

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS

MICROENCAPSULAÇÃO E ESTABILIDADE OXIDATIVA DO
ÓLEO DE CASTANHA-DO-BRASIL (*Bertholletia excelsa*) COM
CONCENTRADOS PROTEICOS VEGETAIS

TAMIRES SOUSA DE OLIVEIRA

MANAUS

2019

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS

TAMIRES SOUSA DE OLIVEIRA

MICROENCAPSULAÇÃO E ESTABILIDADE OXIDATIVA DO
ÓLEO DE CASTANHA-DO-BRASIL (*Bertholletia excelsa*) COM
CONCENTRADOS PROTEICOS VEGETAIS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do
Amazonas, como requisito parcial para a obtenção do título
de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Prof.^a Dra. Ariane Mendonça Kluczkovski
Coorientador: Prof. Dr. Pedro Henrique Campelo Felix

MANAUS

2019

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

O48m Oliveira, Tamires Sousa de
Microencapsulação e estabilidade oxidativa do óleo de castanha-do-Brasil (*Bertholletia excelsa*) com concentrados proteicos vegetais. / Tamires Sousa de Oliveira. 2019
124 f.: il. color; 31 cm.

Orientadora: Ariane Mendonça Kluczkovski
Coorientador: Pedro Henrique Campelo Felix
Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) -
Universidade Federal do Amazonas.

1. Conservação. 2. Estabilidade. 3. *Bertholletia excelsa* (castanha-do-Brasil). 4. Material de parede. I. Kluczkovski, Ariane Mendonça II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

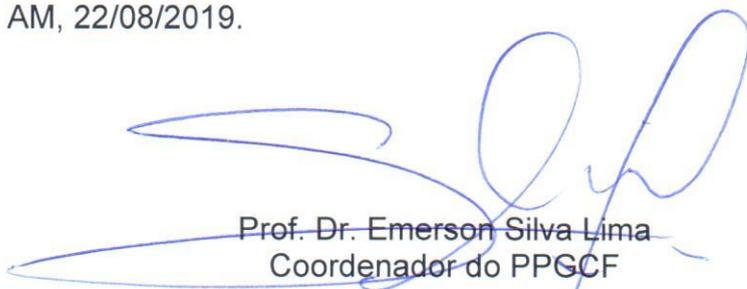
“Microencapsulação e estabilidade oxidativa do óleo de castanha-do-brasil (*Bertholletia excelsa*) com concentrados proteicos vegetais”

DISCENTE: TAMIRES SOUSA DE OLIVEIRA

PARECER:

Esta dissertação foi julgada adequada para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas em sua forma final e definitiva pelo Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amazonas.

Manaus, AM, 22/08/2019.

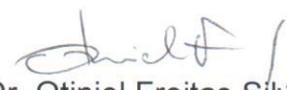


Prof. Dr. Emerson Silva Lima
Coordenador do PPGCF

A mesma foi apresentada perante a banca composta pelos seguintes professores:



Prof.ª Dr.ª Ariane Mendonça Kluczkovski
Orientadora e presidente da banca



Prof. Dr. Otiniel Freitas Silva
Membro externo (EMBRAPA)



Prof. Dr. Pedro Henrique Campelo Félix
Membro interno (UFAM)

Ao meu Deus, dono de toda ciência.

Ao meu amor e companheiro, Wallace.

À minha querida mãe, Ana.

AGRADECIMENTOS

A Deus pelo seu infinito amor e por sua eterna bondade. Por me ajudar a entender a vida e o sentido de tudo.

À minha orientadora Dra. Ariane Mendonça Kluczkovski, por acreditar, incentivar e por todo apoio e orientação.

Ao meu coorientador Dr. Pedro Henrique Campelo Felix, por acreditar em mim e por entender minhas dificuldades, estando sempre aberto às considerações.

Ao Dr. Otniel Freitas Silva, pelo carinho com que me recebeu, pela compressão e por tantas vezes esclarecer dúvidas. Seu apoio foi fundamental.

Aos professores do curso de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amazonas, pelos ensinamentos.

À Embrapa e a seus colaboradores tão prestativos e competentes, que deram o seu melhor para apoiar este projeto.

Ao FITOPHAR e ao BIOPHAR pela colaboração, cedendo espaço e pessoas tão solícitas.

Ao laboratório temático de microscopia eletrônica do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA).

Aos amigos que fiz durante a caminhada, principalmente à Bianca Lima, por seu apoio fundamental durante essa jornada, por ser parceira e por sempre ser prestativa.

Aos meus familiares, por entender e apoiar meus sonhos.

Ao meu querido marido, pela paciência, apoio e por percorrer esta longa caminhada da vida comigo. Por acreditar e principalmente por entender os momentos de desespero, estando sempre ao meu lