal (4,0) para a coacervação proteína de soja/goma arábica. As microcápsulas geradas foram esféricas sem fissuras na superfície e os componentes de sabor foram bem conservados em microcápsulas de acordo com a análises posteriores, indicando efetividade em relação a proteção para o material do núcleo. Em pesquisas feitas por Liu; Chen; Tang, 2014 foram avaliados a microencapsulação de óleos com diversas proteínas de leguminosas do gênero *Phaseolus* em comparação a proteína de soja. As microcápsulas foram armazenadas a 75% de umidade relativa por 7 dias. Os resultados de armazenamento indicaram que as propriedades de microencapsulação dos três isolados de proteínas eram consideravelmente inferiores do que a proteína de soja.

2.2.2.3 Proteína de ervilha

As sementes de leguminosas são cada vez mais utilizadas em aplicações alimentícias, porque elas são menos alergênicas que as proteínas animais e apresentam propriedades funcionais interessantes, como emulsificação, solubilidade e formação de filmes. Além disso o uso de proteínas vegetais como materiais de parede tem sido preferido em relação a proteínas derivadas de animais, como reflexo da tendência atual ao veganismo. Materiais de parede derivados de plantas estão emergindo devido à sua produção mais sustentável e ao recente aumento das preocupações dos consumidores em relação às suas dietas, cuidado com os animais

relacionados as condições de reprodução e abate (GONZÁLEZ-PÉREZ, ARELLANO, 2009).

No caso da ervilha, a presença de proteínas de alta qualidade também acrescenta valor nutricional como aditivo alimentar. As proteínas de ervilha representam 20 a 30% da fração total de sementes de ervilha, que inclui principalmente globulinas (65-80%) e frações menores de albuminas e glutelinas. Essas proteínas podem ser usadas como ingrediente funcional, já que provaram reduzir o risco de doenças cardiovasculares e pressão arterial, além de conter peptídeos bioativos que atuam como agente antioxidante (XIAO, LIU, *et al.*, 2014). As proteínas das ervilhas podem ser facilmente incorporadas em outros produtos alimentares devido às suas propriedades funcionais únicas, que incluem propriedades de formação de emulsão, espuma, gelificação, retenção de água e absorção de gordura. Os aminoácidos polares e não polares presentes na superfície das proteínas são responsáveis por suas propriedades funcionais (COMUNIAN, FAVARO-TRINDADE, 2016, COSTA, NUNES, *et al.*, 2015).

Dentre as aplicações estudadas Klemmer et al.(2011) produziram com sucesso cápsulas à base de proteína de ervilha para entrega probiótica e prebiótica. Liu et al.(2010), estudaram as interações intermoleculares entre goma arábica e proteína de ervilha. A natureza das interações intermoleculares durante a complexação entre isolados de proteína de ervilha e goma arábica foi investigada em função do pH (4,30-2,40), por análise turbidimétrica e microscopia de varredura confocal na presença de agentes desestabilizantes em diferentes temperaturas (6-60 °C). Houve a formação de complexos solúveis e insolúveis, envolvendo interações entre agregados. A formação complexa foi conduzida por forças atrativas eletrostáticas entre biopolímeros carregados com estabilização secundária por ligação de hidrogênio. Verificou-se que as interações hidrofóbicas aumentaram a estabilidade do complexo a um pH menor em torno de 3,10, mas não houve influência no rendimento.

2.2.2.4 Isolado proteico de soro

O soro de leite é um coproduto da produção de queijo, rico em proteínas (β -lactoglobulina, α -lactoglobulina, imunoglobulina e albumina de soro) e está sendo amplamente utilizado pela indústria de alimentos devido às suas propriedades nutricionais e funcionais. As proteínas do soro (β -lactoglobulina e α -lactoglobulina) têm carga negativa em pH de 6,8 como encontrado no leite fresco, tornando-se potencial material de parede em processos de encapsulação. Além disso, essas proteínas proporcionam baixas viscosidades ao meio, mesmo quando presentes em altas concentrações. (CHEN, Bingcan, DING, *et al.*, 2017, FERNANDES,

GUIMARÃES, *et al.*, 2017, HA, ZEMEL, 2003).

Alguns autores relatam na literatura as propriedades e usos da proteína de soro de leite. Em seus estudos Weinbreck et al.(2004) avaliaram a difusividade de microcápsulas de proteína de soro e goma arábica. Os resultados mostraram que a difusão da proteína de soro e goma arábica dentro do processo de coacervação foi reduzida em comparação com uma mistura de biopolímero diluído. Supõe-se que a difusão seja reduzida por causa de uma maior interação eletrostática entre os biopolímeros. Wang et al.(2016) estudou a encapsulação de óleo de peixe tendo como material de parede proteína de soro, mostrando que, quando encapsulados, os compostos ativos foram mais protegidos contra a oxidação.

2.2.3 Microencapsulação de óleos essenciais em alimentos

Atualmente óleos essenciais tem sido foco de inúmeras pesquisas devido suas propriedades antimicrobianas, antioxidantes, dentre outras. No entanto, apesar de várias tentativas para aproveitar todo o potencial desses óleos, alguns compostos podem ser quimicamente instáveis e suscetíveis a volatilização, especialmente quando expostos ao oxigênio, luz, umidade e altas temperaturas. No que tange a aplicação em alimentos essas mudanças podem gerar um efeito negativo na vida útil, propriedades sensoriais e aceitabilidade geral dos produtos. Além de auxiliar na proteção dos compostos bioativos a microencapsulação pode ocasionar uma difusão gradual do material de núcleo nas paredes tendo em muitos casos uma liberação mais lenta(YAN, ZHANG, 2014).

Devido a característica hidrofóbica da composição majoritária dos óleos essenciais podem ocorrer interações com compostos orgânicos das matrizes alimentícias diminuindo e encurtando a eficácia dos óleos essenciais. A estabilidade e volatilização desses óleos encapsulados tem sido explorado na literatura (BAKRY, ABBAS, *et al.*, 2016, SILVA-VÁZQUEZ, ARANA-SÁNCHEZ, *et al.*, 2013).

A microencapsulação em alimentos abrange uma área extensa que vai desde o cultivo e colheita à alimentos com alto grau de processamento. Fungicidas e pesticidas são muito utilizados a fim de controlar as perdas na produção agrícola. No entanto, além do desenvolvimento de resistência aos fungicidas pelos patógenos, a aplicação dos mesmos podem ocasionar impactos negativos ao meio ambiente e a saúde humana (BAKRY, ABBAS, *et al.*, 2016). Neste cenário a utilização de óleos essenciais microencapsulados com propriedades repelentes e fungicidas tem apresentado impactos positivos na agricultura. Estudos realizados

por Kupaei e Garmakhany (2014) demonstraram que o tratamento pós-colheita com óleos essenciais encapsulados de *Rosmarinu officinalise Thymus vulgaris* geraram um prolongamento da vida útil e a qualidade interna de mangas maduras. Óleos essenciais microencapsulados podem ser aplicados em frutas como inseticidas naturais. Chung *et al.* (2013) comprovou a ação inseticida de óleo essencial de tomilho microencapsulado como repelente de insetos. Nos estudos de Fernandes *et al.*(2017) foi avaliado a aplicação de óleo essencial de alecrim microencapsulado com proteína isolada de soro de leite e inulina em queijo Minas frescal. O processo de microencapsulação não alterou a composição química do óleo essencial de alecrim. As micropartículas foram eficazes no controle da acidez do queijo, além de promover uma redução na contagem microbiana. A demanda atual do mercado aponta para a necessidade da realização de pesquisas focadas na compreensão dos mecanismos que ocorrem na aplicação dos materiais microencapsulados em alimentos, mascarar sabores estranhos, melhorar as propriedades nutricionais, comprovar ações antioxidantes e antimicrobianas.

2.2.4 Linguiças frescas

A linguiça é definida como produto cárneo industrializado, obtido de carnes de animais, adicionados ou não de tecidos adiposos, ingredientes, embutido em envoltório natural ou artificial, e submetido ao processo tecnológico. Pode ser cozido e não cozido, curado, maturado e dessecado. Sua produção requer uma série de etapas de manipulação, o que aumenta as chances de contaminação por grande variedade de espécies de microrganismos, patogênicos ou deterioradores, e reduz a qualidade microbiológica do produto (MAPA, 2000; MARQUES *et al.*, 2006). Em produtos cárneos pode ocorrer o crescimento de microrganismos patogênicos e deteriorantes como *Clostridium botulinum*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Salmonella spp.*, *Weissella viridescens*, etc. Dentre os microrganismos avaliados neste trabalho estão *Listeria monocytogenes* e *Weissella viridescens*.

Listeria monocytogenes pertence ao gênero *Listeria*, composto por seis espécies. Podem ser encontradas em diversos alimentos. Sua veiculação em alimentos pode ocasionar listeriose, uma infecção grave, ocasionando encefalites, septicemias, meningites e abortos. Pode apresentar resistência a ingredientes de cura como cloreto de sódio, sais de nitrito; entre outros. Já foi isolada de vários produtos cárneos dentre embutidos, patês e fiambres (LUNGU, O'BRYAN, *et al.*, 2011, NESBAKKEN, KAPPERUD, *et al.*, 1996). *Weissella viridescens* faz parte do gênero de bactérias gram-positivas, colocados dentro da família *Leuconostocaceae*.

Estão entre os principais microrganismos deterioradores de alimentos, sendo bastante conhecida por causar deterioração na superfície de carnes e produtos cárneos embalados a vácuo e em diferentes condições de armazenamento, mesmo em condições de refrigeração (BJÖRKROTH, DICKS, *et al.*, 2014, DUŠKOVÁ, KAMENÍK, *et al.*, 2013). Sendo *Weissella viridescens* a espécie mais importante dentro do gênero na indústria de carnes, estando normalmente associado à deterioração de produtos cárneos. *Weissella viridescens* pode ocasionar a formação de limo ou esverdeamento da carne (PATTERSON, MCKAY, *et al.*, 2010).

Linguças frescas são excelentes substratos para o crescimento desses microrganismos devido ao pH pouco ácido, alta atividade de água e de grandes manipulações no processo. Apesar das melhorias de higiene na produção de alimentos, a segurança alimentar é fator agravante em relação a saúde pública. No Brasil entre 2007 a 2017, 99.826 mil pessoas foram acometidas por alguma doença veiculada por alimentos. Deve-se ainda considerar que muitos casos não são notificados e não fazem parte das estatísticas (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017).

Deve-se ainda levar em consideração a adição dos conservantes a fim de inibir o crescimento de microrganismos patogênicos e deteriorantes como a utilização de sais de cura (nitratos de sódio e potássio). Estes conservantes além de apresentarem ações antimicrobianas, contribuem com o sabor e desenvolvimento da cor dos produtos cárneos. Entretanto, a utilização de sais de nitrito pode levar à formação de nitrosaminas, que tem efeito carcinogênico ao organismo humano, sendo necessário a busca por aditivos naturais que não causem efeitos negativos ao consumo (ABEE, KROCKEL E HILL, 1995). Além disso, a utilização contínua desses conservantes sintéticos aumenta a probabilidade de seleção de microrganismos resistentes (FRIEDMAN, 2015, RILEY, WERTZ, 2002). Os níveis de nitrato e nitrito em alimentos são objeto de regulamentação. Em produtos cárneos, a Organização Mundial da Saúde e os Ministérios da Saúde e da Agricultura permitem um limite máximo de 200 mg/kg para nitrito (ANVISA, 1998).

Há estudos na literatura referentes a utilização de óleos essenciais e conservantes naturais em embutidos cárneos contra a proliferação de microrganismos. Silveira et al.(2014) avaliaram a aplicação de óleo essencial de louro em linguça toscana para controle de patógenos. As linguças foram armazenadas a 7 °C por 14 dias e foi observado um prolongamento da vida útil por dois dias. Baldin et al.(2016) microencapsularam extrato de jabuticaba com maltodextrina e aplicaram em salsichas. Os autores avaliaram a qualidade microbiológica e impactos sensoriais durante 15 dias em armazenamento refrigerado. Foram obtidos resultados

satisfatórios nos aspectos microbiológicos em relação a diminuição do crescimento microbiano e sensoriais com uma adição de 2% de pigmento.

3 REFERÊNCIAS

AMAGLIANI, G., GIAMMARINI, C., OMICCIOLI, E., *et al.* "Detection of *Listeria monocytogenes* using a commercial PCR kit and different DNA extraction methods", **Food Control**, 2007. DOI: 10.1016/j.foodcont.2006.06.012.

ANVISA. **Portaria nº 1004, de 11 de dezembro de 1998.** . [S.l: s.n.]. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/33916/391619/Portaria%2Bn%25C2%25BA%2B1004%252C%2Bde%2B11%2Bde%2Bdezembro%2Bde%2B1998.pdf/41e1bc8f-b276-4022-9afb-ff0bb3c12c0c.> , 1998

APOLÓNIO, J., FALEIRO, M. L., MIGUEL, M. G., *et al.* "No induction of antimicrobial resistance in *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes* during continuous exposure to eugenol and citral", **FEMS Microbiology Letters**, v. 354, n. 2, p. 92–101, 2014. DOI: 10.1111/1574-6968.12440.

ARBOATTI, A. S., OLIVARES, M. L., SABBAG, N. G., *et al.* "The influence of sodium chloride reduction on physicochemical, biochemical, rheological and sensory characteristics of Mozzarella cheese", **Dairy Science and Technology**, v. 94, n. 4, p. 373–386, 2014. DOI: 10.1007/s13594-014-0169-2.

BAKKALI, F., AVERBECK, S., AVERBECK, D., *et al.* "Biological effects of essential oils - A review", **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 2, p. 446–475, 2008. DOI: 10.1016/j.fct.2007.09.106.

BAKRY, A. M., ABBAS, S., ALI, B., *et al.* "Microencapsulation of Oils: A Comprehensive Review of Benefits, Techniques, and Applications", **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 15, n. 1, p. 143–182, 2016. DOI: 10.1111/1541-4337.12179. .

BALDIN, J. C., MICHELIN, E. C., POLIZER, Y. J., *et al.* "Microencapsulated jabuticaba (*Myrciaria cauliflora*) extract added to fresh sausage as natural dye with antioxidant and antimicrobial activity", **Meat Science**, v. 118, p. 15–21, 2016. DOI: 10.1016/j.meatsci.2016.03.016.

BAPTISTA, R. C., HORITA, C. N., SANT'ANA, A. S. **Natural products with preservative properties for enhancing the microbiological safety and extending the shelf-life of seafood: A review.** **Food Research International**. [S.l: s.n.]. , 2020

BARAC, M. B., PEŠIĆ, M. B., STANOJEVIĆ, S. P., *et al.* "Techno-functional properties of pea (*Pisum sativum*) protein isolates-a review", **Acta Periodica Technologica**, v. 46, p. 1–18, 2015. DOI: 10.2298/APT1546001B.

BARATTA, M. T., DORMAN, H. J. D., DEANS, S. G., *et al.* "Antimicrobial and antioxidant properties of some commercial essential oils.", **Flavour and Fragrance Journal**, v. 13, p. 235–244, 1998. DOI: 10.1002/(SICI)1099-1026(1998070)13:4<235::AID-FFJ733>3.0.CO;2-T.

- BENKEBLIA, N. "Antimicrobial activity of essential oil extracts of various onions (*Allium cepa*) and garlic (*Allium sativum*)", **LWT - Food Science and Technology**, v. 37, n. 2, p. 263–268, 2004. DOI: 10.1016/j.lwt.2003.09.001. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0023643803001671>.
- BJÖRKROTH, J., DICKS, L. M. T., ENDO, A., "The genus *Weissella*". **Lactic Acid Bacteria: Biodiversity and Taxonomy**, [S.l: s.n.], 2014. . DOI: 10.1002/9781118652525.ch25.
- BLANCO-LIZARAZO, C. M., BETANCOURT-CORTÉS, R., LOMBANA, A., *et al.* "Listeria monocytogenes behaviour and quality attributes during sausage storage affected by sodium nitrite, sodium lactate and thyme essential oil", **Food Science and Technology International**, v. 23, n. 3, p. 277–288, 2017. DOI: 10.1177/1082013216686464.
- BORCH, E., KANT-MUERMANS, M. L., BLIXT, Y. "Bacterial spoilage of meat and cured meat products", **International Journal of Food Microbiology**, 1996. DOI: 10.1016/0168-1605(96)01135-X.
- BREWER, M. S. "Natural Antioxidants: Sources, Compounds, Mechanisms of Action, and Potential Applications", **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 10, n. 4, p. 221–247, 2011. DOI: 10.1111/j.1541-4337.2011.00156.x.
- BURT, S. "Essential oils: Their antibacterial properties and potential applications in foods - A review", **International Journal of Food Microbiology**, v. 94, n. 3, p. 223–253, 2004. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2004.03.022. .
- BUTSTRAEN, C., SALAÜN, F. "Preparation of microcapsules by complex coacervation of gum Arabic and chitosan", **Carbohydrate Polymers**, v. 99, p. 608–616, 2014. DOI: 10.1016/j.carbpol.2013.09.006. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.09.006>.
- CALDERÓN-OLIVER, M., ESCALONA-BUENDÍA, H. B., PONCE-ALQUICIRA, E. "Effect of the addition of microcapsules with avocado peel extract and nisin on the quality of ground beef", **Food Science and Nutrition**, v. 8, n. 3, p. 1325–1334, 2020. DOI: 10.1002/fsn3.1359. .
- CALO, J. R., CRANDALL, P. G., O'BRYAN, C. a., *et al.* "Essential oils as antimicrobials in food systems - A review", **Food Control**, v. 54, p. 111–119, 2015. DOI: 10.1016/j.foodcont.2014.12.040. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.12.040>.
- CHEN, B., DING, Y., XU, M., *et al.* "The influence of pH and enzyme cross-linking on protein delivery properties of WPI-beet pectin complexes", **Food Research International**, v. 105, p. 678–685, 2017. DOI: 10.1016/j.foodres.2017.11.076. .
- CHEN, H., ZHANG, Y., ZHONG, Q. "Physical and antimicrobial properties of spray-dried zein-casein nanocapsules with co-encapsulated eugenol and thymol", **Journal of Food Engineering**, v. 144, p. 93–102, 2014. DOI: 10.1016/j.jfoodeng.2014.07.021. .
- CHUNG, S. K., SEO, J. Y., LIM, J. H., *et al.* "Microencapsulation of essential oil for insect repellent in food packaging system", **Journal of Food Science**, 2013. DOI: 10.1111/1750-3841.12111. .

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard — Ninth Edition**. Wayne, [s.n.], 2003. v. 32.

COFRADES, S., SERRANO, A., AYO, J., *et al.* "Restructured beef with different proportions of walnut as affected by meat particle size", **European Food Research and Technology**, v. 218, n. 3, p. 230–236, 2004. DOI: 10.1007/s00217-003-0808-y. .

COMUNIAN, T. A., FAVARO-TRINDADE, C. S. "Microencapsulation using biopolymers as an alternative to produce food enhanced with phytosterols and omega-3 fatty acids: A review", **Food Hydrocolloids**, v. 61, p. 442–457, 2016. DOI: 10.1016/j.foodhyd.2016.06.003. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.06.003>.

COSTA, A. M. M., NUNES, J. C., LIMA, B. N. B., *et al.* "Effective stabilization of CLA by microencapsulation in pea protein", **Food Chemistry**, v. 168, p. 157–166, 2015. DOI: 10.1016/j.foodchem.2014.07.016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.07.016>.

DA SILVEIRA, S. M., LUCIANO, F. B., FRONZA, N., *et al.* "Chemical composition and antibacterial activity of *Laurus nobilis* essential oil towards foodborne pathogens and its application in fresh Tuscan sausage stored at 7°C", **LWT - Food Science and Technology**, v. 59, n. 1, p. 86–93, 2014. DOI: 10.1016/j.lwt.2014.05.032. .

DE KRUIF, C. G., WEINBRECK, F., DE VRIES, R. **Complex coacervation of proteins and anionic polysaccharides. Current Opinion in Colloid and Interface Science**. [S.l: s.n.], 2004

DUŠKOVÁ, M., KAMENÍK, J., KARPÍŠKOVÁ, R. "Weissella viridescens in meat products - A review", **Acta Veterinaria Brno**, v. 82, n. 3, p. 237–241, 2013. DOI: 10.2754/avb201382030237. .

EMBRAPA. **Tecnologias de Produção de Soja - Região Central do Brasil 2014**. [S.l: s.n.], 2013. Disponível em: http://www.cnpso.embrapa.br/download/publicacao/central_2005.pdf.

ESPITIA, P. J. P., AVENA-BUSTILLOS, R. J., DU, W. X., *et al.* "Physical and antibacterial properties of açaí edible films formulated with thyme essential oil and apple skin polyphenols", **Journal of Food Science**, v. 79, n. 5, 2014. DOI: 10.1111/1750-3841.12432. .

FERNANDES, R. V. de B., GUIMARÃES, I. C., FERREIRA, C. L. R., *et al.* "Microencapsulated Rosemary (*Rosmarinus officinalis*) Essential Oil as a Biopreservative in Minas Frescal Cheese", **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 41, n. 1, p. 1–9, 2017. DOI: 10.1111/jfpp.12759. .

FRIEDMAN, M. **Antibiotic-Resistant Bacteria: Prevalence in Food and Inactivation by Food-Compatible Compounds and Plant Extracts. Journal of Agricultural and Food Chemistry**. [S.l: s.n.], 2015

FUNG, F., WANG, H. S., MENON, S. **Food safety in the 21st century. Biomedical Journal**. [S.l: s.n.], 2018

GARCÍA-ESTEBAN, M., ANSORENA, D., GIMENO, O., *et al.* "Optimization of

instrumental colour analysis in dry-cured ham", **Meat Science**, v. 63, n. 3, p. 287–292, 2003. DOI: 10.1016/S0309-1740(02)00084-0. .

GARCÍA-GARCÍA, R., LÓPEZ-MALO, A., PALOU, E. "Bactericidal Action of Binary and Ternary Mixtures of Carvacrol, Thymol, and Eugenol against *Listeria innocua*", **Journal of Food Science**, v. 76, n. 2, p. 95–100, 2011. DOI: 10.1111/j.1750-3841.2010.02005.x. .

GARCÍA-SALDAÑA, J. S., CAMPAS-BAYPOLI, O. N., LÓPEZ-CERVANTES, J., *et al.* "Microencapsulation of sulforaphane from broccoli seed extracts by gelatin/gum Arabic and gelatin/pectin complexes", **Food Chemistry**, v. 201, p. 94–100, 2016. DOI: 10.1016/j.foodchem.2016.01.087. .

GLUSHKOV, O. A. "INFLUENCE OF NATURAL POLYSACCHARIDES ON QUALITY INDICATORS OF THE FROZEN SEMI-FINISHED PRODUCTS AT STORAGE", **JOURNAL OF FOOD SCIENCE AND TECHNOLOGY-UKRAINE**, 2016. DOI: 10.15673/fst.v10i3.182. .

GNANASAMBANDAM, R., HELTIARACHCHY, N. S. "Protein Concentrates from Unstabilized and Stabilized Rice Bran: Preparation and Properties", **Journal of Food Science**, v. 60, n. 5, p. 1066–1069, 1995. DOI: 10.1111/j.1365-2621.1995.tb06293.x. .

GONZÁLEZ-PÉREZ, S., ARELLANO, J. B., "Vegetable protein isolates". **Handbook of Hydrocolloids: Second Edition**, [S.l: s.n.], 2009. p. 383–419. DOI: 10.1533/9781845695873.383.

GRACIA-VALENZUELA, M. H., OROZCO-MEDINA, C., MOLINA-MALDONADO, C. "Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review", **Hidrobiologica**, v. 22, n. 3, p. 201–206, 2012. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2004.03.022. .

GUARDA, A., RUBILAR, J. F., MILTZ, J., *et al.* "The antimicrobial activity of microencapsulated thymol and carvacrol", **International Journal of Food Microbiology**, 2011. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2011.02.011. .

HA, E., ZEMEL, M. B. **Functional properties of whey, whey components, and essential amino acids: Mechanisms underlying health benefits for active people (Review)**. **Journal of Nutritional Biochemistry**. [S.l: s.n.], 2003

HSOUNA, A. Ben, TRIGUI, M., MANSOUR, R. Ben, *et al.* "Chemical composition, cytotoxicity effect and antimicrobial activity of *Ceratonia siliqua* essential oil with preservative effects against *Listeria* inoculated in minced beef meat", **International Journal of Food Microbiology**, v. 148, n. 1, p. 66–72, 2011. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2011.04.028. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.04.028>.

HUGHES, J. M., OISETH, S. K., PURSLOW, P. P., *et al.* "A structural approach to understanding the interactions between colour, water-holding capacity and tenderness", **MESC**, v. 98, n. 3, p. 520–532, 2014. DOI: 10.1016/j.meatsci.2014.05.022. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.meatsci.2014.05.022>.

HUQ, T., VU, K. D., RIEDL, B., *et al.* "Synergistic effect of gamma (γ)-irradiation and microencapsulated antimicrobials against *Listeria monocytogenes* on ready-to-eat (RTE) meat", **Food Microbiology**, v. 46, p. 507–514, 2015. DOI: 10.1016/j.fm.2014.09.013.

Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fm.2014.09.013>.

HUSSAIN, A., AHMED, T., KANTI, S., *et al.* "LISTERIA MONOCYTOGENES: OCORRÊNCIA EM PRODUTOS LÁCTEOS E SUAS IMPLICAÇÕES EM SAÚDE PÚBLICA", *Iranian Journal of Veterinary Research*, v. 78, n. 1, p. 155–168, 2011. DOI: 10.1590/1808-1657v78p1552011. .

HUSSAIN, M. A., SUMON, T. A., MAZUMDER, S. K., *et al.* **Essential oils and chitosan as alternatives to chemical preservatives for fish and fisheries products: A review.** *Food Control*. [S.l: s.n.]. , 2021

JAMEKHORSHID, A., SADRAMELI, S. M., FARID, M. **A review of microencapsulation methods of phase change materials (PCMs) as a thermal energy storage (TES) medium.** *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. [S.l: s.n.]. , 2014

JUN-XIA, X., HAI-YAN, Y., JIAN, Y. "Microencapsulation of sweet orange oil by complex coacervation with soybean protein isolate/gum Arabic", *Food Chemistry*, v. 125, n. 4, p. 1267–1272, 2011. DOI: 10.1016/j.foodchem.2010.10.063. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.10.063>.

JYOTHI SRI, S., SEETHADEVI, A., SURIA PRABHA, K., *et al.* **Microencapsulation: A review.** *International Journal of Pharma and Bio Sciences*. [S.l: s.n.]. , 2012

KANOKPANONT, S., YAMDECH, R., ARAMWIT, P. "Stability enhancement of mulberry-extracted anthocyanin using alginate/chitosan microencapsulation for food supplement application", *Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology*, v. 46, n. 4, p. 773–782, 2018. DOI: 10.1080/21691401.2017.1339050. .

KLEMMER, K. J., KORBER, D. R., LOW, N. H., *et al.* "Pea protein-based capsules for probiotic and prebiotic delivery", *International Journal of Food Science and Technology*, v. 46, n. 11, p. 2248–2256, 2011. DOI: 10.1111/j.1365-2621.2011.02743.x. .

KUPAEI, M. A., GARMAKHANY, A. D. "Effect of microencapsulated essential oils on the storage life of mango fruit (*Mangifera indica*. L, cv Chaunsa)", *Minerva Biotecnologica*, 2014.

KUSWANDI, B., NURFAWAIDI, A. "On-package dual sensors label based on pH indicators for real-time monitoring of beef freshness", *Food Control*, 2017. DOI: 10.1016/j.foodcont.2017.06.028. .

LI, li, AU, W., HUA, T., *et al.* "Improvement in antibacterial activity of moxa oil containing gelatin-arabic gum microcapsules", *Textile Research Journal*, v. 83, n. 12, p. 1236–1241, 2013. DOI: 10.1177/0040517512467059. .

LISERRE, A. M., LANDGRAF, M., DESTRO, M. T., *et al.* "Inhibition of *Listeria monocytogenes* by a bacteriocinogenic *Lactobacillus sake* strain in modified atmosphere-packaged Brazilian sausage", *Meat science*, v. 61, n. 4, p. 449–455, 2002. Disponível em: <http://europepmc.org/abstract/MED/22061076>.

LIU, F., CHEN, Z., TANG, C. H. "Microencapsulation properties of protein isolates from three selected Phaseolus legumes in comparison with soy protein isolate", *LWT - Food Science and*

Technology, v. 55, n. 1, p. 74–82, 2014. DOI: 10.1016/j.lwt.2013.09.008. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2013.09.008>.

LIU, S., CAO, Y. L., GHOSH, S., *et al.* "Intermolecular interactions during complex coacervation of pea protein isolate and gum arabic", **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 1, p. 552–556, 2010. DOI: 10.1021/jf902768v. .

LOURENÇO, S. C., FRAQUEZA, M. J., FERNANDES, M. H., *et al.* "Application of edible alginate films with pineapple peel active compounds on beef meat preservation", **Antioxidants**, v. 9, n. 8, p. 1–15, 2020. DOI: 10.3390/antiox9080667. .

LUNGU, B., O'BRYAN, C. A., MUTHAIYAN, A., *et al.* **Listeria monocytogenes: Antibiotic resistance in food production. Foodborne Pathogens and Disease**. [S.l: s.n.]. , 2011

LUONG, N. D. M., COROLLER, L., ZAGOREC, M., *et al.* **Spoilage of chilled fresh meat products during storage: A quantitative analysis of literature data. Microorganisms**. [S.l: s.n.]. , 2020

LUZZI, L. A. "Microencapsulation", **J. Pharm. Sci.**, v. 59, n. Oct, p. 1367–1376, 1970. .

MA, T., LUO, J., TIAN, C., *et al.* "Influence of technical processing units on chemical composition and antimicrobial activity of carrot (*Daucus carrot* L.) juice essential oil", **Food Chemistry**, v. 170, p. 394–400, 2015. DOI: 10.1016/j.foodchem.2014.08.018. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.08.018>.

MADAN, P. L. "Microencapsulation I. Phase separation or coacervation", **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 4, n. 1, p. 95–116, 1978. DOI: 10.3109/03639047809055641. .

MAPA. **REGULAMENTO TÉCNICO DE IDENTIDADE E QUALIDADE DE LINGUIÇA-MINISTÉRIO DA AGRICULTURA E DO ABASTECIMENTO-SECRETARIA DE DEFESA AGROPECUÁRIA-INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 4, DE 31 DE MARÇO DE 2000. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**. [S.l: s.n.]. , 2000

MARQUES, S. C., BOARI, C. A., BRCKO, C. C., *et al.* "AVALIAÇÃO HIGIÊNICO-SANITÁRIAS DE LINGUIÇAS TIPO FRESCAL COMERCIALIZADAS NOS MUNICÍPIOS DE TRÊS CORAÇÕES E LAVRAS MG", **Ciência e Agrotecnologia**, v. 30, n. 6, p. 1120–1123, 2006. .

MCNAMEE, B. F., O'RIORDAN, E. D., O'SULLIVAN, M. "Emulsification and Microencapsulation Properties of Gum Arabic", **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, n. 11, p. 4551–4555, 1998. DOI: 10.1021/jf9803740. .

MENDANHA, D. V., MOLINA ORTIZ, S. E., FAVARO-TRINDADE, C. S., *et al.* "Microencapsulation of casein hydrolysate by complex coacervation with SPI/pectin", **Food Research International**, v. 42, n. 8, p. 1099–1104, 2009. DOI: 10.1016/j.foodres.2009.05.007. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2009.05.007>.

MENG, Y., CLOUTIER, S. **Gelatin and Other Proteins for Microencapsulation**. [S.l: s.n.], 2014. Disponível em: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780124045682000200>.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos no Brasil**. . [S.l: s.n.], 2017. Disponível em: <http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2017/maio/29/Apresentacao-Surtos-DTA-2017.pdf>.

MOON, H., KIM, N. H., KIM, S. H., *et al.* "Teriyaki sauce with carvacrol or thymol effectively controls *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* Typhimurium, and indigenous flora in marinated beef and marinade", **Meat Science**, v. 129, p. 147–152, 2017. DOI: 10.1016/j.meatsci.2017.03.001. .

MORTAZAVIAN, A., RAZAVI, S. H., EHSANI, M. R., *et al.* "Principles and methods of microencapsulation of probiotic microorganisms", **IRANIAN JOURNAL of BIOTECHNOLOGY**, v. 5, n. 1, p. 1–18, 2007. .

MÜLLER, M., BUCHBAUER, G. **Essential oil components as pheromones. A review. Flavour and Fragrance Journal**. [S.l: s.n.]. , 2011

NESBAKKEN, T., KAPPERUD, G., CAUGANT, D. A. "Pathways of *Listeria monocytogenes* contamination in the meat processing industry", **International Journal of Food Microbiology**, v. 31, n. 1–3, p. 161–171, 1996. DOI: 10.1016/0168-1605(96)00978-6. .

NIU, F., DONG, Y., SHEN, F., *et al.* "Phase separation behavior and structural analysis of ovalbumin-gum arabic complex coacervation", **Food Hydrocolloids**, v. 43, p. 1–7, 2015. DOI: 10.1016/j.foodhyd.2014.02.009. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2014.02.009>.

ORTIZ DE ELGUEA-CULEBRAS, G., SÁNCHEZ-VIOQUE, R., SANTANA-MÉRIDAS, O., *et al.* "In vitro antifungal activity of residues from essential oil industry against *Penicillium verrucosum*, a common contaminant of ripening cheeses", **LWT - Food Science and Technology**, v. 73, p. 226–232, 2016. DOI: 10.1016/j.lwt.2016.06.008. .

OSAMEDE AIROUYUWA, J., KAEWMANEE, T., NESTERENKO, A., *et al.* "Microencapsulation of *Moringa oleifera* leaf extracts with vegetable protein as wall materials", **Food Hydrocolloids**, v. 41, n. 6, p. 95–102, 2019. DOI: 10.1016/j.foodhyd.2014.03.017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2014.03.017>.

OUATTARA, B., SIMARD, R. E., HOLLEY, R. A., *et al.* "Antibacterial activity of selected fatty acids and essential oils against six meat spoilage organisms", **International Journal of Food Microbiology**, v. 37, n. 2–3, p. 155–162, 1997. DOI: 10.1016/S0168-1605(97)00070-6. .

PATEL, S., GOYAL, A. **Applications of natural polymer gum Arabic: A review. International Journal of Food Properties**. [S.l: s.n.]. , 2015

PATHAK, J., PRIYADARSHINI, E., RAWAT, K., *et al.* "Complex coacervation in charge complementary biopolymers: Electrostatic versus surface patch binding", **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 250, p. 40–53, 2017. DOI: 10.1016/j.cis.2017.10.006. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cis.2017.10.006>.

PATTERSON, M. F., MCKAY, A. M., CONNOLLY, M., *et al.* "Effect of high pressure on the microbiological quality of cooked chicken during storage at normal and abuse refrigeration

temperatures", **Food Microbiology**, 2010. DOI: 10.1016/j.fm.2009.10.007. .

PAULO, F., SANTOS, L. **Design of experiments for microencapsulation applications: A review. Materials Science and Engineering C**. [S.l.: s.n.]. , 2017

PENG, C., ZHAO, S. Q., ZHANG, J., *et al.* "Chemical composition, antimicrobial property and microencapsulation of Mustard (*Sinapis alba*) seed essential oil by complex coacervation", **Food Chemistry**, v. 165, p. 560–568, 2014. DOI: 10.1016/j.foodchem.2014.05.126. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.05.126>.

PEREIRA, K. C., MOTA FERREIRA, D. C., ALVARENGA, G. F., *et al.* "Microencapsulation and release controlled by the diffusion of food ingredients produced by spray drying: A review", **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 21, 2018. DOI: 10.1590/1981-6723.08317. .

PERRICONE, M., ARACE, E., CORBO, M. R., *et al.* "Bioactivity of essential oils: A review on their interaction with food components", **Frontiers in Microbiology**, v. 6, n. FEB, p. 1–7, 2015. DOI: 10.3389/fmicb.2015.00076. .

PINELLI, J. J., HELENA DE ABREU MARTINS, H., GUIMARÃES, A. S., *et al.* "Essential oil nanoemulsions for the control of *Clostridium sporogenes* in cooked meat product: An alternative?", **LWT**, v. 143, p. 111123, maio 2021. DOI: 10.1016/j.lwt.2021.111123. .

PRADO, I. N., CRUZ, O. T. B., VALERO, M. V., *et al.* "Effects of glycerin and essential oils (*Anacardium occidentale* and *Ricinus communis*) on the meat quality of crossbred bulls finished in a feedlot", **Animal Production Science**, v. 56, n. 12, p. 2105–2114, 2016. DOI: 10.1071/AN14661. .

PRIFTIS, D., LAUGEL, N., TIRRELL, M. "Thermodynamic characterization of polypeptide complex coacervation", **Langmuir**, v. 28, n. 45, p. 15947–15957, 2012. DOI: 10.1021/la302729r. .

RAINES, C. R., HUNT, M. C., UNRUH, J. A. "Contributions of muscles of various color stabilities to the overall color stability of ground beef", **Journal of Food Science**, v. 75, n. 1, 2010. DOI: 10.1111/j.1750-3841.2009.01430.x. .

REYES-JURADO, F., LÓPEZ-MALO, A., PALOU, E. "Antimicrobial Activity of Individual and Combined Essential Oils against Foodborne Pathogenic Bacteria", **Journal of Food Protection**, 2016. DOI: 10.4315/0362-028X.JFP-15-392. .

RILEY, M. A., WERTZ, J. E. "Bacteriocin diversity: ecological and evolutionary perspectives", **Biochimie**, v. 84, n. 5–6, p. 357–364, 2002. DOI: S0300908402014219 [pii]. Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12423779.

RUAN, C., ZHANG, Y., SUN, Y., *et al.* "Effect of sodium alginate and carboxymethyl cellulose edible coating with epigallocatechin gallate on quality and shelf life of fresh pork", **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 141, p. 178–184, 2019. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2019.08.247. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.08.247>.

RUTZ, J. K., BORGES, C. D., ZAMBIAZI, R. C., *et al.* "Microencapsulation of palm oil by complex coacervation for application in food systems", **Food Chemistry**, v. 220, p. 59–66, 2017. DOI: 10.1016/j.foodchem.2016.09.194. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.09.194>.

SARAIVA, C., GARCÍA-DÍEZ, J., FONTES, M. da C., *et al.* "Modeling the Behavior of *Listeria monocytogenes* in Meat", **Listeria Monocytogenes**, 2018. DOI: 10.5772/intechopen.79967. .

SEMENOVA, A. A., NASONOVA, V. V., TUNIEVA, E. K. "The effect of essential oils on the color stability of minced meat", **IOP Conference Series: Earth and Environmental Science**, v. 333, n. 1, 2019. DOI: 10.1088/1755-1315/333/1/012098. .

SESSA, M. **Nanoencapsulation of bioactive compounds for food applications**. 2011. 154 f. 2011.

SHAMLOO, E., HOSSEINI, H., MOGHADAM, A. Z., *et al.* **Importance of *Listeria monocytogenes* in food safety: A review of its prevalence, detection, and antibiotic resistance**. **Iranian Journal of Veterinary Research**. [S.l: s.n.] , 2019

SHARMA, H., MENDIRATTA, S. K., AGARWAL, R. K., *et al.* "Evaluation of anti-oxidant and anti-microbial activity of various essential oils in fresh chicken sausages", **Journal of Food Science and Technology**, v. 54, n. 2, p. 279–292, 2017. DOI: 10.1007/s13197-016-2461-z. .

SHERIDAN, C., FARRELL, M. O., LEWIS, E., *et al.* "A comparison of CIE L * a * b * and spectral methods for the analysis of fading in sliced cured ham", **JOURNAL OF OPTICS A: PURE AND APPLIED OPTICS**, p. S32–S39, 2007. DOI: 10.1088/1464-4258/9/6/S06. .

SHIMANOVICH, U., BERNARDES, G. J. L., KNOWLES, T. P. J., *et al.* "Protein micro- and nano-capsules for biomedical applications", **Chem. Soc. Rev.**, v. 43, n. 5, p. 1361–1371, 2014. DOI: 10.1039/C3CS60376H. Disponível em: <http://xlink.rsc.org/?DOI=C3CS60376H>.

SILVA-VÁZQUEZ, R., ARANA-SÁNCHEZ, A., LUGO-CERVANTES, E., *et al.* "Vegetable proteins in microencapsulation: A review of recent interventions and their effectiveness", **Industrial Crops and Products**, v. 411, n. 1, p. 129–139, 2013. DOI: 10.1016/j.indcrop.2012.06.035. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfa.2012.07.010>.

SINGH, P., KUMAR, R., SABAPATHY, S. N., *et al.* "Functional and edible uses of soy protein products". 7, 2008. **Anais [...]** [S.l: s.n.], 2008. p. 14–28. DOI: 10.1111/j.1541-4337.2007.00025.x.

SOARES, V. M., PADILHA, M. B., DE GUERRA, M. E. M., *et al.* "Identification of salmonella spp, listeria monocytogenes, and indicator microorganisms in commercialized raw meats and fresh sausages from Uruguaiiana, Rio Grande do Sul, Brazil", **Ciencia Rural**, v. 51, n. 6, p. 2–9, 2021. DOI: 10.1590/0103-8478cr20200569. .

THIES, C., "Microencapsulation of Flavors by Complex Coacervation". **Encapsulation and Controlled Release Technologies in Food Systems**, [S.l: s.n.], 2007. p. 149–170. DOI: 10.1002/9780470277881.ch7.

TIMILSENA, Y. P., WANG, B., ADHIKARI, R., *et al.* "Advances in microencapsulation of polyunsaturated fatty acids (PUFAs)-rich plant oils using complex coacervation: A review", **Food Hydrocolloids**, v. 69, p. 369–381, 2017. DOI: 10.1016/j.foodhyd.2017.03.007. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2017.03.007>.

TOLDRA, F. "Sodium reduction in foods: a necessity for a growing sector of the population", **Trends in Food Science & Technology**, v. 18, n. 11, p. 583, 2007. DOI: 10.1016/j.tifs.2007.07.005. Disponível em: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0924224407002105>.

TOLSTOGUZOV, V. B. "Functional properties of food proteins and role of protein-polysaccharide interaction", **Food Hydrocolloids**, v. 4, n. 6, p. 429–468, 1991. DOI: 10.1016/S0268-005X(09)80196-3. Disponível em: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0268005X09801963>.

UMER, H., NIGAM, H., TAMBOLI, A. M., *et al.* "Microencapsulation : Process , Techniques and Applications", **International Journal of Research in Pharmaceutical and Biomedical Sciences**, v. 2, n. 2, p. 474–481, 2011. DOI: 10.1111/j.1365-2621.2005.00980.x. .

UPADHYAY, A., UPADHYAYA, I., KOLLANOOR-JOHN, A., *et al.* "Inactivation of *Listeria monocytogenes* on frankfurters by plant-derived antimicrobials alone or in combination with hydrogen peroxide", **International Journal of Food Microbiology**, v. 163, n. 2–3, p. 114–118, 2013. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2013.01.023. .

VEIGA, R. D. S. Da, APARECIDA DA SILVA-BUZANELLO, R., CORSO, M. P., *et al.* **Essential oils microencapsulated obtained by spray drying: a review. Journal of Essential Oil Research.** [S.l: s.n.]. , 2019

WANG, Y., LIU, W., CHEN, X. D., *et al.* "Micro-encapsulation and stabilization of DHA containing fish oil in protein-based emulsion through mono-disperse droplet spray dryer", **Journal of Food Engineering**, v. 175, p. 74–84, 2016. DOI: 10.1016/j.jfoodeng.2015.12.007. .

WEINBRECK, F., ROLLEMA, H. S., TROMP, R. H., *et al.* "Diffusivity of whey protein and gum arabic in their coacervates", **Langmuir**, v. 20, n. 15, p. 6389–6395, 2004. DOI: 10.1021/la049908j. .

XIAO, Z., LIU, W., ZHU, G., *et al.* "A review of the preparation and application of flavour and essential oils microcapsules based on complex coacervation technology", **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 94, n. 8, p. 1482–1494, 2014. DOI: 10.1002/jsfa.6491. .

XU, L., CHENG, J. R., LIU, X. M., *et al.* "Effect of microencapsulated process on stability of mulberry polyphenol and oxidation property of dried minced pork slices during heat processing and storage", **Lwt**, v. 100, n. June 2018, p. 62–68, 2019. DOI: 10.1016/j.lwt.2018.10.025. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.10.025>.

YAN, C., ZHANG, W., "Coacervation Processes". **Microencapsulation in the Food Industry**, [S.l: s.n.], 2014. p. 125–137. DOI: 10.1016/B978-0-12-404568-2.00012-1. Disponível em: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780124045682000121>.

YEMIŞ, G. P., CANDOĞAN, K. "Antibacterial activity of soy edible coatings incorporated

with thyme and oregano essential oils on beef against pathogenic bacteria", **Food Science and Biotechnology**, v. 26, n. 4, p. 1113–1121, 2017. DOI: 10.1007/s10068-017-0136-9.

ZARRINGHALAMI, S., SAHARI, M. A., HAMIDI-ESFEHANI, Z. "Partial replacement of nitrite by annatto as a colour additive in sausage", **Meat Science**, 2009. DOI: 10.1016/j.meatsci.2008.08.003.

SEGUNDA PARTE - ARTIGOS**ARTIGO 1 - ESSENTIAL OILS ENCAPSULATED INTO COACERVATE MATRICES AND EVALUATION OF THEIR ANTIMICROBIAL POTENTIAL FOR APPLICATION IN FOOD**

LÍVIO A. S. PEREIRA¹; AMANDA M. T. LAGO²; HELOÍSA H. A MARTINS³; LIZZY A. A. VERÍSSIMO⁴; ROBERTA H. PICCOLI⁴; DIEGO A. BOTREL⁴

¹ Postgraduate Program in Biomaterials Engineering, Federal University of Lavras, Lavras, 37200-000, MG, Brazil

² Postgraduate Program in Food Science, Federal University of Lavras, Lavras, 37200-000, MG, Brazil

³ Department of Agroindustry, Federal Institute Baiano (IFBaiano), 46880-000, Itaberaba, BA, Brazil

⁴ Department of Food Science, Federal University of Lavras, Lavras, 37200-000, MG, Brazil

*Corresponding Author: Diego Alvarenga Botrel, diegobotrel@ufla.br, Tel:+55 (35)3829-4610

¹Artigo redigido conforme norma do periódico científico Journal of Functional Foods.

ABSTRACT

This study aimed to evaluate the microencapsulation of blends of oregano, clove, and thyme essential oils (EO) by complex coacervation using different protein sources (soy protein (SP), whey protein (WP), and pea protein (PP)) as a wall material in combination with gum arabic (GA). The effect of the protein source: GA ratio and pH on the coacervation yield were evaluated. The *in vitro* antimicrobial effect of the oils blend before and after their encapsulation against *L. monocytogenes* and *W. viridescens* was also examined. The experimental conditions that resulted in the highest microcapsule yield were SP/GA, pH 3.5, 1:1 ratio; PP/GA, pH 4.5 to 5.5, 1:1 ratio; and WP/GA, pH 3.5, 1:1 ratio. A higher encapsulation efficiency rate was 83.5% (SP:GA). The microcapsules produced in this study were effective not only in the encapsulation of EO but also in compound release and subsequent growth inhibition of the evaluated microorganisms.

KEYWORDS: Natural additive; Complex coacervation; Plant protein; Gum Arabic; Microcapsules; Food safety.

1. INTRODUCTION

One of the main trends for innovation in the food industry sector is food safety. Consumers are demanding high-quality and safe food containing natural additives. As a result, this sector has undergone significant transformations with an increasing demand for healthy innovations. Increased bacterial resistance to antibiotics has intensified efforts to use natural preservatives, such as essential oils. Essential oils contain compounds with antimicrobial action, such as thymol, eugenol, and carvacrol. These are complex phytochemical compounds that can form multiple compositions when mixed, intensifying or modifying their antimicrobial action, and act on the cell wall of microorganisms, causing breakdown of the outer membrane and cell death. However, the direct use of these components in food is limited due to their high volatility, instability, and limited solubility in aqueous products (Calo et al., 2015; Glushkov, 2016). In this context, essential oil microencapsulation processes, such as complex coacervation, have grown in popularity, have been the subject of several studies and have been used in the development of innovative materials and products.

The microencapsulation of essential oils into polymeric matrices is widely used due to its ability to preserve the active agent and its volatiles against external factors such as high temperature, humidity, light, and oxygen. One promising technological alternative is the complex coacervation technique (De Kruif, Weinbreck, & Vries, 2004; Eghbal&Choudhary, 2018). Complex coacervation is a technique that involves the separation of liquid-liquid phases by electrostatic interactions between two macromolecules with opposite charges. After complete phase separation, a lower concentrated phase (coacervate) is formed in equilibrium with a dilute upper phase (Croguennec, Tavares & Bouhallab, 2017). Proteins are widely used in complex coacervation due to several advantages, such as biodegradability, biocompatibility, emulsification capacity, and good amphiphilic and functional properties. In general, animal proteins tend to be more soluble and flexible than proteins derived from plants over a wider pH

range, allowing their application in different encapsulation techniques (Kaushik et al., 2015). However, due to the greater availability and the current consumption trend of plant products, plant proteins such as soy protein (SP), pea protein (PP), and rice have been successfully used as wall materials for microencapsulation (Meng, Cloutier, 2014; Murali et al., 2016). Protein properties are variable and vary according to not only the type of source but also environmental factors such as the pH of the medium and heat treatment. Proteins present advantages such as the presence of ionizable groups on their surface and ease of prediction and modulation of the electric charge in solution with other substances. Some studies on the production of microcapsules by complex coacervation involved the use of proteins such as gelatin, albumin, whey protein (WP), SP, PP, and rice protein (Ton, Tran & Le, 2016; Tan et al., 2017; Jansen-Alves et al., 2019; Le Priol et al., 2019).

In recent years, there has been a significant increase in the development of new coacervation systems with different properties, and these technologies are aligned with the various demands of the food sector, such as the need for more natural ingredients and technologies, the use of preservatives from natural sources and waste reuse. All these demands require a change in existing industrial processes and the corresponding research development to offer multisectoral responses for real-world application. Several studies are available in the literature regarding complex coacervation processes and essential oils; however, there is still a need for greater understanding of the interactions between wall materials and the active agent, the changes in their physicochemical properties, aspects related to antimicrobial action and the changes and interactions that occur when coacervation systems are applied in food matrices (Dima et al., 2014; Chen et al., 2017; Kong et al., 2017). In this context, this study aimed to evaluate the microencapsulation of blends of oregano, clove and thyme essential oils by complex coacervation using different protein sources (WP, SP and PP) as a wall material in combination with gum arabic (GA); through physical properties and antimicrobial activity.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1 Materials

Oregano (*Origanum vulgare*), thyme (*Thymus vulgaris*) and clove (*Syzygium aromaticum*) essential oils were used, purchased from FERQUIMA Indústria e Comércio Ltda, Vargem Grande, São Paulo, Brazil. The wall materials used for the coacervation process were gum arabic381 I (Alland & Robert, Port Mort, France), whey protein isolate (Whey 9400, Hilmar Ingredients, California, USA), soy protein isolate and pea protein (Doremus Alimento Ltda, São Paulo, Brazil). Bovine Serum Albumin (BSA) (Sigma-Aldrich Co., Saint Louis, Missouri, USA) was used as a standard protein for constructing the calibration curve.

2.2 Standardization and maintenance of microorganisms and inocula

The strains used in this study were *Listeria monocytogenes*(ATCC 19117), provided by the National Institute of Quality Control in Health (INCQS) of the Oswaldo Cruz Foundation (FIOCRUZ), Rio de Janeiro, Brazil, and *Weissellaviridescens* (ATCC 5843), provided by the Biochemical Engineering Laboratory of the Federal University of Santa Catarina (Santa Catarina, Brazil). *L. monocytogenes* strain was reactivated in Tryptone Soy Broth (TSB) supplemented with 0.3% yeast extract and incubated at 37 °C for 24 h. *W. viridescens* strain was reactivated in de Man, Rogosa, and Sharpe (MRS) broth and incubated at 30 °C for 24 h. Inoculum standardization was performed by constructing a growth curve, monitoring the absorbance (OD 600 nm) and plate counting using Tryptone Soy Agar (TSA) and 0.3% yeast extract for *L. monocytogenes*, incubated at 37 °C; *W. viridescens* was grown in MRS Broth, and counting was made with pour plate technique with overlay, using MRS Agar, and incubation at 30 ° C. After standardization, the measured absorbance corresponded to 10⁸ CFU/mL (CLSI, 2017).

2.3 Profile and antimicrobial action of essential oil components

The antimicrobial activity against *L. monocytogenes* and *W. viridescens* was evaluated through the minimum bactericidal concentration (MBC) of each individual EO. Later, the oils were combined, this blend being characterized by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS).

2.3.1 Essential oil minimum bactericidal concentration (MBC) determination

The minimum bactericidal concentration (MBC) was determined using the microdilution technique (CLSI, 2017). TSB + 0.3% yeast extract was used for *L. monocytogenes*, and MRS Broth was used for *W. viridescens*; both culture media were added with 0.5% Tween 80 and essential oils in the concentrations determined (0.00, 0.20, 0.50, 1.00, 1.25, 1.50, 1.75 and 2.00% (v/v)). Aliquots of 150 μ L of the solutions were added to microplate wells, and 10 μ L of standardized culture was inoculated. The plates were incubated at 37 °C/24h (*L. monocytogenes*) and at 30 °C/24 h (*W. viridescens*). After this period, the cultures were plated using the appropriate medium for each bacterium. The MBC of each essential oil was the lowest concentration where no growth was observed in the plates. The method was performed in triplicate with three replicates each for the control and tested compounds. A positive control solution containing aliquot without adding the essential oil and a negative control containing chloramphenicol (1000 mg/L) was used.

2.3.2 Phytochemical characterization of the essential oil blend by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS)

Based on the MBCs for both microorganisms evaluated in this study, the blend of essential oils at a ratio of 1:1:2 (v/v) (oregano:clove:thyme) was evaluated in a gas chromatograph (Shimadzu) coupled to a mass spectrometer. The mass-selective detector was operated in electron impact (EI) mode at a scanning range of 40 to 550 m/z and 70 eV. The oven temperature was maintained at 40 °C for 3 min and then raised to 100 °C at a rate of 3 °C/min, to 180 °C at a rate of 5 °C/min and to 300 °C at a rate of 20 °C/min. Helium was used

as the carrier gas at a flow rate of 1 mL/min. A diluted sample (0.5 μ L, 1/103 v/v, in dichloromethane) of essential oil was automatically injected, and the gas chromatography (GC) split ratio used was 1:20. Kovats indices were calculated for all volatile constituents using a homologous series of *n*-alkanes (C5-C15). The main constituents were identified by coinjection with standards and confirmed by the Kovats indices using the Wiley (v. 7.0) GC-MS library and literature data (Peng et al., 2014).

2.3.3 Antimicrobial evaluation of the essential oil blends

The antimicrobial activity of essential oil blends against *L. monocytogenes* and *W. viridescens* was evaluated considering a clove, thyme, and oregano essential oil ternary mixture using a simplex-centroid experimental design augmented with interior points for pseudo components whose proportions were evaluated in Statistica 7.0. **Table 1** shows the different proportions of each essential oil relative to its initial value, where 100% corresponds to 50% of the MBC value of the essential oil.

Table 1 - Proportions (%) of essential oils used in each test. Where 100 refers to $\frac{1}{2}$ MBC (Minimum Bactericidal Concentration) of each oil studied, the remaining numbers represent the proportions of the oils used based on $\frac{1}{2}$ MBC.

Run	Clove (%)	Thyme (%)	Oregano (%)
1	100 (1)	0	0
2	0	100 (1)	0
3	0	0	100 (1)
4	50 (1/2)	50 (1/2)	0
5	50 (1/2)	0	50 (1/2)
6	0	50 (1/2)	50 (1/2)
7	67 (4/6)	17 (1/6)	17 (1/6)
8	17 (1/6)	67 (4/6)	17 (1/6)
9	17 (1/6)	17 (1/6)	67 (4/6)
10	33 (1/3)	33 (1/3)	33 (1/3)

The essential oil blends were prepared in TSB supplemented with 0.3% yeast extract and added 0.5% Tween 80; and MRS broth for *L. monocytogenes* and *W. viridescens*, respectively. Both blends were added to microplate wells, and 10 μ L of each culture was inoculated. The plates were incubated at 37 °C/24h and 30°C/24h for *L. monocytogenes* and *W. viridescens*, respectively. After incubation, aliquots of each culture were plated in the appropriate culture medium and incubated again (CLSI, 2017).

2.4 Microcapsule preparation and characterization

The microcapsules were obtained through complex coacervation. The pH and the wall material were evaluated for coacervation yield. Also, the morphology of the microcapsules and the retention efficiency of essential oils were evaluated.

2.4.1 Evaluation of the effect of pH and wall material proportion on coacervation yield

A complete factorial design (7×5) with three replicates was applied to determine the ideal production parameters of the protein:GA coacervates, in which the effect of pH and biopolymer proportion on the coacervation yield was evaluated (18). The following stock solutions were prepared: 5% (w/v) WP (soluble in distilled water), 5% (w/v) SP (soluble at pH 8.0 after ultrasonication at 864 J/mL for 5 min), 5% (w/v) PP (soluble at pH 2.5 after ultrasonication at 864 J/mL for 5 min) and 5% GA. Coacervation systems were evaluated for each of the different types of proteins at ratios of 3:1, 2:1, 1:1, 1:2 and 1:3 (protein:GA) (v/v). Aliquots of 1 mL of each ratio were centrifuged. Due to the high protein concentrations, aliquots were removed from the supernatants of the solutions (100 μ L) and diluted in Eppendorf tubes containing 1000 μ L of distilled water. The pH values tested were adjusted to the 3.0-6.0 range with an interval of 0.5 using NaOH (1 mol/L) or HCl (1 mol/L) solution. Control solutions of 5% GA were prepared in the 3.0-6.0 pH range with an interval of 0.5.

The Bradford method (18) quantified the soluble protein content through absorbance readings at 595 nm. Bovine serum albumin (BSA) was used as a standard protein in constructing the calibration curve. The formation of coacervates was indirectly related to the residual soluble protein content. The coacervate yield results were subjected to regression analysis at a significance level of 5%. The mathematical model was selected based on the R^2 of each treatment.

2.4.2 Microcapsule preparation by complex coacervation

Solutions of 5% WP (soluble in distilled water), 5% SP (soluble at pH 8.0, 60% ultrasound, 5 min) and 5% PP (soluble at pH 2.5, 60% ultrasound, 5 min) were combined with 5% GA solution at a 1:1 ratio. The individual solutions were stirred for 2 h and left to rest to achieve complete hydration for 24 h at 4 °C. A 1:1 (v/v) ratio of essential oil blend with 0.5% Tween 80 was added to the protein solutions and placed in an ultrasonic (Ultrason digital Sonifier, 450, Branson Ultrasonic Corporation) homogenizer for 15 min at 60% amplitude, corresponding to an ultrasonic energy density of 864 J/mL. Then, the GA solution was poured into the protein emulsions and stirred for 15 min at 300 rpm using a magnetic stirrer. Next, the pH values of the blends were adjusted to the ideal pH for each protein/GA combination using 0.1 N HCl. The microcapsules formed were kept at 5 °C for 24 h to ensure the complete formation of complex coacervates and were subsequently vacuum-filtered for further analysis (Gnanasambandam & Heltiarachchy; Mendanha et al., 2009; Jun-xia, Hai-yan & Jian, 2011; Klemmer et al., 2012; Niu et al., 2015; Liu et al., 2020).

2.4.3 Microcapsule morphology

The morphology of the microcapsules was evaluated using a YS 100 optical microscope (Nikon, Tokyo, Japan). The previously vacuum filtered microcapsules were dispersed on a slide with the addition of 10 μ L of distilled water and observed under an optical microscope. Next, the size of the microparticles in the micrographs was determined using ImageJ 1.50i software

(Wayne Rasband, National Institute of Health, USA)(Comunian et al., 2016) using Equation 1.

$$d_m = \frac{\sum_{i=1}^n n_i \times d_i}{\sum_{i=1}^n n_i} \quad (1)$$

Where d_m is the mean diameter of the microparticles, n_i is the number of microparticles and d_i is the diameter of a microparticle.

2.4.4 Determination of the oil retention of the microcapsules

The retention efficiency was evaluated based on the identification and quantification of the major components of each oil used. The concentration of major components in the blend was determined as described by Peng et al. (2014). Standards (major components: thymol, carvacrol, and eugenol) were diluted with hexane in solutions of 50, 100, 200, 500, 1000 and 2000 $\mu\text{mol/L}$. The solutions with each standard were analyzed in an Agilent 6890 GC chromatograph equipped with a flame ionization detector (FID); a DB-5 ms capillary column (30 m x 0.25 mm; 0.25 μm film thickness) was used as the separation column. The chromatographic conditions were the same as described above. The peak area of the FID signal, corresponding to concentration, was subjected to linear regression analysis, and the regression equation was calculated. The standard curves were constructed using the following equations: $y = 352879x - 396974$, $R^2=0.9989$, $y = 348525x - 431953$, $R^2 = 0.9991$ and $y = 237755x - 316480$, $R^2 = 0.9886$.

To quantify the major compounds of the oils in the produced microcapsules, 3 mg of previously vacuum-filtered microcapsules was dispersed in 25 mL of hexane in a 50 mL round-bottom flask under magnetic stirring for 2 h at 25 °C. Then, the solution was ultrasonicated at 240 W for 15 min at room temperature. Subsequently, the blend was subjected to an ultrasonic bath for 1 h and placed in a refrigerator at 4 °C overnight until complete phase separation. A 0.5mL aliquot of the hexane layer was analyzed by GC. The retention rate (Y) of microcapsules containing a blend of essential oils was calculated using Equation 2 (Peng et al., 2014).

$$\% Y = \frac{C_i}{C_f} * 100 \quad (2)$$

Where C_i is the concentration of the essential oil blend in the emulsion before microencapsulation and C_f is the concentration (mg/mL) of the essential oil blend in the microcapsules.

2.5 Antimicrobial activity of the microcapsules

The antimicrobial activity of the microcapsules was determined using the agar diffusion method (Bahram et al., 2013). Aliquots of 10 mL of standardized culture of each bacterium were transferred to flasks containing 200 mL TSA plus 0.3% yeast extract (*L. monocytogenes*) or MRS agar (*W. viridescens*). Fifteen milliliters of the TSA and MRS blends were poured into previously sterilized Petri dishes. After solidification of the culture medium, a circle was formed in the center of each plate with an agar cutter, and 3 g of previously vacuum-filtered microcapsules was added to the circle. The plates were sealed and incubated at 37°C/24 h (*L. monocytogenes*) or 30 °C/24 h (*W. viridescens*). The assays were performed in triplicate with three replicates each. A positive control solution containing microcapsules without the addition of the oil blend and a negative control containing chloramphenicol (1000 mg/L) were used.

2.6 Essential oil blend release studies

To evaluate the release of the essential oil blend from the microcapsules, 3 g of previously vacuum-filtered microcapsules obtained in the different treatments was weighed and added to 100 mL of TSA culture medium with 0.3% yeast extract (*L. monocytogenes*) or MRS agar (*W. viridescens*). Samples were collected every 1 h, and the absorbances were read in a UV-visible spectrophotometer (S-2000 Bel Photonics). Aliquots of 100 µL of the dilutions were transferred to plates containing TSA culture medium and 0.3% yeast extract (*L. monocytogenes*–incubated at 37 °C/24 h) or MRS agar (*W. viridescens* – incubated at 30 °C/24 h). The release of the essential oil blend from the microcapsules was evaluated by comparison

with the standard growth curves of each microorganism. The assays were performed in triplicate with three replicates each. A positive control containing microcapsules without the addition of the oil blend and a negative control containing chloramphenicol (1000 mg/L) were used.

2.7 Statistical analysis

For the antimicrobial evaluation of the essential oil blend, the simplex-centroid mixture design augmented with interior points for pseudocomponents was used, and the proportions were evaluated in Statistica 8.0 (Dell Statistica, Oklahoma, USA). In the evaluation of the effect of pH and wall material proportion, a linear regression analysis was performed at a significance level of 5%. The other experimental results were subjected to analysis of variance, and the means were compared by Tukey's test at 5%. The analyses were performed using Statistica 8.0 (Dell Statistica, Hokota, USA). The data are presented as the mean \pm standard deviation.

To optimize the essential oils, the microbial growth responses were transformed as a function of desirability based on the type of response: smaller-the-best (STB), with a specific parameter (r) of 1.0. Based on the equation of the predicted model, a contour curve of the desirability function was generated, and the optimal region was thus obtained. Analysis of variance was used to evaluate the significance of the data fitted to the model, and triangular contour plots were generated from the polynomial equations using Chemoface v.1.6 software.

3 RESULTS AND DISCUSSION

3.1 Phytochemical characterization of the essential oil blend

GC-MS characterized the chemical composition of the essential oil blend, and the results, expressed as % relative area, are shown in **Table 2**.

Table 2. Chemical constituents identified in the essential oils blend.

Chemical constituent	Retention time(t_r)	Amount (%)
α -Pinene	5.792	1.54
Camphene	6.250	0.41
p - Cymene	8.566	18.38
Eucalyptol	8.810	0.90
γ - Terpinene	9.755	3.61
Linalool	11.369	3.02
Camphor	13.293	1.24
2-Bornanol	14.397	0.81
Thymol	19.790	21.04
Carvacrol	20.154	20.07
Eugenol	22.260	21.09
Isocaryophyllene	24.836	4.33
Cyclohexene, 1-Methyl-4-(1-Methylethenyl)	26.303	0.36
CaryophylleneOxide	31.370	0.74
9-Octadecenoic Acid (Z)-, MethylEster	49.009	1.53
HeptadecanoicAcid, Methyl Ester	49.871	0.93

In total, 16 components were identified. The major compounds observed were thymol, carvacrol, and eugenol, representing 62.2% of the total. The results found for the oil blend agree with data from the literature for the major compounds of the essential oils of thyme, oregano, and clove (Hudaib et al., 2002; Friedman, Henika&Mandrell, 2020; Chaieb et al., 2017).

3.2 Antimicrobial activity of the essential oils and their blends

The MBCs of the essential oils are shown in **Table 3**.

Table 3. Minimum bactericidal concentration (MBC) of the essential oils.

Essential oil	MCB (%)	
	<i>L. monocytogenes</i>	<i>W. viridescens</i>
Orégano	0,312	0,078
Cravo	0,312	0,156
Tomilho	0,625	0,625

The essential oils evaluated in this study are known for their antimicrobial and antioxidant activity (Hyldgaard, Mygind&Meyer, 2012). Except for thyme oil, where the MBCs were the same for both bacteria, *L. monocytogenes* had a higher tolerance than *W. viridescens* to oregano and clove essential oils. Oregano essential oil showed higher bactericidal activity against *W. viridescens*. Based on the MBC of each essential oil, several blends were prepared containing the three essential oils in different concentrations to observe the synergism of their bactericidal activity and reduce the oil concentrations used.

The *in vitro* antimicrobial activity of the different essential oil blends against *L. monocytogenes* and *W. viridescens* is shown in **Table 4**.

Table 4. Bactericidal activity of essential oil blends against *L. monocytogenes* and *W. viridescens*.

Essential oil ratio	Run													
	1		2		3		4		5		6		7	
50/50/0	50/0/50 0/50/50 67/17/17 17/67/17 17/17/67 33/33/33													
clove / oregano / thyme	L	W	L	W	L	W	L	W	L	W	L	W	L	W
	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+

L: *L. monocytogenes*; *W*: *Weissella viridescens*. (+) growth; (-) no growth.

Among the blends containing two oils (50/50% of their MBCs), those containing 0.039% clove and 0.078% oregano were not bactericidal, and *W. viridescens* growth was observed in the plates. Among the blends containing three oils, all showed bactericidal activity against *L. monocytogenes*, suggesting antimicrobial synergism among the essential oils. Synergism among essential oils has been reported in the literature. Guarda et al. (2011) evaluated the antimicrobial activity of microencapsulated thymol and carvacrol and found synergism between them at a proportion of 50% of each. For *W. viridescens*, blends containing

17% oregano and clove and 67% thyme and another containing 33% of each oil did not inhibit the growth of this microorganism. Based on the results in Table 4, a new dilution was performed using 50% of the MBC of each essential oil to evaluate the essential oil blend to inhibit the growth of the microorganisms.

The inhibition profile was evaluated using the desirability function for the optimization of the assays. Quadratic models were used for the microbial growth variable because they had R^2 values greater than 0.7, significant regressions ($p < 0.05$) and non-significant lack of fit ($p > 0.05$). Such parameters indicate that the models are adequate (Henika, 1992). Based on the predicted equations, contour curves (**Figures 1A and 1B**) were generated, and an optimal microbial growth inhibition region was observed for *L. monocytogenes* and *W. viridescens*.

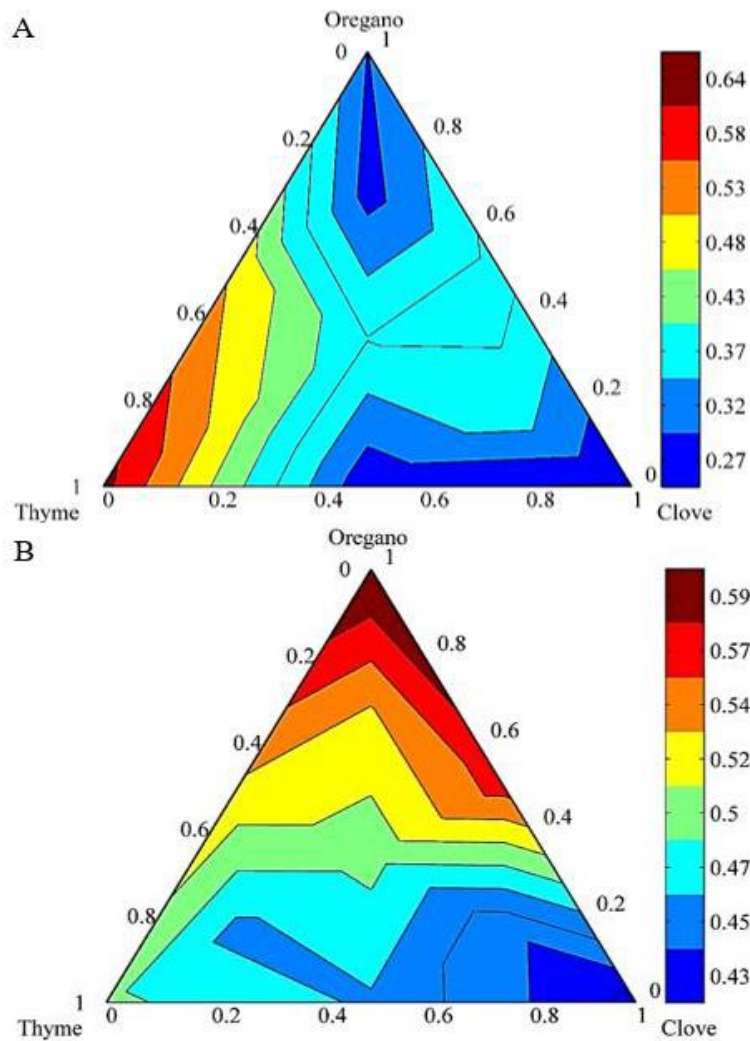


Figure 1. Contour curve for the desirability function of microbial growth inhibition of the essential oils. 1A - *L. monocytogenes*. 1B – *W. viridescens*.

Observing the contour curves of the oil blends, there were differences concerning the two evaluated microorganisms. For *L. monocytogenes*, the oregano (0% to 45%) and thyme (50% to 100%) essential oils showed the greatest contribution to the bacteriostatic effect of the different tested blends. In comparison, clove essential oil showed lower activity (0% to 15%) (Figure 1A). For *W. viridescens* (Figure 1B), the oregano (40% to 100%) and clove (0% to 60%) essential oils showed greater inhibition effects, while thyme essential oil showed less intense action (0% to 50%).

Reyes-Jurado, López-Malo&Palou (2016) evaluated the antimicrobial activities of Mexican oregano (*Lippia berlandieri* Schauer), mustard (*Brassica nigra*), and thyme (*Thymus vulgaris*) essential oils alone and in binary combinations against *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, and *Salmonella enteritidis*. The mustard essential oil exhibited synergistic effects when combined with the Mexican oregano or thyme essential oils. An additive effect was obtained by combining the thyme and Mexican oregano essential oils. Synergism occurs in a blend of essential oils when the effect of the combined substances is greater than their individual effects (Lis-balchin&Deans, 1997). Regarding the present study, there was a synergistic effect among the essential oils on *L. monocytogenes* and *W. viridescens* vegetative cells. The blends containing three oils showed bacteriostatic activity. Based on the results, the ideal blend of essential oils (based on 50% of the MBC value) for inhibiting the growth of both bacteria should contain 40% oregano, 50% thyme and 10% clove essential oil. Defining a substance as bactericidal or bacteriostatic often depends on the dosage, and the dosage selected depends on the desired application. In this study, we obtained results regarding bactericidal and bacteriostatic effects, and in the remainder of the study, bactericidal concentrations of 0.3125% oregano, 0.3125% clove and 0.625% thyme were used to prepare the blend. These values are associated with the MBCs for the two evaluated microorganisms.

3.3 Effect of pH and wall material proportion on coacervation yield

The results for the encapsulation yield as a function of the dilution effect and pH for the different wall materials are shown in **Figure 2**. The contour plots were generated using the experimental results for encapsulation yield and graphed in SigmaPlot 11.0.

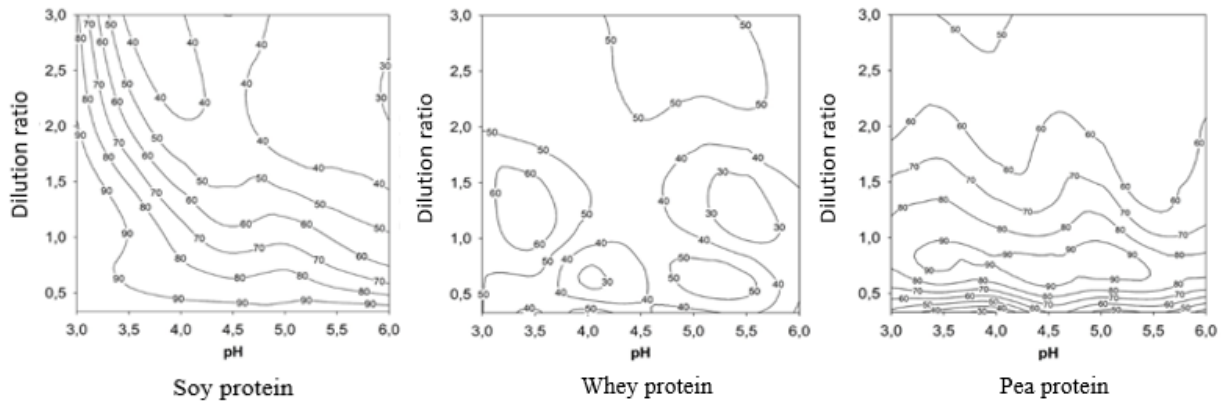


Figure 2. Coacervation yield as a function of pH and dilution ratio.

The pH affected charge density and thus complexation between the proteins and GA. According to some authors (Pelegri & Gasparetto, 2005; Barac et al., 2010), SP (isoelectric point of 4.5), PP (isoelectric point of 4.5) and WP (isoelectric point of 4.5) showed changes in solubility at different pH values in contact with GA. The results were subjected to linear regression. The pH and dilution ratio showed significant effects ($p < 0.05$) only for SP/GA. For this combination, an R^2 of 0.88 was observed:

$$\hat{y} = 216.89 - (44.08 \times pH) + (4.35 \times pH^2) - (33.63 \times PP) + (9.08 \times PP^2) - (3.59 \times pH \times PP)$$

For all solutions, the concentration of precipitated material varied between 30 and 90%. SP/GA showed better yields (90%) at a pH close to 3.5 with a proportion below 2.0. Kong et al. (2017) evaluated complex coacervation between SP and GA and reported a 1:1 coacervation yield at pH 3.43, similar to that found in this study. **Figure 3** shows that as the pH and protein dilution ratio decreased, the concentration of PS/GA precipitate increased. The increase in precipitate concentration indicates greater formation of coacervate. For the other solutions (PP/GA and WP/GA), there were no significant effects ($p < 0.05$) of pH on the coacervation yield, but the WP/GA mixture showed a trend toward greater coacervate formation at pH values close to 3.5 and a dilution ratio between 1.8 and 0.7. Conversely, the PP/GA mixture showed a higher coacervate yield at pH values between 4.5 and 5.5 with a dilution ratio between 0.8 and

1.0. These results agree with another (Eratte et al., 2014), who found that the maximum precipitate yield of WP/GA at pH 3.7 was close to that found in the present study. These polymer solutions are colloidal systems, and variations in isoelectric point are related to the interactions between the proteins and GA. In the context of the preparation of microcapsules by coacervation, this phenomenon was explored as a function of pH and its relationship with changes in protein charge to identify the conditions resulting in greater interactions between the polymer components of the coacervate. The interactions that occur in coacervation are electrostatic, and the pH values of proteins in solution must be below the isoelectric points, where they are sufficiently protonated for coacervation to occur (Jun-xia,Hai-yan&Jian, 2011).

3.4 Morphological characterization of microcapsules

The images obtained under the light microscope and the size distribution of the microcapsules produced in the different treatments (WP, SP or PP/GA) containing a blend of essential oils (oregano, thyme and clove) prepared under the optimal conditions are shown in Figure 3.

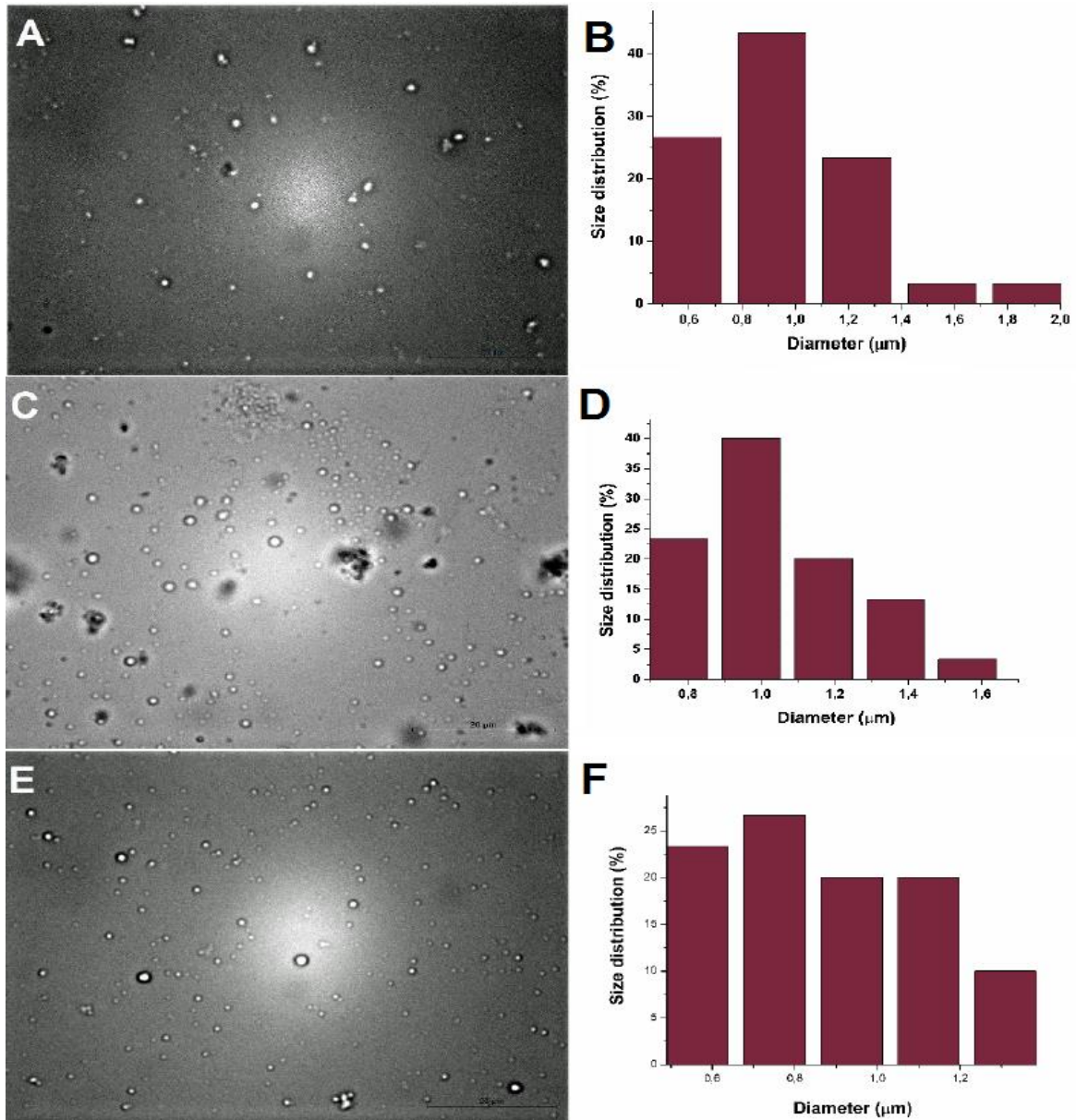


Figure 3. Micrographs and size distribution of microcapsules prepared with WP/GA (A, B), SP/GA (C, D) and PP/GA (E, F) containing a blend of essential oils (oregano, thyme, and clove).

For all treatments, the microcapsules had a rounded shape with well-defined walls. For SP/GA (Figure 3C), a strong tendency toward clumping was observed, a phenomenon characteristic of SP in microencapsulation processes (Jun-xia, Hai-yang & Jian, 2011). For each treatment and based on the measurements taken from the micrographs, a histogram of the mean microcapsule size was plotted. The WP/GA microcapsules had the narrowest size distribution

and a greater predominance of smaller microcapsules ranging from 0.273 to 1,874 μm , with a mean of 0.788 μm . SP/GA had sizes between 0.580 and 1,562 μm with a mean of 0.932 μm . The PP/GA microcapsules had a wider distribution, between 0.379 and 1,309 μm with a mean of 0.769 μm . Microparticles with varying sizes have been reported in the literature. In another study (Ahmadi et al., 2015), β -lactoglobulin/GA microcapsules had sizes ranging from 2 to 50 μm . Authors studied (Jun-xia, Hai-yan & Jian, 2011) the microencapsulation of orange oil with SP and GA and found a mean microcapsule size of 7.569 μm . Another (Yang et al., 2014) obtained microcapsules of vanilla oil prepared with chitosan and GA with sizes between 5.2 and 10.3 μm . These variations are related to the effects of different proportions of wall and core materials, pH, stirring time, the composition and origin of proteins and treatment method on the emulsion.

3.5 Determination of oil retention efficiency in microcapsules

The constituents of the essential oil microcapsules were analyzed by GC, and the results are shown in **Table 5**.

Table 5. Content of major compounds (thymol, carvacrol and eugenol) in the microcapsules and encapsulation efficiency.

Treatments	[] g/mL	Encapsulation efficiency(%)
EO blends	14.44	
WP/GA	10.68	73.97 \pm 0.162
SP/GA	12.07	83.54 \pm 0.120
PP/GA	8.10	56.07 \pm 0.095

The encapsulation efficiency (percentage of oil present in the microcapsules relative to the initial content in the emulsion) was obtained based on individual peak analysis of the major components of the blend of essential oils (thyme, oregano and clove): thymol, carvacrol and

eugenol.

The encapsulation efficiency ranged from 56 to 83.5% according to the wall material. The PP/GA microcapsules showed the lowest efficiency of 56.07%. This low efficiency of the PP/GA microcapsules is related to the low solubility of PP, which leads to a low availability of soluble proteins available for coacervation to occur. Barac´et al. (2015) noted the variability and low solubility of PP, in addition to the formation of unstable emulsions under certain conditions. Furthermore, they found that PP had a lower ability than SP to form an emulsion, which was also observed in this study. Conversely, the microcapsules prepared with SP/GA had the highest encapsulation efficiency of 83.54%.

3.6 Antimicrobial activity of the microcapsules

Table 6 shows the inhibition halos of the microcapsules containing the essential oil blend for *L. monocytogenes* and *W. viridescens*.

Table 6. Inhibition halos of microcapsules and oil blends.

	Inhibition Halo(mm)	
	<i>L. monocytogenes</i>	<i>W. viridescens</i>
WP/GA	18.15 ± 0.002 ^{A, a}	16.57 ± 0.01 ^{A, a}
SP/GA	22.34 ± 0.01 ^{B, a}	13.85 ± 0.02 ^{B, b}
PP/GA	18.74 ± 0.02 ^{AB, a}	14.41 ± 0.01 ^{B, b}
EO blends	16.98 ± 0.03 ^{C, a}	16.61 ± 0.05 ^{A, a}
PC	26.13 ± 0.04	22.39 ± 0.03

Means ± standard deviation, n = 3. PC - Positive Control, WP - Whey Protein, SP - Soy Protein, PP - Pea Protein, GA - Gum Arabic. Inhibition zone in mm. The values followed by different letters are significantly different (*Tukey*, $p \leq 0,05$) from each other, where the first letter represents the results displayed in the column and the second letter corresponds to the results displayed on the line.

There were significant differences among the evaluated treatments. The SP/GA microcapsules showed the greatest inhibition zone for *L. monocytogenes* at 22.34 mm, and the WP/GA microcapsules had the greatest inhibition zone for *W. viridescens viridescens*; however, all treatments were efficient, showing significant inhibition. The encapsulated essential oils

were more efficient than the free essential oil blend in inhibiting the growth of *L. monocytogenes*. For *W. viridescens*, the microencapsulated oils showed an inhibition halo only equal to or smaller than that of the free oil blend. These results agree with studies in the literature that demonstrate the efficacy of the microencapsulation process in protecting the active agent. Guarda et al. (2011) evaluated the antimicrobial activity of microcapsules composed of thymol and carvacrol and found that the encapsulated essential oil blend was efficient against *Escherichia coli*, *S. aureus*, *Listeria innocua*, *Saccharomyces cerevisiae* and *Aspergillus niger*. Another study (Arana-Sánchez et al., 2010) found that microcapsules of essential oil of *Lippia graveolens* had a two to four times higher antimicrobial efficacy against *E. coli*, *S. aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* than did pure oil. These differences in the diameter of the inhibition zone and, consequently, the greater microbial growth inhibition of microcapsules, may be related to the slower release of oil blends contained in microencapsulated systems and the prevention of excessive volatilization than observed for oils in free form. In this case, this protection contributed to the antimicrobial efficacy of the encapsulated active agent. Most likely, microencapsulation increased the retention of volatile compounds present in the essential oil blend.

3.7 Essential oil blend release versus microorganism growth

Figure 4 shows the growth profile for *L. monocytogenes* and *W. viridescens* over time, which was used to evaluate the oil release potential and its inhibitory effect.

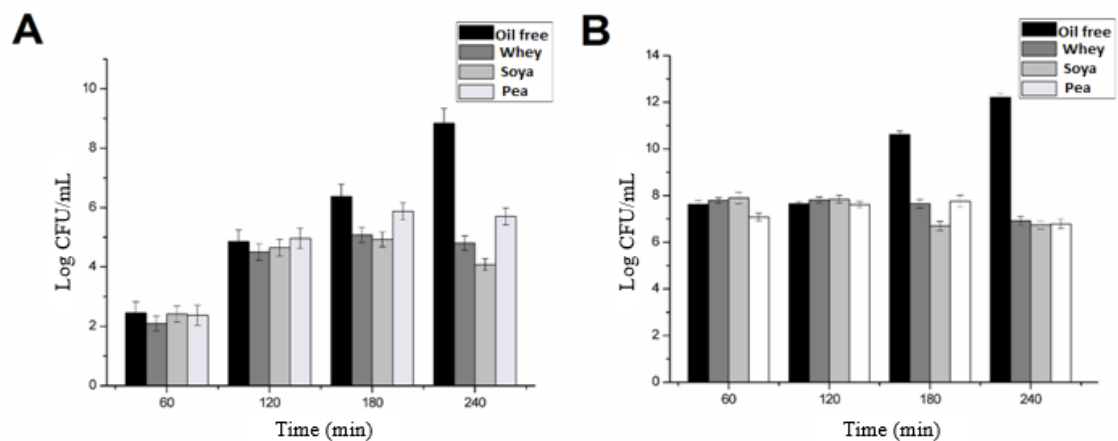


Figure 4. Influence of oil release from microcapsules on the growth profile of *L. monocytogenes* and *W. viridescens*.

A significant difference was observed between the treatments and the standard growth curve starting at 180 min for both evaluated microorganisms. Up to 120 min of evaluation, no significant differences were detected in the growth of microorganisms. The slow release of the essential oil blend until 120 min may be related to the affinity between the oils and the microcapsules, which retain their contents for a longer period when immersed in aqueous medium. SP and PP naturally have low solubility in water, and the influence of GA and the essential oil blend should also be considered. The apolar structures of proteins combined with GA have an affinity for apolar compounds because they contain a glucuronic acid fraction that develops negative charges around the particles. These factors generate a repulsion of charges that helps to stabilize the microparticles, slow the movement of oil particles and hinder their release in aqueous medium. Essential oils tend to be very volatile. Thus, slower release is an important factor in evaluating the antimicrobial effect of encapsulated essential oils since in food applications, this slow release can contribute to the preservation of essential oil constituents for longer in aqueous media (Nazzaro et al., 2012; Patel&Goyal, 2015).

Starting at 180 min, differences in the growth of the microorganisms are observed. For both cases, the microcapsules composed of SP/GA were associated with the lowest

microorganism growth profile compared to the standard curve, and the other microcapsules also showed a growth profile below the standard curve, which provides evidence of rupture or alteration of the permeability of the microcapsules and release of the essential oil blend. Furthermore, the free oil was not as efficient as the microcapsules in inhibiting microbial growth, probably due to its volatilization or chemical change. Similarly, other studies also reported higher antimicrobial activity in encapsulation systems with essential oils. Wang et al. (2009) found that calcium alginate microcapsules loaded with carvacrol showed better stability than the free active agent when it passed through a gastrointestinal digestion model. Hosseiniet al. (2013) reported a pattern of controlled release of nanoparticles loaded with oregano essential oil formed by ionic gelation of chitosan with sodium tripolyphosphate. Rapid release of the nonencapsulated material was observed for 3 h, and its release was slowed from 82% to 12% in the same period when encapsulated. The good antimicrobial activity of the microparticles observed after 240 min suggests that microencapsulation is an appropriate approach for the application of essential oils in food matrices as it prevents the degradation and loss of volatiles.

4 CONCLUSION

In general, SP microcapsules obtained the best results in terms of encapsulation efficiency, growth inhibition and release of the active agent over time, thus being the most appropriate treatment for application studies. This study provides a greater understanding of the functionality of plant proteins in microencapsulation processes and their function as encapsulating agents of essential oils and antimicrobial agents. It also demonstrates the applicability of the studied materials as encapsulating agents that protect and enhance the effects of essential oil constituents.

5 ACKNOWLEDGMENT

The team thanks the University of Lavras (UFLA), the Coordination of Improvement of

Higher Level Personnel (CAPES) for its PhD scholarship, the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) and the Foundation for Research of the State of Minas Gerais – FAPEMIG (cag – apq - 02487-16) for its financial support. This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001.

6 CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no competing financial interest.

7 REFERENCES

- Ahmadi, N., Nasirpour, A., Sheikhzeinodin, M., Keramat, J. (2015). Microencapsulation of ubiquinone using complex coacervation for functional yoghurt. *Food Science and Biotechnology*, 24, 895–904. <https://doi.org/10.1007/s10068-015-0116-x>.
- Arana-Sánchez, A., Estarrón-Espinosa, M., Obledo-Vázquez, E. N., Padilla-Camberos, E., Silva-Vázquez, R., Lugo-Cervantes, E. (2010). Antimicrobial and antioxidant activities of Mexican oregano essential oils (*Lippia graveolens* H. B. K.) with different composition when microencapsulated in β -cyclodextrin. *Letters in Applied Microbiology*, 50, 585–590. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2010.02837.x>.
- Bahram, S., Rezaei, M., Soltani, M., Kamali, A., Ojagh, S. M., & Abdollahi, M. (2013). Whey Protein Concentrate Edible Film Activated with Cinnamon Essential Oil. *Journal of Food Processing and Preservation*, 38, 1251–1258. <https://doi.org/10.1111/jfpp.12086>.
- Barac, M., Cabrilo, S., Pesic, M., Stanojevic, S., Zilic, S., Macej, O., Ristic, N. (2010). Profile and Functional Properties of Seed Proteins from Six Pea (*Pisum sativum*) Genotypes. *International Journal of Molecular Sciences*, 11, 4973–4990. doi: 10.3390/ijms11124973.
- Barać, M. B., Pešić, M. B., Stanojević, S. P., Kostić, A. Z., Čabrilo, S. B. (2015).

Techno-functional properties of pea (*Pisum sativum*) protein isolates-a review. *Acta Periodica Technologica*, 46, 1–18. <https://doi.org/10.2298/APT1546001B>.

Calo, J. R., Crandall, P. G., O'Bryan, C., Ricke, S. C. (2015). Essential oils as antimicrobials in food systems - A review. *Food Control*, 54, 111–119. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.12.040>

Carlsson, N., Borde, A., Wölfel, S., Åkerman, B., Larsson, A. (2011). Quantification of protein concentration by the Bradford method in the presence of pharmaceutical polymers. *Analytical Biochemistry*, 411, 116 - 121. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2010.12.026>.

Chaieb, K., Hajlaoui, H., Zmantar, T., Kahla-Nakbi, A. B., Rouabhia, M., Mahdouani, K., Bakhrouf, A. (2007). The chemical composition and biological activity of clove essential oil *Eugenia caryophyllata* (*Syzygium aromaticum* L. Myrtaceae): a short review. *Phytotherapy Research*, 21, 501–506. doi: 10.1002/ptr.2124.

Chen, B., Ding, Y., Xu, M., Wang, Q., Ren, Y. (2017). The influence of pH and enzyme cross-linking on protein delivery properties of WPI-beet pectin complexes. *Food Research International*, 105, 678–685. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.11.076>.

CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute (2017). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; 27th edition. Retrieved from <http://file.qums.ac.ir/repository/mmrc/clsi%202017.pdf> . Accessed March 2021.

Comunian, T. A., Boillon, M. R. G., Thomazini, M., Nogueira, M. S., de Castro, I. A., Favaro-Trindade, C. S. (2016). Protection of echium oil by microencapsulation with phenolic compounds. *Food Research International*, 88, 114–121. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.03.008>.

Croguennec, T., Tavares, G. M., Bouhallab, S. Heteroprotein complex coacervation: A generic process. (2017). *Advances in Colloid and Interface Science*, 239, 115–126. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2016.06.009>.

De Kruif, C. G., Weinbreck, F., Vries, R. (2004). Complex coacervation of proteins and anionic polysaccharides. *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, 9, 340–349. <https://doi.org/10.1016/j.cocis.2004.09.006>.

Dima, C., Cotârlet, M., Alexe, P., Dima, S. (2014). Reprint of “Microencapsulation of essential oil of pimento [*Pimenta dioica* (L) Merr.] by chitosan/k-carrageenan complex coacervation method.” *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 25, 97–105. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2014.07.008>.

Eghbal, N., Choudhary, R. (2018). Complex coacervation: Encapsulation and controlled release of active agents in food systems. *LWT - Food Science and Technology*, 90, 254–264. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.12.036>.

Eratte, D., Wang, B., Dowling, K., Barrow, C. J., Adhikari, B. P. (2014). Complex coacervation with whey protein isolate and gum arabic for the microencapsulation of omega-3 rich tuna oil. *Food & Function*, 5, 11, 2743–2750. <https://doi.org/10.1039/c4fo00296b>.

Friedman, M., Henika, P. R., Mandrell, R. E. (2002). Bactericidal activities of plant essential oils and some of their isolated constituents against *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, and *Salmonella enterica*. *Journal of Food Protection*, 65, 10, 1545–60. <https://doi.org/10.4315/0362-028x-65.10.1545>.

Glushkov, O. (2016). Study of cryoprotectors effect on oxidation processes at storage of frozen half-finished products. *Food Science and Technology - Ukraine*, 10, 4, 375–386. <https://doi.org/10.15673/fst.v10i4.248>.

Gnanasambandam, R., Heltiarachchy, N. S. (1995). Protein Concentrates from Unstabilized and Stabilized Rice Bran: Preparation and Properties. *Journal of Food Science*, 60, 1066–1069. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1995.tb06293.x>.

Guarda, A., Rubilar, J. F., Miltz, J., Galotto, M. J. (2011). The antimicrobial activity of microencapsulated thymol and carvacrol. *International Journal of Food Microbiology*, 146, 144–

150. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.02.011>.

Henika, G. R. (1982). Use of response surface methodology in sensory evaluation. *Food Technology*, 36, 96-101.

Hosseini, S. F., Zandi, M; Rezaei, M., Farahmandghavi, F. (2013). Two-step method for encapsulation of oregano essential oil in chitosan nanoparticles: Preparation, characterization and in vitro release study. *Carbohydrate Polymers*, 95, 50–56. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.02.031>.

Hudaib, M., Speroni, E., Di Pietra, A. M., Cavrini, V. (2002). GC/MS evaluation of thyme (*Thymus vulgaris* L.) oil composition and variations during the vegetative cycle. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 29, 4, 691–700. [https://doi.org/10.1016/S0731-7085\(02\)00119-X](https://doi.org/10.1016/S0731-7085(02)00119-X).

Hyldgaard, M., Mygind, T., Meyer, R. L. (2012). Essential Oils in Food Preservation: Mode of Action, Synergies, and Interactions with Food Matrix Components. *Frontiers in Microbiology*, 3, 1-24. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00012>.

Jansen-Alves, C., Maia, D. S. V., Krumreich, F. D., Crizel-Cardoso, M. M., Fioravante, J. B; da Silva, W. P; ... Zambiasi, R. C. (2019). Propolis microparticles produced with pea protein: Characterization and evaluation of antioxidant and antimicrobial activities. *Food Hydrocolloids*, 87, 703-711. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.09.004>.

Jun-xia, X., Hai-yan, Y., Jian, Y. (2011). Microencapsulation of sweet orange oil by complex coacervation with soybean protein isolate/gum Arabic. *Food Chemistry*, 125, 1267–1272. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.10.063>.

Kaushik, P., Dowling, K., Barrow, C. J., Adhikari, B. (2015). Microencapsulation of omega-3 fatty acids: A review of microencapsulation and characterization methods. *Journal of Functional Foods*, 19, 868–881. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2014.06.029>.

Klemmer, K. J., Waldner, L., Stone, A., Low, N. H., Nickerson, M. T. (2012). Complex

coacervation of pea protein isolate and alginate polysaccharides. *Food Chemistry*, 130, 710–715. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.07.114>.

Kong, X., Jia, C., Zhang, C., Hua, Y., Chen, Y. (2017). Characteristics of soy protein isolate/gum arabic-stabilized oil-in-water emulsions: influence of different preparation routes and pH. *RSC Advances*, 7, 31875–31885. <https://doi.org/10.1039/C7RA01472D>.

Le Priol, L., Dagmey, A., Morandat, S., Saleh, K., El Kirat, K., Nesterenko, A. (2019). Comparative study of plant protein extracts as wall materials for the improvement of the oxidative stability of sunflower oil by microencapsulation. *Food Hydrocolloids*, 95, 105-115. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.04.026>.

Lis-balchin, M., Deans, S. G. (1997). Bioactivity of selected plant essential oils against *L. monocytogenes*. *Journal of Applied Microbiology*, 82, 759-62. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.1997.00153.x>.

Liu, S., Cao, Y.-L., Ghosh, S., Rousseau, D., Low, N. H., Nickerson, M. T. (2020). Intermolecular Interactions during Complex Coacervation of Pea Protein Isolate and Gum Arabic. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 552–556. <https://doi.org/10.1021/jf902768v>.

Mendanha, D. V., Molina Ortiz, S. E., Favaro-Trindade, C. S., Mauri, A., Monterrey-Quintero, E. S., Thomazini, M. (2009). Microencapsulation of casein hydrolysate by complex coacervation with SPI/pectin. *Food Research International*, 42, 8, 1099–1104. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2009.05.007>.

Meng, Y; Cloutier, S. Gelatin and Other Proteins for Microencapsulation (2014). *In Microencapsulation in the Food Industry*, 227–239.

Murali, S., Kar, A., Patel, A. S., Kumar, J., Mohapatra, D., Dash, S. K. (2016). Encapsulation of rice bran oil in tapioca starch-soya protein isolate complex using spray drying. *Indian Journal of Agricultural Sciences*, 86, 984–91. <http://epubs.icar.org.in/.../1776>.

Nazzaro, F., Orlando, P., Fratianni, F., Coppola, R. (2012). Microencapsulation in food science and biotechnology. *Current Opinion in Biotechnology*, 3, 182–186. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2011.10.001>.

Niu, F., Zhou, J., Niu, D., Wang, C., Liu, Y., Su, Y., Yang, Y. (2015). Synergistic effects of ovalbumin/gum arabic complexes on the stability of emulsions exposed to environmental stress. *Food Hydrocolloids*, 47, 14–20. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2015.01.002>.

Patel, S., Goyal, A. (2015). Applications of Natural Polymer Gum Arabic: A Review. *International Journal of Food Properties*, 18, 986–998. <https://doi.org/10.1080/10942912.2013.809541>.

Pelegri, D. H. G., Gasparetto, C. A. (2005). Whey proteins solubility as function of temperature and pH. *LWT - Food Science and Technology*, 38, 77–80. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2004.03.013>.

Peng, C., Zhao, S.-Q., Zhang, J., Huang, G.-Y., Chen, L.-Y; Zhao, F.-Y, (2014). Chemical composition, antimicrobial property and microencapsulation of Mustard (*Sinapis alba*) seed essential oil by complex coacervation. *Food Chemistry*, 165, 560–568. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.05.126>.

Reyes-Jurado, F., López-Malo, A., Palou, E. (2016). Antimicrobial activity of individual and combined essential oils against foodborne pathogenic bacteria. *Journal of Food Protection*, 79, 309–315. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-15-392>.

Tan, H. L., Tran, T. M. V., Ton, N. M. N., Tran, T. T. T., Huynh, T. V., Nguyen, T. N., Quang, S. P., Le, V. V. M. (2017). Combination of whey protein and carbohydrate for microencapsulation of pumpkin (*Cucurbita* spp.) seed oil by spray-drying. *International Food Research Journal*, 24, 1227-1232. <http://www.ifrj.upm.edu.my>.

Ton, N. M. N., Tran, T. T. T., Le, V. V. M. (2016). Microencapsulation of rambutan seed oil by spray-drying using different protein preparations. *International Food Research*

Journal, 23, 123-128. <http://www.ifrj.upm.edu.my>.

Wang, Q., Gong, J., Huang, X., Yu, H., Xue, F. (2009). In vitro evaluation of the activity of microencapsulated carvacrol against *Escherichia coli* with K88 pili. *Journal of Applied Microbiology*, 107, 1781–1788. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04374.x>.

Yang, Z., Peng, Z., Li, J., Li, S., Kong, L., Li, P., Wang, Q. (2014). Development and evaluation of novel flavour microcapsules containing vanilla oil using complex coacervation approach. *Food Chemistry*, 145, 272–277. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.08.074>.

ARTIGO 2 – POTENCIAL ANTIMICROBIANO DE MICROCÁPSULAS DE PROTEÍNA DE SOJA/GOMA ARÁBICA CONTENDO BLENDAS DE ÓLEOS ESSENCIAIS PARA APLICAÇÃO EM LINGUIÇA FRESCAL

Norma NBR 6022 (ABNT, 2018)

RESUMO

A deterioração microbiana é uma das principais causas da perda de vida útil de produtos cárneos. Dessa forma, faz-se necessário a busca por novas possibilidades de conservação de linguiças frescas com alto potencial antimicrobiano, sem que haja perda da qualidade sensorial. Com este propósito, microcápsulas de proteína de soja/goma arábica 1:1 com 1:1 de blendas de óleos essenciais de orégano (*Origanum vulgare*), tomilho (*Thymus vulgaris*) e cravo (*Syzygium aromaticum*) (1:1:2) foram aplicadas em linguiça frescal com os seguintes tratamentos: Tratamento 1 – Linguiça + 1,25% de microcápsulas, Tratamento 2 – Linguiça + 0,625% de microcápsulas + 0,625% de blenda de óleos essenciais, Tratamento 3 – Linguiça + 1,25% de blenda de óleos essenciais, Tratamento 4 – Linguiça padrão sem adição de óleos essenciais. Posteriormente, as linguiças foram inoculadas com *Listeria monocytogenes*. As amostras foram embaladas a vácuo e armazenadas por 15 dias a 7 °C com medições e contagens de 3 em 3 dias. O crescimento da *Listeria monocytogenes* foi avaliado, bem como a mudança de coloração no produto. A partir do dia 6 foi observada uma diminuição do crescimento microbiano em T1 e T2 e contínuo crescimento para T3 e o controle. Este perfil se manteve até o 15º dia com ausência de crescimento em T2 a partir do 9º dia indicando a eliminação do microrganismo e inibição do crescimento microbiano em T1. Ao longo do tempo com a liberação dos óleos das microcápsulas houve interações entre a carne e a blenda de óleos ocasionando mudanças na cor vermelha. Para T1 e o controle houve diminuição da cor vermelha e aumento de L* indicando degradação do produto. Em T2 o comportamento foi inverso. Estes resultados entram em conformidade com os dados microbiológicos em que no T2 houve diminuição do crescimento do microrganismo a partir do sexto dia indicando a liberação e ação da blenda de óleos essenciais. Ao longo do tempo de estocagem estudado, verificou-se que T1 e T2 tiveram menor variação no pH indicando maior estabilidade em comparação aos produtos sem aplicação das microcápsulas. Em geral, com base nos resultados, constatou-se a ação antimicrobiana das microcápsulas no Tratamento 2, uma vez que houve menores variações de cor, maior estabilidade de pH e eliminação da *Listeria monocytogenes*, por meio da potencialização dos efeitos da blenda de óleos essenciais microencapsulados e livres. Estes resultados colaboram com a aplicação de microcápsulas de óleos essenciais em embutidos cárneos a partir de uma melhor compreensão de suas interações físico-químicas e biológicas.

Palavras-chave: *Listeria monocytogenes*; Embutidos; Microencapsulação.

1 INTRODUÇÃO

A carne de porco e seus derivados são uma importante fonte de nutrição composta de gordura e proteína. No entanto, há alguns fatores que podem comprometer a sua qualidade como o crescimento de microrganismos patogênicos e atividades metabólicas, principalmente, durante o armazenamento (BORCH, KANT-MUERMANS, *et al.*, 1996). A deterioração microbiana é uma das principais causas de perda de vida útil de embutidos e linguiças frescas, uma vez que alteram os compostos na carne, formando compostos tóxicos e prejudiciais à saúde. Por consequência, os fatores sensoriais como perda de cor e odor prejudicam a aceitação dos produtos por parte dos consumidores, visto que as expectativas de qualidade não são atendidas (HUGHES *et al.*, 2014; LUONG *et al.*, 2020)

A *Listeria monocytogenes*, principal agente causador de doença de origem alimentar (listeriose), é foco de preocupações em todo o mundo em termos de economia e saúde pública, devido às altas taxas de mortalidade decorrentes de severas infecções. A listeriose resulta, principalmente, da ingestão de alimentos contaminados, geralmente processados, armazenados sob refrigeração por longos períodos. Além disso, esta bactéria apresenta capacidade de crescer em uma faixa de pH de 5,0 a 9,6 e em concentrações de sal superiores a 10% (HUSSAIN, Ashraf, AHMED, *et al.*, 2011, REYES-JURADO, LÓPEZ-MALO, *et al.*, 2016), o que torna os produtos cárneos processados principais fontes de contaminação e vetores da doença (SHAMLOO, HOSSEINI, *et al.*, 2019). Em complemento, as linguiças são submetidas a um intenso manuseio durante o processamento, principalmente as artesanais, o que aumenta a probabilidade de contaminação (SOARES, PADILHA, *et al.*, 2021).

Uma das formas de prevenir e controlar a multiplicação desse microrganismo patogênico é o uso de conservadores químicos. No entanto, atualmente, um número crescente de consumidores está cada vez mais ciente dos potenciais efeitos adversos dos conservantes químicos, como a formação de compostos cancerígenos decorrente do uso de nitrato em produtos cárneos. Dessa forma, para atender ao avanço do comércio alimentício, em resposta às mudanças nos padrões de consumo e comportamento dos consumidores, as indústrias de alimentos e os profissionais da área estão cada vez mais pressionados a buscar novos conservantes naturais com potencial antimicrobiano, que ajudam a manter a qualidade e segurança dos produtos à base de carne, principalmente, durante o período de vida útil (HUSSAIN, Md Ashraf, SUMON, *et al.*, 2021).

Neste contexto, nos últimos anos, os óleos essenciais têm sido tema de pesquisas relacionadas ao seu uso como conservantes naturais, como substitutos promissores para aditivos

sintéticos, dada a ampla gama de atividades antimicrobianas e antioxidantes, capazes de manter a qualidade de produtos cárneos (BAPTISTA, HORITA, *et al.*, 2020). Entretanto, a alta volatilidade desses compostos faz com que a aplicação seja limitada a altas concentrações, o que implica em problemas sensoriais. A maioria dos óleos essenciais são quimicamente instáveis na presença de oxigênio, luz e altas temperaturas (BAKRY, ABBAS, *et al.*, 2016).

A utilização de biopolímeros associada às técnicas de microencapsulação pode ser uma estratégia promissora para a aplicação de óleos essenciais em matrizes alimentícias. Neste caso, espera-se que o agente ativo microencapsulado seja liberado de forma mais lenta e que se tenha uma menor percepção de seu sabor. Em estudos de Rutz *et al.* (2017) microencapsularam óleo de palma, contendo alto teor de carotenóides, com quitosana/goma xantana e quitosana/pectina, utilizando o método de coacervação complexa, seguida de atomização e liofilização. O processo de microencapsulação resultou em menores perdas do composto ativo e maior rendimento e eficiência de encapsulação. Além disso, o perfil de liberação tanto na água quanto no fluido gastrointestinal foi satisfatório. Kanokpanont *et al.*, (2018), avaliaram a estabilidade de antocianinas de extrato de amora microencapsulados com alginato/quitosana. Nos testes de digestibilidade, o material encapsulado apresentou menor perda de agente ativo comparado ao material não encapsulado. Com base no apresentado, este trabalho tem como objetivo a aplicação de microcápsulas de óleo essencial de orégano (*Origanum vulgare*), tomilho (*Thymus vulgaris*) e cravo (*Syzygium aromaticum*) em linguiças frescas inoculadas com *Listeria monocytogenes*. Em adição, avaliar a qualidade microbiológica e a estabilidade de cor de cada tratamento ao longo de 15 dias de armazenamento à 7 °C.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Preparo das microcápsulas proteína de soja/goma arábica por coacervação complexa

Soluções de 5% de proteína de soja (solúvel em pH 8,0), homogeneizada em homogeneizador ultrassônico (Ultrassom digital Sonifier, Modelo 450, Brason Ultrasonic Corporation), com 60% de amplitude por 5 min, foram combinadas com solução de goma arábica a 5% em proporções de 1:1. As soluções individuais foram agitadas durante 2 h e deixadas em repouso para hidratação completa por 24 h a 4°C. A proporção de 1:1:2 (v/v) de blenda de óleos essenciais de orégano (*Origanum vulgare*), tomilho (*Thymus vulgaris*) e cravo (*Syzygium aromaticum*) com 0,5% de Tween 80 (m/v) foram adicionadas na solução de proteína de soja e submetido ao homogeneizador ultrassônico por 15 min a uma amplitude de 60%

correspondente a uma energia ultrassônica de 864 J/mL. Em seguida, a solução de goma arábica foi vertida nas emulsões proteicas e agitada durante 15 min a 300 rpm utilizando um agitador magnético. Em seguida, o pH da emulsão foi ajustado para o pH ideal de coacervação (3,5) usando HCl 0,1 N (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha). As microcápsulas formadas foram mantidas a 5 °C durante 24 h para assegurar a formação completa de coacervados complexos (KLEMMER *et al.*, 2011; NIU *et al.*, 2015).

2.2 Fabricação de linguiça frescal

Para o preparo da linguiça frescal foi utilizada uma formulação típica de linguiça observada na Tabela 1, sendo as concentrações de microcápsulas escolhidas com base nos ensaios microbiológicos *in vitro*. Foram elaborados 4 tratamentos: Tratamento 1 – Linguiça + 1,25% de microcápsulas; Tratamento 2 – Linguiça + 0,625% de microcápsula + 0,625% de blenda de óleos essenciais; Tratamento 3 – Linguiça + 1,25% de blenda de óleos essenciais; e Tratamento 4 – Linguiça padrão sem adição de óleos essenciais. Para a avaliação da vida útil foram coletadas 25 g de amostras de cada tratamento. Para tanto, as amostras foram embaladas a vácuo e submetidas a um intervalo de 15 dias a 7 °C com medições de estabilidade de cor e contagens de celular vegetativas de 3 em 3 dias.

Tabela 1 - Formulação utilizada para a elaboração das linguiças.

Ingredientes	Quantidade (g/100 g)
Carne suína	80,0
Toucinho	20,0
Água	15,0
Sal	2,00
Microcápsulas	0,00 a 1,25%

Para a produção das linguiças, a carne e toucinho foram triturados em moedor elétrico com adição dos demais aditivos (água, sal e porcentagem de microcápsulas) para cada tratamento. Em seguida, os ingredientes foram misturados manualmente, até a completa homogeneização da massa. Na etapa seguinte, a massa permaneceu em um processo de cura a 5 °C por 5 h em câmara fria. Posteriormente, foi efetuado o embutimento em tripa natural suína, em gomos de aproximadamente 10 cm (LISERRE *et al.*, 2002). As análises realizadas nos produtos finais foram em triplicata.

2.3 Qualidade microbiológica

As amostras destinadas à análise microbiológica foram inoculadas com *Listeria monocytogenes* (ATCC 19117) em 10^5 UFC/g, homogeneizadas e separadas em porções de 25 g. Posteriormente, as embalagens foram seladas a vácuo e armazenadas a 7 °C durante 15 dias. As embalagens, contendo 25 g de linguiça foram abertas de forma asséptica e foram adicionados 225 mL de água peptonada 0,1% (m/v), com posterior homogeneização em Stomacher Metroterm® (490 golpes/min) por 2 min. Após homogeneização e realização das diluições, alíquotas de 100 µL foram plaqueadas em Oxford Agar e incubadas a 37 °C por 48 h. As contagens de células vegetativas foram realizadas após 0, 3, 6, 9, 12 e 15 dias de armazenamento a 7°C (CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE, 2003).

2.4 Medição da cor instrumental e pH

As medidas da estabilidade de cor foram feitas em Colorímetro portátil (MiniScan XE, Hunter Lab), no sistema CIELab (L^* , a^* , b^*), utilizando o iluminante C com abertura de 10°. Os valores de pH das amostras foram medidos pela inserção de um eletrodo combinado, acoplado a um potenciômetro (DM20-Digimed, São Paulo, SP, Brasil). Foram utilizados os mesmos parâmetros das amostras das análises microbiológicas, sendo preparadas amostras específicas para a análise de cor e pH em intervalos de 3 dias por 15 dias. A cor e pH foram medidas em 3 locais aleatórios de cada amostra. Nos tratamentos medimos os parâmetros de clareza (L^*), o componente do vermelho/verde (a^*) e do amarelo/azul (b^*) (LOURENÇO, FRAQUEZA, *et al.*, 2020).

2.5 Análise estatística

Uma equação de regressão polinomial (Equação 1) foi ajustada de forma generalizada aos dados para avaliar cada parâmetro testado.

$$\hat{Y} = a + bx + cz + dxz + ex^2 + fz^2 \quad (1)$$

Em que, \hat{Y} corresponde aos parâmetros analisados, x é a concentração de microcápsulas

de óleo essencial (%), z é o tempo de armazenamento (dias), e $a, b, c, d, e, f, g, h, i, j$ e k são os coeficientes do modelo. Foi realizada análise de regressão em nível de significância de 5%, para os resultados de cada tratamento em relação às variáveis pH e cor. A análise de variância (ANOVA) foi utilizada para examinar a significância estatística dos termos na equação de regressão utilizando o software estatístico Statistical Analysis System (SAS University Edition, Cary, USA, 2016).

3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Por meio da equação do modelo, que prevê o efeito das variáveis independentes na variação dos valores experimentais dos parâmetros analisados (Tabela 2), foi possível verificar que, em geral, os efeitos isolados de cada variável e a interação entre elas tiveram influência significativa ($p < 0,05$) sobre cada variável resposta. O modelo sugerido foi um polinômio quadrático ($p < 0.0001$), que apresentou bom coeficiente de determinação ($R^2 > 0.80$).

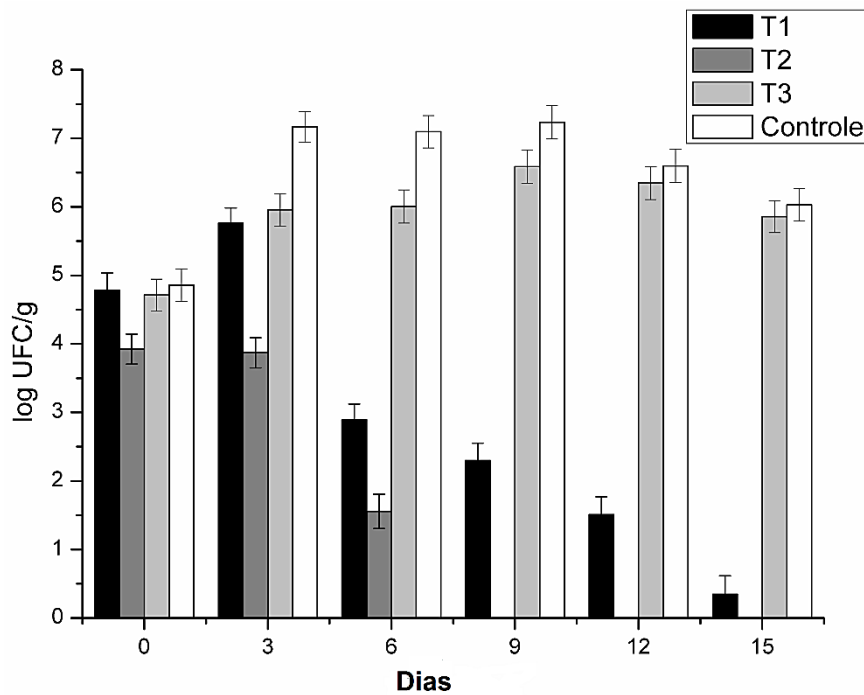
A equação do modelo revela o efeito individual negativo da adição das microcápsulas contendo o óleo essencial (x), com exceção do parâmetro L^* , e o efeito positivo do tempo de armazenamento (z), com exceção para o parâmetro a^* . A interação entre as variáveis concentração de microcápsulas e o tempo de armazenamento (xz) apresentou magnitude positiva apenas para o parâmetro a^* , sendo que não houve interação ($p > 0.05$) entre essas variáveis para o parâmetro L^* . Em suma, com base nos valores numéricos da equação e nas constatações apresentadas sobre os efeitos isolados de cada variável e das interações entre elas, é possível inferir que a presença das microcápsulas favoreceu a inibição do crescimento da *Listeria monocytogenes*, bem como a estabilidade da cor e do pH, com o passar dos dias de armazenamento, o que aponta, portanto, a liberação e ação da blenda dos óleos essenciais.

Tal comportamento pode ser visualmente entendido por meio das Figuras 1, 2 e 3, que representam o perfil de inibição da *Listeria monocytogenes* inoculada e as mudanças na coloração (parâmetros L^* , a^* e b^*) e no pH de cada tratamento da linguiça frescal armazenadas à 7 °C por 15 dias, respectivamente.

3.1 Qualidade microbiológica

Na Figura 1 são apresentados os resultados do crescimento de *Listeria monocytogenes* em relação aos 3 tratamentos e ao controle.

Figura 1 - Perfil de inibição de *Listeria monocytogenes* inoculada em linguiça fresca, mantida à 7 °C durante 15 dias.



Fonte: Do autor (2021).

Houve influência da adição das microcápsulas e tempo de armazenamento ($p < 0,05$) em todos os tratamentos (Figura 1 e Tabela 2). Entre o tempo 0 e o 3° dia é observado um crescimento contínuo de T1, T3 e T4 com T2 permanecendo sem diferenças significativas. A partir do dia 6 é observado uma diminuição do crescimento microbiano em T1 e T2 e contínuo crescimento para T3 e o controle. Este perfil se mantém até o 15° dia com ausência de crescimento em T2 a partir do 9° dia indicando eliminação do microrganismo e inibição do crescimento microbiano em T1. Os comportamentos de T1 e T2 do sexto dia em diante é explicado pela liberação da blenda de óleos essenciais das microcápsulas. O rompimento da estrutura das microcápsulas ocorre por meios das interações entre as frações hidrofóbicas da carne com as estruturas das microcápsulas. Conforme apresentado por Pereira et al., (2018), a liberação controlada de micropartículas apresenta a difusão como um dos principais mecanismos de liberação, pois propicia a liberação do material ativo através da matriz (material de parede), passando de uma região mais concentrada para uma de menor concentração. Esse mecanismo geralmente depende da geometria da partícula e do tipo de material de parede utilizado, e podem ser influenciados pelo solvente, difusão, degradação, fratura da partícula e pela ação de temperatura, pH e solubilidade do meio. Os autores ainda completam que a

liberação pode ocorrer por biodegradação dos materiais de parede e pela ruptura mecânica, que dependem da ação da temperatura e do pH do meio. Ainda em relação ao T2, podemos observar comportamento distinto dos demais onde há efeito bactericida através da junção de microcápsulas e blendas de óleos livre. Os óleos essenciais são muito voláteis e podem diminuir seus efeitos ao longo do tempo. Com a aplicação de óleo livre e óleo encapsulado há maior controle no crescimento microbiano. No tempo 0, temos óleos essenciais aprisionados, mas a fração livre começa a interação com o meio cárneo. No sexto dia há a liberação do óleo encapsulado potencializando a ação antimicrobiana o que fica evidente a partir do nono dia com a inativação da bactéria. Há estudos na literatura relatando a eficiência do processo de microencapsulação de óleos essenciais em relação a sua ação antimicrobiana frente a *Listeria monocytogenes*. Baldin et al. (2016), avaliaram a adição do extrato microencapsulado de jabuticaba em linguiça frescal, onde a partir do 4º dia de armazenamento as contagens de microrganismos diminuíram nos tratamentos com extrato microencapsulado em comparação aos extratos livres apresentando resultados semelhantes ao deste trabalho. Huq et al. (2015), avaliaram a ação antimicrobiana em *Listeria monocytogenes* com microcápsulas de óleo essencial de orégano (*Origanum compactum*) e óleo essencial de canela (*Cinnamomum cassia*) em presunto. A microencapsulação dos óleos aumentou a ação antimicrobiana em relação ao microrganismo em comparação aos óleos livres.

Os componentes presentes em maiores quantidades nos óleos essenciais (85%) são denominados majoritários, bem como são os responsáveis por sua atividade antibacteriana; embora os componentes presentes em menores concentrações, denominados elementos traços também podem exercer tal atividade, possivelmente pelo sinergismo entre eles (BURT, 2004). O eugenol, o carvacrol e o timol são os compostos majoritários dos óleos de cravo-da-índia, orégano e tomilho, respectivamente (VEIGA, APARECIDA DA SILVA-BUZANELLO, *et al.*, 2019). Esses compostos fenólicos possuem atividade antioxidante e são os principais responsáveis pela ação contra patógenos de origem alimentar como a *Listeria monocytogenes* e essa atividade foi sustentada, neste trabalho, pela ação dos compostos fenólicos presentes na blenda de óleos essenciais que uma vez microencapsulados tem seus efeitos potencializados, principalmente, devido a menor taxa de difusão. A eficácia desses agentes pode ser elucidada pela atuação dos mesmos em diversos sítios-alvo da célula bacteriana. Estes mecanismos de ação estão relacionados a habilidade em permear as células microbianas causando distúrbio da membrana citoplasmática, interrompendo a força próton motriz, o fluxo de elétrons, o transporte ativo além de causar a coagulação do conteúdo celular, culminando em morte celular

(CALO *et al.*, 2015; DA SILVA *et al.*, 2021). Especificamente, o carvacrol e o timol (compostos hidrofóbicos) agem na parede celular bacteriana, destruindo-a, uma vez que penetram na estrutura lipídica da membrana celular, levando a desnaturação de proteínas e tornando a célula permeável. Como resultado, ocorre o extravasamento do material citoplasmático, lise celular (membrana externa danificada) e conseqüentemente, morte celular (BAKKALI, AVERBECK, *et al.*, 2008, HUSSAIN, Md Ashraf, SUMON, *et al.*, 2021) e o eugenol, conhecido por ser um forte antioxidante, atua inibindo a oxidação da nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida (NADH), diminuindo os níveis de ATP nas células bacterianas; age na membrana citoplasmática, afetando o transporte de íons, alterando o perfil de ácidos graxos e atua também sobre diferentes enzimas bacterianas, incluindo ATPase, histidina carboxilase, amilase e protease (APOLÓNIO, FALEIRO, *et al.*, 2014). Em seu trabalho, Pinelli *et al.* (2021) avaliaram a atividade antioxidante de diferentes combinações de óleos essenciais, dentre as quais continham o óleo essencial de canela que contém o composto eugenol e o óleo essencial de orégano que contém o carvacrol e observaram que os óleos essenciais utilizados apresentaram efeitos antioxidantes. Os achados neste trabalho são suportados pelo trabalho de Ouattara *et al.* (1997), que demonstraram que os óleos essenciais que possuem como compostos majoritários o timol, carvacrol e eugenol apresentam maior atividade antimicrobiana do que outros óleos constituídos por outros componentes majoritários, o que pode ser confirmado pela efetiva atividade antibacteriana obtida no presente estudo.

Trabalhos comprovando a ação de óleos essenciais e/ou seus compostos majoritários contra *Listeria monocytogenes* são encontrados na literatura. Garcia-Garcia, López-Malo e Palou (2011), testaram os componentes majoritários carvacrol, timol e eugenol, bem como suas misturas binárias e ternárias na inativação de *Listeria innocua* e observaram que o agente antimicrobiano individual mais eficaz foi o carvacrol, seguido pelo timol e depois pelo eugenol com concentrações mínimas bactericidas (MBCs) de 150, 250 e 450 mg kg⁻¹, respectivamente. Observaram também que a mistura binária mais eficaz foi 75 mg kg⁻¹ de carvacrol e 62,5 mg kg⁻¹ de timol. Além disso, a mistura ternária carvacrol-timol-eugenol nas concentrações de 75, 31,25 e 56,25 mg kg⁻¹, correspondentemente, foi a mais eficaz para a inativação de *L. innocua*. Os autores concluíram que misturas binárias e ternárias desses 3 agentes antimicrobianos naturais funcionaram adequadamente para inativar *L. innocua*. Huq *et al.* (2015), avaliaram o efeito antimicrobiano de formulações microencapsuladas contendo óleo essencial de orégano (*Origanum compactum*; 250 µg/mL), óleo essencial de canela (*Cinnamomum cassia*; 250 µg / mL) e *nisina* (16 µg/mL) com irradiação γ de forma isolada e em combinações contra *Listeria*

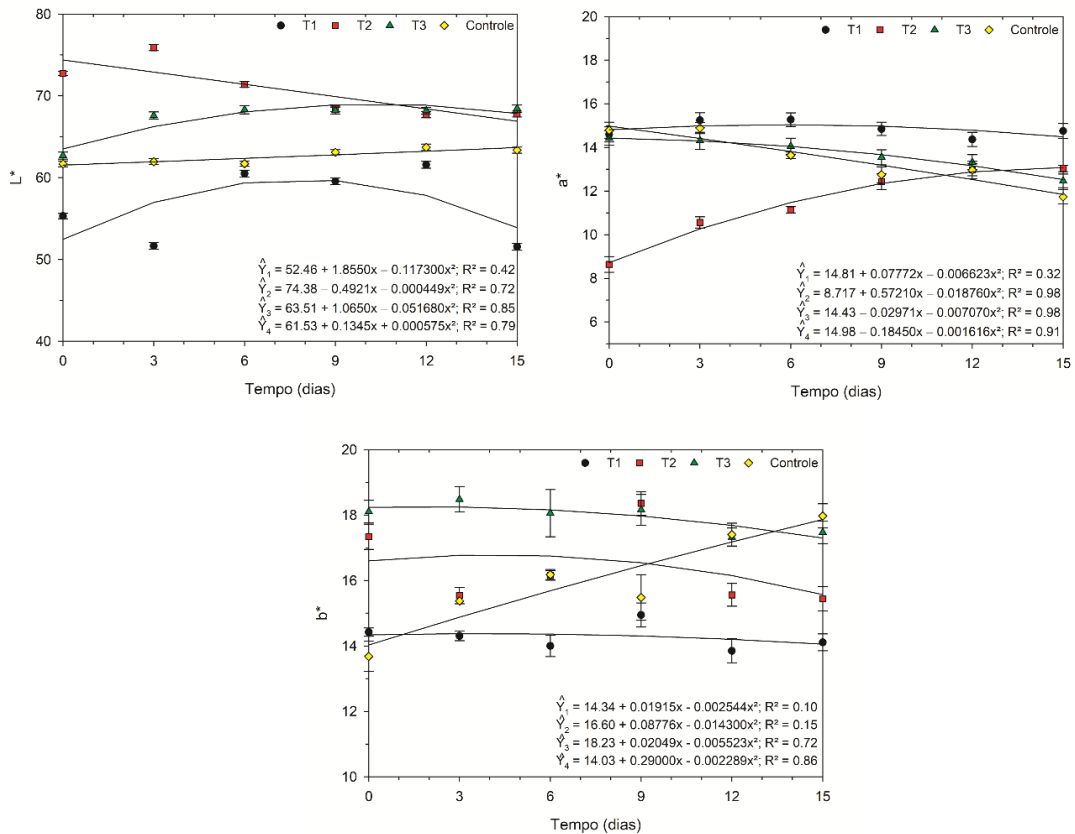
KKKKKK

monocytogenes em ready-to-eat (RTE, alimentos prontos para consumo) e observaram que a microencapsulação de óleos essenciais-nisina e tratamento com irradiação γ em combinação, apresentou efeito antimicrobiano sinérgico durante o armazenamento do produto e que a microencapsulação melhorou significativamente ($p \leq 0,05$) a radiosensibilidade de *L. monocytogenes*. Chen, Zhang e Zhong (2014), avaliaram o efeito antimicrobiano de eugenol e o timol co-encapsulados em nanocápsulas de zeína/caseína secas por spray-drying no controle de *Escherichia coli* O157: H7 e *Listeria monocytogenes* Scott A, e observaram que os compostos encapsulados apresentaram liberação controlada em 24 h, com o eugenol encapsulado apresentando taxa de liberação superior ao timol. O eugenol encapsulado e o timol estavam presentes no soro de leite em uma concentração muito menor do que suas concentrações gerais (2,5 mg / mL cada) e solubilidade, mas efeitos bactericidas e bacteriostáticos foram observados para *Escherichia coli* O157: H7 e *Listeria monocytogenes* Scott A, respectivamente. Concluíram, portanto, que as cápsulas secas por spray-drying podem ter o potencial de serem usadas como conservantes antimicrobianos em produtos alimentícios. Upadhyay *et al.* (2013) estudaram o efeito de compostos antimicrobianos derivados de plantas GRAS contra *L. monocytogenes* em salsichas, aplicando-os como tratamentos de imersão pós-processamento. A superfície das salsichas foi inoculada com uma mistura de cinco cepas de *L. monocytogenes* (~ 6,0 log CFU por salsicha) e tratada a 55 °C (60 s) e 65 °C (30 s) em água deionizada estéril ou água com como ácido β -resorcílico (1,5%), carvacrol (0,75%) e trans-cinamaldeído (0,75%) sozinho. Em seguida, as amostras foram embaladas a vácuo (VP) e mantidas a 4 ° C por 70 dias. Eles descobriram que a aplicação de compostos derivados de plantas como imersão antimicrobiana foi eficaz na prevenção do crescimento de *L. monocytogenes* em salsichas durante o armazenamento refrigerado e concluíram que compostos antimicrobianos derivados de plantas podem ser eficientemente utilizados como mergulhos pós-processamento para diminuir *L. monocytogenes* em salsichas. Moon *et al.* (2017), estudaram o efeito de sinergismo do molho de soja e molho teriyaki com carvacrol ou timol (0,3 e 0,5%) como compostos naturais comuns no controle de *L. monocytogenes* em carne marinada armazenada a 4 ° C por 7 dias. Eles descobriram que *L. monocytogenes* não foi inibida pelo uso de molho teriyaki sozinho, enquanto o molho teriyaki em combinação com 0,5% de carvacrol ou timol inativou *L. monocytogenes* durante 7 dias de armazenamento. Portanto, estes estudos confirmam a ação anti-*Listeria* de óleos essenciais e/ou seus compostos bioativos.

3.2 Medição da cor instrumental e pH

No desenvolvimento de novos aditivos, a cor é um dos parâmetros que dão indícios da qualidade de produtos cárneos, além disso é um dos principais métodos de avaliação sensorial pelos consumidores. Diversas reações físico-químicas e biológicas ocorrem na carne após o abate, processamento e armazenamento do produto final. Nesses aspectos, a deterioração e consequentemente a descoloração da carne podem ser notadas (HUGHES, OISETH, *et al.*, 2014). As análises de clareza (L^*), componente vermelho (a^*), e amarelo (b^*) podem ser observadas nos tratamentos na Figura 2.

Figura 2 – Análises de luminosidade (L^*), a^* e b^* ao longo de 15 dias de armazenamento a 7°C.



Fonte: Do autor (2021).

A luminosidade (L^*) é o parâmetro que caracteriza o grau de claridade da cor, podendo variar do preto ao branco, indo de 0 (escuro) a 100 (claro). O índice de vermelho (a^*) é o parâmetro que representa a variação da intensidade da cor, variando do verde ao vermelho no

sólido de cor. Valores positivos de a^* (de 0 a +50) representam a cor vermelha do produto. Já valores negativos de a^* (de 0 a -50) representam a coloração verde; e o índice de amarelo (b^*) representa tonalidades que vão do azul (valores negativos) ao amarelo (valores positivos) no sólido de cor (RAMOS; GOMIDE, 2007).

Conforme determinado pelo modelo da equação (Tabela 2) e observado na Figura 2 houve efeito das variáveis estudadas ($p < 0,05$) em todos os tratamentos. Em relação ao parâmetro L^* pode-se observar que em T1 houve uma pequena diminuição de luminosidade. Em T2 houve queda a partir do 6º dia nos dando indícios de liberação dos óleos aprisionados nas microcápsulas, estando em conformidade com os resultados microbiológicos neste mesmo período. Nos tratamentos T3 e no controle houve aumento da clareza ao longo dos dias de armazenamento. O parâmetro de clareza fornece indícios de processos oxidativos que ocorrem na superfície das amostras. Neste caso, nas amostras T3 e controle houve maior acúmulo de exsudado na superfície das amostras relacionados a desnaturação das proteínas e alterações físico-químicas. Estes fatores fazem com que a luminosidade das amostras aumente.

Outro parâmetro crítico gerado pela análise instrumental da cor em produtos cárneos é o índice de vermelho (a^*) e, ao caracterizar a cor vermelha, avalia-se a estabilidade destes produtos (GARCÍA-ESTEBAN, ANSORENA, *et al.*, 2003). As medidas de a^* , principal fator que avalia a vermelhidão da carne, apresentaram comportamento inverso ao fator L^* . Para T1 e T2 foi observado aumento de a^* e para T3 e controle uma diminuição de a^* . Este fenômeno nos faz concluir que ao longo do tempo com a liberação dos óleos das microcápsulas houve interações entre o embutido cárneo e a blenda de óleos ocasionando aumento da cor vermelha em T1 e T2. De acordo com Hussain *et al.* (2021), os compostos fenólicos presentes nos óleos essenciais são os principais responsáveis por retardar a oxidação lipídica nos alimentos, pois são compostos por propriedades redox que os tornam quelantes de metal, doadores de hidrogênio, agente redutor e supressor de oxigênio singlete. Esses fenômenos relatados confirmam a liberação das microcápsulas sobre os tratamentos 1 e 2 no mesmo intervalo de tempo. Para T3 e o controle houve diminuição da cor vermelha e aumento de L^* nos dando indícios de degradação do produto devido a maior exsudação e alterações físico-químicas.

Tabela 2 - Equação de regressão polinomial para as linguiças frescas contendo óleo essencial durante armazenamento de 15 dias à 7 °C.

Variáveis resposta	Modelo de Regressão: $\hat{Y} = a + bx + cz + dxz + ex^2 + fz^2$						R^2_{REG}	$P > F$
	a	b	c	d	e	f		
<i>Listeria monocytogenes</i> (log UFC/g)	5,72340	- 9,69052	0,17217	- 0,34040	7,69326	- 0,00982	0,9041	< 0,0001
L*	63,58723	24,94844	0,64112	-	- 25,21600	- 0,04224	0,8035	< 0,0001
a*	14,13261	- 9,10686	-	0,17683	7,03964	- 0,00678	0,8327	< 0,0001
b*	16,53545	- 1,23729	0,07713	- 0,10815	- 1,98364	-	0,8178	< 0,0001
pH	5,56435	- 0,32847	0,04408	- 0,01449	0,23218	- 0,00150	0,8636	< 0,0001

x = microcápsulas contendo óleo essencial (%); z = tempo de armazenamento (dias); a , b , c , d , e , and f = coeficientes do modelo; R^2 = coeficiente de determinação.

Este fenômeno observado de exsudação está diretamente ligado com as mudanças e interações físico-químicas no produto cárneo. Brewer (2011) relata que o parâmetro que traz mais informações a respeito da intensidade visual da cor rósea característica de produtos cárneos curados é a luminosidade, sendo o parâmetro de maior influência na qualidade de produtos cárneos. Em produtos cárneos, as diferenças no parâmetro L^* têm sido associadas com variações no teor de água e seu movimento em direção a superfície; adição de aditivos; pH; quantidade intramuscular de gordura e capacidade de retenção de água (AMARAL et al., 2012). As variações dos índices de amarelo b^* foram menores em comparação aos demais parâmetros, entretanto podemos observar uma tendência a decréscimo de T1, T2 e T3 e um aumento para o controle. Os valores de índice de amarelo (b^*) são influenciados, principalmente, pelas características dos alimentos. Porém, alterações no pH, oxidação, atividade de água, e tipo de óleo essencial utilizado também podem afetar esse parâmetro (COFRADES, SERRANO, et al., 2004). Neste contexto o controle demonstrou resultados coerentes com teorias encontradas na literatura tendo aumento de b^* e diminuição de a^* , demonstrando que sem a presença dos óleos o perfil de degradação e alterações físico-químicas é intensificado. Segundo Sheridan et al. (2007), as reduções nos valores de a^* e aumento nos valores de b^* são indicativos de descoloração, neste caso degradação dos produtos cárneos.

Tais fatores estão relacionados com a proteólise da carne que ocasiona uma liberação de água na superfície aumentando a dispersão de luz pelo Colorímetro. Devido ao processo de deterioração no armazenamento da carne pela ação de microrganismos e agentes oxidantes, há modificações nas estruturas proteicas e nas cadeias de aminoácidos ocasionando o processo de exsudação (RUAN, ZHANG, et al., 2019). Entretanto nos tratamentos 1 (microcápsulas) e 2 (microcápsulas mais óleo puro) as alterações no índice de clareza são menores. No sexto dia de armazenamento das amostras dos tratamentos 1 e 2, a clareza diminuiu, o que pode estar relacionado com a liberação das microcápsulas e suas interações com o produto. Provavelmente ocorreram interações entre a blenda de óleos liberada com as frações hidrofóbicas das estruturas proteicas da carne e gordura. Resultados similares foram reportados no trabalho de Lourenço et al. (2020), onde houveram mudanças no parâmetro L a partir do 5º dia de armazenamento indicando interação com os aditivos, nos tratamentos com adição de microcápsulas de alginato com extrato de casca de abacaxi. Estes resultados entram em conformidade com os dados microbiológicos onde o tratamento 2 reduziu o crescimento de *Listeria monocytogenes* a partir do sexto dia, indicando a liberação e ação da blenda de óleos essenciais. A medida que a carga

microbiana diminuiu, reduziram-se as variações nos parâmetros de cor, confirmando a ação antimicrobiana das microcápsulas. No trabalho de XU et al., 2019 são encontrados resultados semelhantes. Nos estudos com microencapsulação de extrato de amoreira aplicados em carne de porco, os parâmetros de cor permaneceram mais estáveis nos tratamentos com o extrato encapsulado através de interações entre a goma arábica e as proteínas da carne comportamento similar ao encontrado neste trabalho.

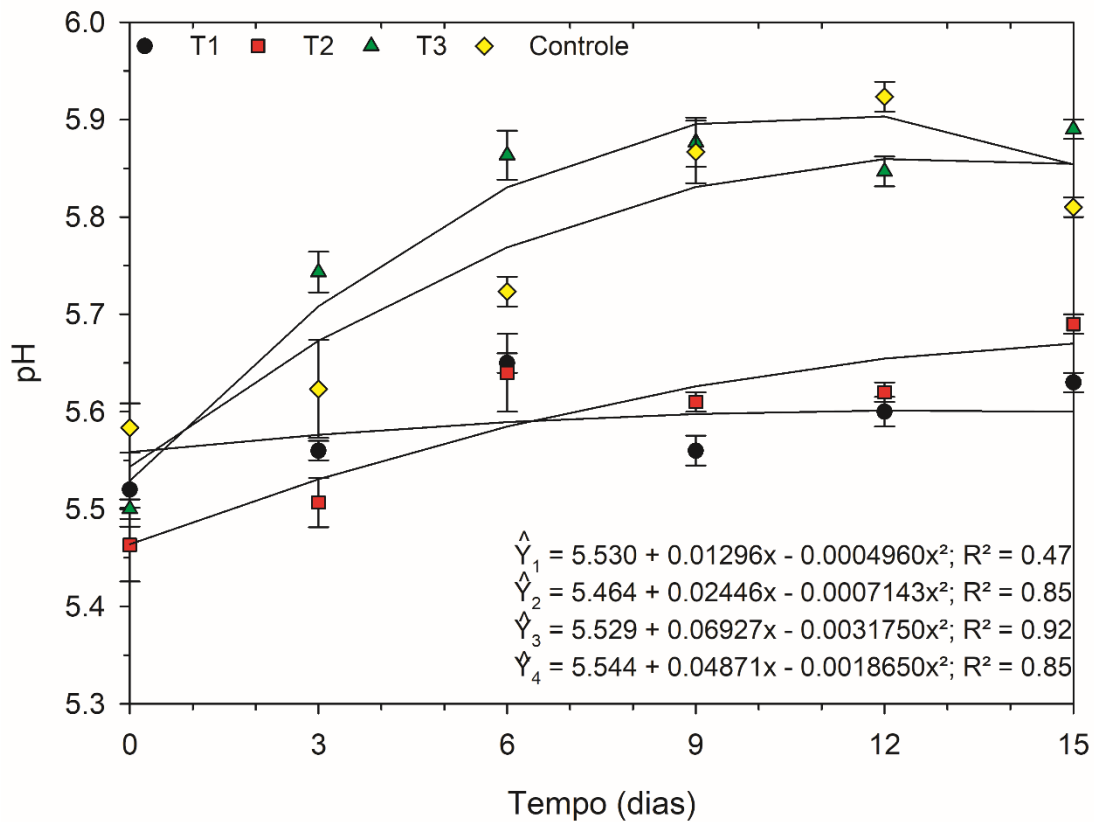
A cor da carne é uma das características importantes para os consumidores. Existem várias maneiras de reduzir a deterioração da cor na carne. Entre eles está a aplicação de antioxidantes, como os óleos essenciais. Semenova et al. (2019) realizaram um estudo comparativo dos efeitos de óleos essenciais de *Mentha spicata L.*, *Citrus sinensis*, *Cinnamomum zeylanicum* e *Rosmarinus officinalis* na estabilidade de cor de carne picada. Os óleos essenciais ao teor de 1,0% foram adicionados à carne picada. A carne foi mantida (1) por 15 min sob radiação ultravioleta ou; (2) embalado sob vácuo e mantido por 5 dias a 6°C. Em seguida, as embalagens foram abertas e a carne mantida por 15 min sob radiação ultravioleta. Foi observado que a adição de óleo essencial promoveu proteção dos indicadores de cor sob radiação ultravioleta. Ainda, a estabilidade da cor da carne diminuiu como resultado do armazenamento sob vácuo principalmente devido à redução, exceto para o amarelecimento. O óleo de canela e alecrim apresentaram o maior efeito na estabilidade da cor em comparação com outros antioxidantes.

Um estudo avaliando a substituição parcial do milho por glicerina e óleos essenciais de caju (*Anacardium occidentale*) e mamona (*Ricinus communis*) na dieta de touros mestiços terminados em confinamento, foi realizado por Prado et al. (2016). Os autores observaram que os óleos essenciais influenciaram na cor do produto, embora a cor visual e instrumental tenha sido semelhante entre os touros alimentados com outras dietas. A cor visual foi classificada como vermelho cereja a vermelho. Da mesma forma, os valores instrumentais de cor L*, a* e b* foram considerados aceitáveis. Além disso, houve uma melhora na cor, no sabor, na maciez e na preferência dos consumidores da carne. Sharma et al. (2017) avaliaram o efeito antimicrobiano e antioxidante de óleos essenciais de cravo, óleo de manjerição, óleo de tomilho e óleo de cássia sobre a qualidade de embutidos de frango in natura (crus, prontos para cozinhar). Os óleos essenciais foram incorporados a 0,25; 0,125; 0,25 e 0,125% nas linguças de frango, e o produto foi mantido por 20 dias em temperatura de refrigeração (4 ± 1°C) e a qualidade foi avaliada. Os estudos revelaram que o número de substâncias reagentes ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) do controle era significativamente mais alto do que nos tratamentos,

enquanto que os fenólicos totais e a atividade DPPH eram significativamente mais baixos no controle. Entre os tratamentos, produtos de óleo de cravo tiveram TBARS significativamente mais baixos, mas maior conteúdo fenólico total e atividade DPPH, seguido por óleo de cássia, óleo de tomilho e produtos de óleo de manjeriço. Além disso, a contagem microbiana de produtos com óleo essencial incorporado foi significativamente menor do que o controle e permaneceu bem abaixo do limite permissível de produtos de carne fresca (\log_{10}^7 UFC / g). Esses achados confirmam a eficaz atividade antioxidante e antimicrobiana dos óleos essenciais. Ainda, Sojic et al. (2019), investigaram o efeito do óleo essencial de coentro em concentrações de 0,075-0,150 $\mu\text{L/g}$ no pH, cor, oxidação lipídica (TBARS), concentração de nitrito residual e crescimento microbiano de linguiças de porco cozidas produzidas com diferentes níveis de nitrito de sódio (0, 50 e 100mg / kg). Eles observaram que a concentração reduzida de nitrito de sódio (60mg / kg) em combinação com 0,12 $\mu\text{L/g}$ do óleo essencial de coentro resultou em vermelhidão satisfatória (a * aprox. 11,1) e oxidação aprimorada (TBARS aprox. 0,12mg MDA/kg) e estabilidade microbiana (placa de contagem total- aproximadamente 2,50 Log CFU / g) de linguiças de porco cozidas durante o armazenamento refrigerado. Portanto, os resultados deste trabalho revelaram significativa atividade antioxidante e antimicrobiana do óleo essencial de coentro e, conseqüentemente, seu alto potencial de utilização no processamento de linguiças de porco cozidas com melhor qualidade e prazo de validade.

Na Figura 3 podemos observar os valores de pH ao longo dos 15 dias de avaliação.

Figura 3 - Valores de pH nas linguças frescas ao longo de 15 dias de armazenamento a 7°C.



Fonte: Do Autor (2021).

Houve efeitos significativos ($p < 0,05$) dos parâmetros estudados para todos os tratamentos. Ao longo dos 15 dias de armazenamento o controle apresentou os maiores valores de pH de até 5,92 no 12º dia. No fim de 15 dias, T2 apresentou o menor valor de pH entre os tratamentos. Podemos observar que no início do monitoramento, o pH do tratamento controle apresentou-se maior em comparação aos outros tratamentos. Essa diferença está relacionada a adição das microcápsulas e da blenda de óleos essenciais (pH mais baixo). Ao longo dos dias T1 e T2 apresentaram menores variações de pH o que nos dá indícios de maior estabilidade no armazenamento em comparação com os produtos que não foram aplicados as microcápsulas. Comportamento similar pode ser observado nos estudos de Calderón et al., 2020 onde nisina microencapsulada aplicada carne moída apresentou menores mudanças no pH em comparação a nisina não encapsulada. Kuswandi et al., 2017 observaram em seu estudo de hambúrgueres enriquecidos com extrato de chá verde encapsulado comportamento similar ao encontrado neste trabalho. O pH das amostras com extrato não encapsulado apresentou um aumento mais

significativo em comparação com as amostras com microcápsulas. Este fato é explicado pela maior eficiência de inibição na ação dos microrganismos através das microcápsulas o que ocasionou menor alteração no pH entrando em conformidade com os resultados deste trabalho.

O pH é um parâmetro importante para avaliação da qualidade de produtos cárneos, pois a medida que ocorrem processos de deterioração há alteração da composição dos íons de hidrogênio do alimento. Neste caso um dos principais fatores interligados as mudanças no pH é o crescimento de microrganismos pelos fenômenos de deterioração. Em meios mais alcalinos há mais chances de crescimento microbiano e deterioração do produto de forma mais acelerada (KUSWANDI, NURFAWAIDI, 2017, RAINES, HUNT, *et al.*, 2010). Neste caso, as mudanças de pH avaliadas neste trabalho dão indícios das diferenças entre os tratamentos em relação as mudanças físico-químicas na estrutura do alimento e conseqüentemente a ação antimicrobiana das microcápsulas nos tratamentos T1 e T2 em comparação ao controle.

É bem estabelecido que o pH de crescimento ideal de *L. monocytogenes* está entre 6 e 8. No entanto, *L. monocytogenes* pode se adaptar, crescer e sobreviver em ambientes ácidos. Sua resistência depende de fatores ecológicos e de sua condição fisiológica. Porém, a sobrevivência a condições ácidas pode comprometer a segurança de diversos alimentos com baixo pH. Isso deve ser levado em consideração especialmente em alimentos com uma longa vida de prateleira em que este patógeno pode sobreviver e ocasionar a um surto (SARAIVA, GARCÍA-DÍEZ, *et al.*, 2018). Conforme observado neste trabalho, o pH do produto variou de 5,92 a 5,59 durante o período de armazenamento, sendo esta faixa propícia ao crescimento de *Listeria monocytogenes*. No trabalho de Blanco-Lizarazo *et al.* (2017), os autores avaliaram os efeitos de compostos antimicrobianos naturais (óleo essencial de alho, isotiocianato de alila e nisina) nas características microbiológicas, físico-químicas e sensoriais de linguiça fresca armazenada por 20 dias e observaram ligeiro aumento do pH em todos os tratamentos durante o armazenamento. Ao final do armazenamento, o pH das amostras das linguiças tratadas com a combinação dos compostos naturais foi inferior ao pH do controle, 6,05 e 6,18, respectivamente. Segundo Jay (2000), o aumento do pH pode estar relacionado à redução na contagem de bactérias ácido-lácticas, que têm a capacidade de aumentar a acidez da carne por meio do metabolismo, enquanto o aumento da contagem de bactérias psicotrópicas, que podem utilizar proteínas como fonte de energia, levam à produção de amônia e, conseqüentemente, a pH mais elevado.

4 CONCLUSÃO

Dentre os tratamentos avaliados, o tratamento combinado dos óleos microencapsulados e óleos livres apresentou os melhores resultados em relação ao efeito bactericida, estabilidade de cor e pH. Tal tratamento permitiu potencializar o efeito antimicrobiano em *Listeria monocytogenes* devido às diferenças de liberação na matriz. De modo geral, os tratamentos com a presença de microcápsulas apresentaram menores perdas de estabilidade e variações no pH. Estes resultados colaboram com uma melhor compreensão dos mecanismos de aplicação de microcápsulas em produtos cárneos, demonstrando potencial aplicação. No entanto, mais estudos devem ser feitos a fim de ampliarmos as condições e parâmetros a serem aplicados.

REFERÊNCIAS

AUGUSTI, P. R. Sistema CIELAB para avaliação da cor de produtos cárneos. **In: Salão Internacional de Ensino, Pesquisa e Extensão**, v. 4, n.1, 2012. *Anais*. Rio Grande do Sul, 2012.

AMAGLIANI, G., GIAMMARINI, C., OMICCIOLI, E., *et al.* "Detection of *Listeria monocytogenes* using a commercial PCR kit and different DNA extraction methods", **Food Control**, 2007. DOI: 10.1016/j.foodcont.2006.06.012. .

ANVISA. **Portaria nº 1004, de 11 de dezembro de 1998**. . [S.l: s.n.]. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/33916/391619/Portaria%2Bn%25C2%25BA%2B1004%252C%2Bde%2B11%2Bde%2Bdezembro%2Bde%2B1998.pdf/41e1bc8f-b276-4022-9afb-ff0bb3c12c0c.> , 1998

APOLÓNIO, J., FALEIRO, M. L., MIGUEL, M. G., *et al.* "No induction of antimicrobial resistance in *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes* during continuous exposure to eugenol and citral", **FEMS Microbiology Letters**, v. 354, n. 2, p. 92–101, 2014. DOI: 10.1111/1574-6968.12440. .

ARBOATTI, A. S., OLIVARES, M. L., SABBAG, N. G., *et al.* "The influence of sodium chloride reduction on physicochemical, biochemical, rheological and sensory characteristics of Mozzarella cheese", **Dairy Science and Technology**, v. 94, n. 4, p. 373–386, 2014. DOI: 10.1007/s13594-014-0169-2. .

BAKKALI, F., AVERBECK, S., AVERBECK, D., *et al.* "Biological effects of essential oils - A review", **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 2, p. 446–475, 2008. DOI: 10.1016/j.fct.2007.09.106. .

BAKRY, A. M., ABBAS, S., ALI, B., *et al.* "Microencapsulation of Oils: A Comprehensive Review of Benefits, Techniques, and Applications", **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 15, n. 1, p. 143–182, 2016. DOI: 10.1111/1541-4337.12179. .

BALDIN, J. C., MICHELIN, E. C., POLIZER, Y. J., *et al.* "Microencapsulated jabuticaba (*Myrciaria cauliflora*) extract added to fresh sausage as natural dye with antioxidant and antimicrobial activity", **Meat Science**, v. 118, p. 15–21, 2016. DOI: 10.1016/j.meatsci.2016.03.016. .

BAPTISTA, R. C., HORITA, C. N., SANT'ANA, A. S. **Natural products with preservative properties for enhancing the microbiological safety and extending the shelf-life of seafood: A review. Food Research International.** [S.l: s.n.]. , 2020

BARAĆ, M. B., PEŠIĆ, M. B., STANOJEVIĆ, S. P., *et al.* "Techno-functional properties of pea (*Pisum sativum*) protein isolates-a review", **Acta Periodica Technologica**, v. 46, p. 1–18, 2015. DOI: 10.2298/APT1546001B. .

BARATTA, M. T., DORMAN, H. J. D., DEANS, S. G., *et al.* "Antimicrobial and antioxidant properties of some commercial essential oils.", **Flavour and Fragrance Journal**, v. 13, p. 235–244, 1998. DOI: 10.1002/(SICI)1099-1026(1998070)13:4<235::AID-FFJ733>3.0.CO;2-T. .

BENKEBLIA, N. "Antimicrobial activity of essential oil extracts of various onions (*Allium cepa*) and garlic (*Allium sativum*)", **LWT - Food Science and Technology**, v. 37, n. 2, p. 263–268, 2004. DOI: 10.1016/j.lwt.2003.09.001. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0023643803001671>.

BJÖRKROTH, J., DICKS, L. M. T., ENDO, A., "The genus *Weissella*". **Lactic Acid Bacteria: Biodiversity and Taxonomy**, [S.l: s.n.], 2014. . DOI: 10.1002/9781118655252.ch25.

BLANCO-LIZARAZO, C. M., BETANCOURT-CORTÉS, R., LOMBANA, A., *et al.* "Listeria monocytogenes behaviour and quality attributes during sausage storage affected by sodium nitrite, sodium lactate and thyme essential oil", **Food Science and Technology International**, v. 23, n. 3, p. 277–288, 2017. DOI: 10.1177/1082013216686464. .

BORCH, E., KANT-MUERMANS, M. L., BLIXT, Y. "Bacterial spoilage of meat and cured meat products", **International Journal of Food Microbiology**, 1996. DOI: 10.1016/0168-1605(96)01135-X. .

BREWER, M. S. "Natural Antioxidants: Sources, Compounds, Mechanisms of Action, and Potential Applications", **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 10, n. 4, p. 221–247, 2011. DOI: 10.1111/j.1541-4337.2011.00156.x. .

BURT, S. "Essential oils: Their antibacterial properties and potential applications in foods - A review", **International Journal of Food Microbiology**, v. 94, n. 3, p. 223–253, 2004. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2004.03.022. .

BUTSTRAEN, C., SALAÜN, F. "Preparation of microcapsules by complex coacervation of gum Arabic and chitosan", **Carbohydrate Polymers**, v. 99, p. 608–616, 2014. DOI: 10.1016/j.carbpol.2013.09.006. Disponible em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.09.006>.

CALDERÓN-OLIVER, M., ESCALONA-BUENDÍA, H. B., PONCE-ALQUICIRA, E. "Effect of the addition of microcapsules with avocado peel extract and nisin on the quality of ground beef", **Food Science and Nutrition**, v. 8, n. 3, p. 1325–1334, 2020. DOI: 10.1002/fsn3.1359. .

CALO, J. R., CRANDALL, P. G., O'BRYAN, C. a., *et al.* "Essential oils as antimicrobials in food systems - A review", **Food Control**, v. 54, p. 111–119, 2015. DOI: 10.1016/j.foodcont.2014.12.040. Disponible em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.12.040>.

CHEN, B., DING, Y., XU, M., *et al.* "The influence of pH and enzyme cross-linking on protein delivery properties of WPI-beet pectin complexes", **Food Research International**, v. 105, p. 678–685, 2017. DOI: 10.1016/j.foodres.2017.11.076. .

CHEN, H., ZHANG, Y., ZHONG, Q. "Physical and antimicrobial properties of spray-dried zein-casein nanocapsules with co-encapsulated eugenol and thymol", **Journal of Food Engineering**, v. 144, p. 93–102, 2014. DOI: 10.1016/j.jfoodeng.2014.07.021. .

CHUNG, S. K., SEO, J. Y., LIM, J. H., *et al.* "Microencapsulation of essential oil for insect repellent in food packaging system", **Journal of Food Science**, 2013. DOI: 10.1111/1750-

3841.12111. .

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard — Ninth Edition**. Wayne, [s.n.], 2003. v. 32.

COFRADES, S., SERRANO, A., AYO, J., *et al.* "Restructured beef with different proportions of walnut as affected by meat particle size", **European Food Research and Technology**, v. 218, n. 3, p. 230–236, 2004. DOI: 10.1007/s00217-003-0808-y. .

COMUNIAN, T. A., FAVARO-TRINDADE, C. S. "Microencapsulation using biopolymers as an alternative to produce food enhanced with phytosterols and omega-3 fatty acids: A review", **Food Hydrocolloids**, v. 61, p. 442–457, 2016. DOI: 10.1016/j.foodhyd.2016.06.003. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.06.003>.

COSTA, A. M. M., NUNES, J. C., LIMA, B. N. B., *et al.* "Effective stabilization of CLA by microencapsulation in pea protein", **Food Chemistry**, v. 168, p. 157–166, 2015. DOI: 10.1016/j.foodchem.2014.07.016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.07.016>.

DA SILVEIRA, S. M., LUCIANO, F. B., FRONZA, N., *et al.* "Chemical composition and antibacterial activity of *Laurus nobilis* essential oil towards foodborne pathogens and its application in fresh Tuscan sausage stored at 7°C", **LWT - Food Science and Technology**, v. 59, n. 1, p. 86–93, 2014. DOI: 10.1016/j.lwt.2014.05.032. .

DE KRUIF, C. G., WEINBRECK, F., DE VRIES, R. **Complex coacervation of proteins and anionic polysaccharides**. **Current Opinion in Colloid and Interface Science**. [S.l: s.n.], 2004

DUŠKOVÁ, M., KAMENÍK, J., KARPÍŠKOVÁ, R. "Weissella viridescens in meat products - A review", **Acta Veterinaria Brno**, v. 82, n. 3, p. 237–241, 2013. DOI: 10.2754/avb201382030237. .

EMBRAPA. **Tecnologias de Produção de Soja - Região Central do Brasil 2014**. [S.l: s.n.], 2013. Disponível em: http://www.cnpso.embrapa.br/download/publicacao/central_2005.pdf.

ESPITIA, P. J. P., AVENA-BUSTILLOS, R. J., DU, W. X., *et al.* "Physical and antibacterial

properties of açai edible films formulated with thyme essential oil and apple skin polyphenols", **Journal of Food Science**, v. 79, n. 5, 2014. DOI: 10.1111/1750-3841.12432. .

FERNANDES, R. V. de B., GUIMARÃES, I. C., FERREIRA, C. L. R., *et al.* "Microencapsulated Rosemary (*Rosmarinus officinalis*) Essential Oil as a Biopreservative in Minas Frescal Cheese", **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 41, n. 1, p. 1–9, 2017. DOI: 10.1111/jfpp.12759. .

FRIEDMAN, M. **Antibiotic-Resistant Bacteria: Prevalence in Food and Inactivation by Food-Compatible Compounds and Plant Extracts. Journal of Agricultural and Food Chemistry**. [S.l: s.n.], , 2015

FUNG, F., WANG, H. S., MENON, S. **Food safety in the 21st century. Biomedical Journal**. [S.l: s.n.], , 2018

GARCÍA-ESTEBAN, M., ANSORENA, D., GIMENO, O., *et al.* "Optimization of instrumental colour analysis in dry-cured ham", **Meat Science**, v. 63, n. 3, p. 287–292, 2003. DOI: 10.1016/S0309-1740(02)00084-0. .

GARCÍA-GARCÍA, R., LÓPEZ-MALO, A., PALOU, E. "Bactericidal Action of Binary and Ternary Mixtures of Carvacrol, Thymol, and Eugenol against *Listeria innocua*", **Journal of Food Science**, v. 76, n. 2, p. 95–100, 2011. DOI: 10.1111/j.1750-3841.2010.02005.x. .

GARCÍA-SALDAÑA, J. S., CAMPAS-BAYPOLI, O. N., LÓPEZ-CERVANTES, J., *et al.* "Microencapsulation of sulforaphane from broccoli seed extracts by gelatin/gum Arabic and gelatin/pectin complexes", **Food Chemistry**, v. 201, p. 94–100, 2016. DOI: 10.1016/j.foodchem.2016.01.087. .

GLUSHKOV, O. A. "INFLUENCE OF NATURAL POLYSACCHARIDES ON QUALITY INDICATORS OF THE FROZEN SEMI-FINISHED PRODUCTS AT STORAGE", **JOURNAL OF FOOD SCIENCE AND TECHNOLOGY-UKRAINE**, 2016. DOI: 10.15673/fst.v10i3.182. .

GNANASAMBANDAM, R., HELTIARACHCHY, N. S. "Protein Concentrates from Unstabilized and Stabilized Rice Bran: Preparation and Properties", **Journal of Food Science**, v. 60, n. 5, p. 1066–1069, 1995. DOI: 10.1111/j.1365-2621.1995.tb06293.x. .

GONZÁLEZ-PÉREZ, S., ARELLANO, J. B., "Vegetable protein isolates". **Handbook of Hydrocolloids: Second Edition**, [S.l: s.n.], 2009. p. 383–419. DOI: 10.1533/9781845695873.383.

GRACIA-VALENZUELA, M. H., OROZCO-MEDINA, C., MOLINA-MALDONADO, C. "Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review", **Hidrobiologica**, v. 22, n. 3, p. 201–206, 2012. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2004.03.022. .

GUARDA, A., RUBILAR, J. F., MILTZ, J., *et al.* "The antimicrobial activity of microencapsulated thymol and carvacrol", **International Journal of Food Microbiology**, 2011. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2011.02.011. .

HA, E., ZEMEL, M. B. **Functional properties of whey, whey components, and essential amino acids: Mechanisms underlying health benefits for active people (Review)**. **Journal of Nutritional Biochemistry**. [S.l: s.n.], 2003

HSOUNA, A. Ben, TRIGUI, M., MANSOUR, R. Ben, *et al.* "Chemical composition, cytotoxicity effect and antimicrobial activity of Ceratonia siliqua essential oil with preservative effects against *Listeria* inoculated in minced beef meat", **International Journal of Food Microbiology**, v. 148, n. 1, p. 66–72, 2011. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2011.04.028. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.04.028>.

HUGHES, J. M., OISETH, S. K., PURSLOW, P. P., *et al.* "A structural approach to understanding the interactions between colour , water-holding capacity and tenderness", **MESC**, v. 98, n. 3, p. 520–532, 2014. DOI: 10.1016/j.meatsci.2014.05.022. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.meatsci.2014.05.022>.

HUQ, T., VU, K. D., RIEDL, B., *et al.* "Synergistic effect of gamma (γ)-irradiation and microencapsulated antimicrobials against *Listeria monocytogenes* on ready-to-eat (RTE) meat", **Food Microbiology**, v. 46, p. 507–514, 2015. DOI: 10.1016/j.fm.2014.09.013. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fm.2014.09.013>.

HUSSAIN, A., AHMED, T., KANTI, S., *et al.* "LISTERIA MONOCYTOGENES: OCORRÊNCIA EM PRODUTOS LÁCTEOS E SUAS IMPLICAÇÕES EM SAÚDE PÚBLICA", **Iranian Journal of Veterinary Research**, v. 78, n. 1, p. 155–168, 2011. DOI: 10.1590/1808-1657v78p1552011. .

HUSSAIN, M. A., SUMON, T. A., MAZUMDER, S. K., *et al.* **Essential oils and chitosan as alternatives to chemical preservatives for fish and fisheries products: A review.** *Food Control*. [S.l: s.n.]. , 2021

JAMEKHORSHID, A., SADRAMELI, S. M., FARID, M. **A review of microencapsulation methods of phase change materials (PCMs) as a thermal energy storage (TES) medium.** *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. [S.l: s.n.]. , 2014

JUN-XIA, X., HAI-YAN, Y., JIAN, Y. "Microencapsulation of sweet orange oil by complex coacervation with soybean protein isolate/gum Arabic", *Food Chemistry*, v. 125, n. 4, p. 1267–1272, 2011. DOI: 10.1016/j.foodchem.2010.10.063. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.10.063>.

JYOTHI SRI, S., SEETHADEVI, A., SURIA PRABHA, K., *et al.* **Microencapsulation: A review.** *International Journal of Pharma and Bio Sciences*. [S.l: s.n.]. , 2012

KANOKPANONT, S., YAMDECH, R., ARAMWIT, P. "Stability enhancement of mulberry-extracted anthocyanin using alginate/chitosan microencapsulation for food supplement application", *Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology*, v. 46, n. 4, p. 773–782, 2018. DOI: 10.1080/21691401.2017.1339050. .

KLEMMER, K. J., KORBER, D. R., LOW, N. H., *et al.* "Pea protein-based capsules for probiotic and prebiotic delivery", *International Journal of Food Science and Technology*, v. 46, n. 11, p. 2248–2256, 2011. DOI: 10.1111/j.1365-2621.2011.02743.x. .

KUPAEI, M. A., GARMAKHANY, A. D. "Effect of microencapsulated essential oils on the storage life of mango fruit (*Mangifera indica*. L, cv Chaunsa)", *Minerva Biotecnologica*, 2014. .

KUSWANDI, B., NURFAWAIDI, A. "On-package dual sensors label based on pH indicators for real-time monitoring of beef freshness", *Food Control*, 2017. DOI: 10.1016/j.foodcont.2017.06.028. .

LI, li, AU, W., HUA, T., *et al.* "Improvement in antibacterial activity of moxa oil containing gelatin-arabic gum microcapsules", *Textile Research Journal*, v. 83, n. 12, p. 1236–1241, 2013. DOI: 10.1177/0040517512467059. .

LISERRE, A. M., LANDGRAF, M., DESTRO, M. T., *et al.* "Inhibition of *Listeria monocytogenes* by a bacteriocinogenic *Lactobacillus sake* strain in modified atmosphere-packaged Brazilian sausage", **Meat science.**, v. 61, n. 4, p. 449—455, 2002. Disponível em: <http://europepmc.org/abstract/MED/22061076>.

LIU, F., CHEN, Z., TANG, C. H. "Microencapsulation properties of protein isolates from three selected Phaseolus legumes in comparison with soy protein isolate", **LWT - Food Science and Technology**, v. 55, n. 1, p. 74–82, 2014. DOI: 10.1016/j.lwt.2013.09.008. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2013.09.008>.

LIU, S., CAO, Y. L., GHOSH, S., *et al.* "Intermolecular interactions during complex coacervation of pea protein isolate and gum arabic", **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 1, p. 552–556, 2010. DOI: 10.1021/jf902768v. .

LOURENÇO, S. C., FRAQUEZA, M. J., FERNANDES, M. H., *et al.* "Application of edible alginate films with pineapple peel active compounds on beef meat preservation", **Antioxidants**, v. 9, n. 8, p. 1–15, 2020. DOI: 10.3390/antiox9080667. .

LUNGU, B., O'BRYAN, C. A., MUTHAIYAN, A., *et al.* **Listeria monocytogenes: Antibiotic resistance in food production. Foodborne Pathogens and Disease.** [S.l: s.n.]. , 2011

LUONG, N. D. M., COROLLER, L., ZAGOREC, M., *et al.* **Spoilage of chilled fresh meat products during storage: A quantitative analysis of literature data. Microorganisms.** [S.l: s.n.]. , 2020

LUZZI, L. A. "Microencapsulation", **J. Pharm. Sci.**, v. 59, n. Oct, p. 1367–1376, 1970. .

MA, T., LUO, J., TIAN, C., *et al.* "Influence of technical processing units on chemical composition and antimicrobial activity of carrot (*Daucus carrot* L.) juice essential oil", **Food Chemistry**, v. 170, p. 394–400, 2015. DOI: 10.1016/j.foodchem.2014.08.018. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.08.018>.

MADAN, P. L. "Microencapsulation I. Phase separation or coacervation", **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 4, n. 1, p. 95–116, 1978. DOI: 10.3109/03639047809055641. .

MAPA. **REGULAMENTO TÉCNICO DE IDENTIDADE E QUALIDADE DE LINGUIÇA-MINISTÉRIO DA AGRICULTURA E DO ABASTECIMENTO-**

SECRETARIA DE DEFESA AGROPECUÁRIA-INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 4, DE 31 DE MARÇO DE 2000. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. [S.l: s.n.], 2000

MARQUES, S. C., BOARI, C. A., BRCKO, C. C., *et al.* "AVALIAÇÃO HIGIÊNICO-SANITÁRIAS DE LINGUIÇAS TIPO FRESCAL COMERCIALIZADAS NOS MUNICÍPIOS DE TRÊS CORAÇÕES E LAVRAS MG", **Ciência e Agrotecnologia**, v. 30, n. 6, p. 1120–1123, 2006. .

MCNAMEE, B. F., O'RIORDAN, E. D., O'SULLIVAN, M. "Emulsification and Microencapsulation Properties of Gum Arabic", **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, n. 11, p. 4551–4555, 1998. DOI: 10.1021/jf9803740. .

MENDANHA, D. V., MOLINA ORTIZ, S. E., FAVARO-TRINDADE, C. S., *et al.* "Microencapsulation of casein hydrolysate by complex coacervation with SPI/pectin", **Food Research International**, v. 42, n. 8, p. 1099–1104, 2009. DOI: 10.1016/j.foodres.2009.05.007. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2009.05.007>.

MENG, Y., CLOUTIER, S. **Gelatin and Other Proteins for Microencapsulation.** [S.l: s.n.], 2014. Disponível em: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780124045682000200>.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos no Brasil.** . [S.l: s.n.], 2017. Disponível em: <http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2017/maio/29/Apresentacao-Surtos-DTA-2017.pdf>.

MOON, H., KIM, N. H., KIM, S. H., *et al.* "Teriyaki sauce with carvacrol or thymol effectively controls Escherichia coli O157:H7, Listeria monocytogenes, Salmonella Typhimurium, and indigenous flora in marinated beef and marinade", **Meat Science**, v. 129, p. 147–152, 2017. DOI: 10.1016/j.meatsci.2017.03.001. .

MORTAZAVIAN, A., RAZAVI, S. H., EHSANI, M. R., *et al.* "Principles and methods of microencapsulation of probiotic microorganisms", **IRANIAN JOURNAL of BIOTECHNOLOGY**, v. 5, n. 1, p. 1–18, 2007. .

MÜLLER, M., BUCHBAUER, G. **Essential oil components as pheromones. A review.** **Flavour and Fragrance Journal.** [S.l: s.n.], 2011

NESBAKKEN, T., KAPPERUD, G., CAUGANT, D. A. "Pathways of *Listeria monocytogenes* contamination in the meat processing industry", **International Journal of Food Microbiology**, v. 31, n. 1–3, p. 161–171, 1996. DOI: 10.1016/0168-1605(96)00978-6. .

NIU, F., DONG, Y., SHEN, F., *et al.* "Phase separation behavior and structural analysis of ovalbumin-gum arabic complex coacervation", **Food Hydrocolloids**, v. 43, p. 1–7, 2015. DOI: 10.1016/j.foodhyd.2014.02.009. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2014.02.009>.

ORTIZ DE ELGUEA-CULEBRAS, G., SÁNCHEZ-VIOQUE, R., SANTANA-MÉRIDAS, O., *et al.* "In vitro antifungal activity of residues from essential oil industry against *Penicillium verrucosum*, a common contaminant of ripening cheeses", **LWT - Food Science and Technology**, v. 73, p. 226–232, 2016. DOI: 10.1016/j.lwt.2016.06.008. .

OSAMEDE AIROUYUWA, J., KAEWMANEE, T., NESTERENKO, A., *et al.* "Microencapsulation of *Moringa oleifera* leaf extracts with vegetable protein as wall materials", **Food Hydrocolloids**, v. 41, n. 6, p. 95–102, 2019. DOI: 10.1016/j.foodhyd.2014.03.017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2014.03.017>.

OUATTARA, B., SIMARD, R. E., HOLLEY, R. A., *et al.* "Antibacterial activity of selected fatty acids and essential oils against six meat spoilage organisms", **International Journal of Food Microbiology**, v. 37, n. 2–3, p. 155–162, 1997. DOI: 10.1016/S0168-1605(97)00070-6. .

PATEL, S., GOYAL, A. **Applications of natural polymer gum Arabic: A review. International Journal of Food Properties**. [S.l: s.n.], 2015

PATHAK, J., PRIYADARSHINI, E., RAWAT, K., *et al.* "Complex coacervation in charge complementary biopolymers: Electrostatic versus surface patch binding", **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 250, p. 40–53, 2017. DOI: 10.1016/j.cis.2017.10.006. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cis.2017.10.006>.

PATTERSON, M. F., MCKAY, A. M., CONNOLLY, M., *et al.* "Effect of high pressure on the microbiological quality of cooked chicken during storage at normal and abuse refrigeration temperatures", **Food Microbiology**, 2010. DOI: 10.1016/j.fm.2009.10.007. .

PAULO, F., SANTOS, L. **Design of experiments for microencapsulation applications: A**

review. Materials Science and Engineering C. [S.l: s.n.], , 2017

PENG, C., ZHAO, S. Q., ZHANG, J., *et al.* "Chemical composition, antimicrobial property and microencapsulation of Mustard (*Sinapis alba*) seed essential oil by complex coacervation", **Food Chemistry**, v. 165, p. 560–568, 2014. DOI: 10.1016/j.foodchem.2014.05.126. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.05.126>.

PEREIRA, K. C., MOTA FERREIRA, D. C., ALVARENGA, G. F., *et al.* "Microencapsulation and release controlled by the diffusion of food ingredients produced by spray drying: A review", **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 21, 2018. DOI: 10.1590/1981-6723.08317. .

PERRICONE, M., ARACE, E., CORBO, M. R., *et al.* "Bioactivity of essential oils: A review on their interaction with food components", **Frontiers in Microbiology**, v. 6, n. FEB, p. 1–7, 2015. DOI: 10.3389/fmicb.2015.00076. .

PINELLI, J. J., HELENA DE ABREU MARTINS, H., GUIMARÃES, A. S., *et al.* "Essential oil nanoemulsions for the control of *Clostridium sporogenes* in cooked meat product: An alternative?", **LWT**, v. 143, p. 111123, maio 2021. DOI: 10.1016/j.lwt.2021.111123. .

PRADO, I. N., CRUZ, O. T. B., VALERO, M. V., *et al.* "Effects of glycerin and essential oils (*Anacardium occidentale* and *Ricinus communis*) on the meat quality of crossbred bulls finished in a feedlot", **Animal Production Science**, v. 56, n. 12, p. 2105–2114, 2016. DOI: 10.1071/AN14661. .

PRIFTIS, D., LAUGEL, N., TIRRELL, M. "Thermodynamic characterization of polypeptide complex coacervation", **Langmuir**, v. 28, n. 45, p. 15947–15957, 2012. DOI: 10.1021/la302729r. .

RAINES, C. R., HUNT, M. C., UNRUH, J. A. "Contributions of muscles of various color stabilities to the overall color stability of ground beef", **Journal of Food Science**, v. 75, n. 1, 2010. DOI: 10.1111/j.1750-3841.2009.01430.x. .

REYES-JURADO, F., LÓPEZ-MALO, A., PALOU, E. "Antimicrobial Activity of Individual and Combined Essential Oils against Foodborne Pathogenic Bacteria", **Journal of Food Protection**, 2016. DOI: 10.4315/0362-028X.JFP-15-392. .

RILEY, M. A., WERTZ, J. E. "Bacteriocin diversity: ecological and evolutionary

perspectives", **Biochimie**, v. 84, n. 5–6, p. 357–364, 2002. DOI: S0300908402014219 [pii].
Disponível em:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12423779.

RUAN, C., ZHANG, Y., SUN, Y., *et al.* "Effect of sodium alginate and carboxymethyl cellulose edible coating with epigallocatechin gallate on quality and shelf life of fresh pork", **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 141, p. 178–184, 2019. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2019.08.247. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.08.247>.

RUTZ, J. K., BORGES, C. D., ZAMBLAZI, R. C., *et al.* "Microencapsulation of palm oil by complex coacervation for application in food systems", **Food Chemistry**, v. 220, p. 59–66, 2017. DOI: 10.1016/j.foodchem.2016.09.194. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.09.194>.

SARAIVA, C., GARCÍA-DÍEZ, J., FONTES, M. da C., *et al.* "Modeling the Behavior of *Listeria monocytogenes* in Meat", **Listeria Monocytogenes**, 2018. DOI: 10.5772/intechopen.79967. .

SEMENOVA, A. A., NASONOVA, V. V., TUNIEVA, E. K. "The effect of essential oils on the color stability of minced meat", **IOP Conference Series: Earth and Environmental Science**, v. 333, n. 1, 2019. DOI: 10.1088/1755-1315/333/1/012098. .

SESSA, M. **Nanoencapsulation of bioactive compounds for food applications**. 2011. 154 f. 2011.

SHAMLOO, E., HOSSEINI, H., MOGHADAM, A. Z., *et al.* **Importance of *Listeria monocytogenes* in food safety: A review of its prevalence, detection, and antibiotic resistance**. **Iranian Journal of Veterinary Research**. [S.l: s.n.], 2019

SHARMA, H., MENDIRATTA, S. K., AGARWAL, R. K., *et al.* "Evaluation of anti-oxidant and anti-microbial activity of various essential oils in fresh chicken sausages", **Journal of Food Science and Technology**, v. 54, n. 2, p. 279–292, 2017. DOI: 10.1007/s13197-016-2461-z. .

SHERIDAN, C., FARRELL, M. O., LEWIS, E., *et al.* "A comparison of CIE L * a * b * and spectral methods for the analysis of fading in sliced cured ham", **JOURNAL OF OPTICS A:**

PURE AND APPLIED OPTICS, p. S32–S39, 2007. DOI: 10.1088/1464-4258/9/6/S06. .

SHIMANOVICH, U., BERNARDES, G. J. L., KNOWLES, T. P. J., *et al.* "Protein micro- and nano-capsules for biomedical applications", **Chem. Soc. Rev.**, v. 43, n. 5, p. 1361–1371, 2014. DOI: 10.1039/C3CS60376H. Disponível em: <http://xlink.rsc.org/?DOI=C3CS60376H>.

SILVA-VÁZQUEZ, R., ARANA-SÁNCHEZ, A., LUGO-CERVANTES, E., *et al.* "Vegetable proteins in microencapsulation: A review of recent interventions and their effectiveness", **Industrial Crops and Products**, v. 411, n. 1, p. 129–139, 2013. DOI: 10.1016/j.indcrop.2012.06.035. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.colurfa.2012.07.010>.

SINGH, P., KUMAR, R., SABAPATHY, S. N., *et al.* "Functional and edible uses of soy protein products". 7, 2008. **Anais** [...] [S.l: s.n.], 2008. p. 14–28. DOI: 10.1111/j.1541-4337.2007.00025.x.

SOARES, V. M., PADILHA, M. B., DE GUERRA, M. E. M., *et al.* "Identification of salmonella spp, listeria monocytogenes, and indicator microorganisms in commercialized raw meats and fresh sausages from Uruguaiana, Rio Grande do Sul, Brazil", **Ciencia Rural**, v. 51, n. 6, p. 2–9, 2021. DOI: 10.1590/0103-8478cr20200569. .

THIES, C., "Microencapsulation of Flavors by Complex Coacervation". **Encapsulation and Controlled Release Technologies in Food Systems**, [S.l: s.n.], 2007. p. 149–170. DOI: 10.1002/9780470277881.ch7.

TIMILSENA, Y. P., WANG, B., ADHIKARI, R., *et al.* "Advances in microencapsulation of polyunsaturated fatty acids (PUFAs)-rich plant oils using complex coacervation: A review", **Food Hydrocolloids**, v. 69, p. 369–381, 2017. DOI: 10.1016/j.foodhyd.2017.03.007. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2017.03.007>.

TOLDRA, F. "Sodium reduction in foods: a necessity for a growing sector of the population", **Trends in Food Science & Technology**, v. 18, n. 11, p. 583, 2007. DOI: 10.1016/j.tifs.2007.07.005. Disponível em: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0924224407002105>.

TOLSTOGUZOV, V. B. "Functional properties of food proteins and role of protein-polysaccharide interaction", **Food Hydrocolloids**, v. 4, n. 6, p. 429–468, 1991. DOI:

10.1016/S0268-005X(09)80196-3.

Disponível

em:

<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0268005X09801963>.

UMER, H., NIGAM, H., TAMBOLI, A. M., *et al.* "Microencapsulation : Process , Techniques and Applications", **International Journal of Research in Pharmaceutical and Biomedical Sciences**, v. 2, n. 2, p. 474–481, 2011. DOI: 10.1111/j.1365-2621.2005.00980.x. .

UPADHYAY, A., UPADHYAYA, I., KOLLANOOR-JOHN, A., *et al.* "Inactivation of *Listeria monocytogenes* on frankfurters by plant-derived antimicrobials alone or in combination with hydrogen peroxide", **International Journal of Food Microbiology**, v. 163, n. 2–3, p. 114–118, 2013. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2013.01.023. .

VEIGA, R. D. S. Da, APARECIDA DA SILVA-BUZANELLO, R., CORSO, M. P., *et al.* **Essential oils microencapsulated obtained by spray drying: a review. Journal of Essential Oil Research.** [S.l: s.n.]. , 2019

WANG, Y., LIU, W., CHEN, X. D., *et al.* "Micro-encapsulation and stabilization of DHA containing fish oil in protein-based emulsion through mono-disperse droplet spray dryer", **Journal of Food Engineering**, v. 175, p. 74–84, 2016. DOI: 10.1016/j.jfoodeng.2015.12.007. .

WEINBRECK, F., ROLLEMA, H. S., TROMP, R. H., *et al.* "Diffusivity of whey protein and gum arabic in their coacervates", **Langmuir**, v. 20, n. 15, p. 6389–6395, 2004. DOI: 10.1021/la049908j. .

XIAO, Z., LIU, W., ZHU, G., *et al.* "A review of the preparation and application of flavour and essential oils microcapsules based on complex coacervation technology", **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 94, n. 8, p. 1482–1494, 2014. DOI: 10.1002/jsfa.6491. .

XU, L., CHENG, J. R., LIU, X. M., *et al.* "Effect of microencapsulated process on stability of mulberry polyphenol and oxidation property of dried minced pork slices during heat processing and storage", **Lwt**, v. 100, n. June 2018, p. 62–68, 2019. DOI: 10.1016/j.lwt.2018.10.025. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.10.025>.

YAN, C., ZHANG, W., "Coacervation Processes". **Microencapsulation in the Food Industry**, [S.l: s.n.], 2014. p. 125–137. DOI: 10.1016/B978-0-12-404568-2.00012-1. Disponível em: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780124045682000121>.

YEMIŞ, G. P., CANDOĞAN, K. "Antibacterial activity of soy edible coatings incorporated with thyme and oregano essential oils on beef against pathogenic bacteria", **Food Science and Biotechnology**, v. 26, n. 4, p. 1113–1121, 2017. DOI: 10.1007/s10068-017-0136-9.

ZARRINGHALAMI, S., SAHARI, M. A., HAMIDI-ESFEHANI, Z. "Partial replacement of nitrite by annatto as a colour additive in sausage", **Meat Science**, 2009. DOI: 10.1016/j.meatsci.2008.08.003.

CONCLUSÃO FINAL

De forma geral a microencapsulação da blenda dos óleos essenciais de orégano, tomilho e cravo apresentou resultados satisfatórios. Foi comprovado o efeito antimicrobiano da blenda de óleos essenciais sobre *Listeria monocytogenes* e *Weissella viridescens* com uma inibição em uma concentração média de até 0,3125. Entre as misturas de coacervados complexos as proteínas de soja /goma arábica, ervilha /goma arábica e isolado de soro de leite/goma arábica as microcápsulas com soja/goma arábica obtiveram os melhores rendimentos de coacervados com até 83,54%. Todos os tratamentos apresentaram ação antimicrobiana em relação às bactérias estudadas com halos de inibição entre 13 a 22,34 mm. As microcápsulas de proteína de soja/goma arábica apresentaram o maior halo de inibição para *Listeria monocytogenes* com 22,34 mm e as microcápsulas de isolado de soro de leite/goma arábica apresentaram o maior halo para *Weissella viridescens* de 16,57 mm. Foi observado início de liberação e rompimento das microcápsulas com maior significância a partir de 180 min. Os bons resultados dessa primeira etapa demonstraram o potencial de aplicação das microcápsulas obtidas por coacervação complexa em matrizes alimentícias, sendo o tratamento de proteína de soja / goma arábica com os melhores resultados. Com a aplicação em diferentes concentrações do melhor tratamento (Soja/GA) em linguiças frescas o tratamento T2 (microcápsulas + blenda de óleos livres) apresentaram os melhores resultados antimicrobianos sobre *Listeria monocytogenes*, apresentando ação bactericida com eliminação do microrganismo após o sexto dia. Estes resultados demonstram que o óleo livre potencializou os efeitos bactericidas das microcápsulas. Uma vez que em um primeiro momento o material microencapsulado está aprisionado, o óleo livre começa a agir e após a liberação das microcápsulas há potencialização desse efeito. O mesmo tratamento T2 apresentou os melhores resultados em relação a estabilidade de cor e pH. Os tratamentos com adição de microcápsulas (T1 e T2) apresentaram melhores resultados com

menor perda de vermelhidão e menores variações em relação a luminosidade. Na análise de pH, T2 apresentou as menores variações demonstrando estabilidade do tratamento 2. Estes resultados colaboram com uma melhor compreensão dos mecanismos de aplicação de microcápsulas em produtos cárneos, demonstrando a viabilidade de sua aplicação em produtos alimentícios. No entanto, mais estudos devem ser feitos em relação aos parâmetros físico-químicos, microbiológicos e em relação a natureza de cada matriz alimentícia. Estudos sensoriais devem também ser executados para que se tenha uma conclusão definitiva.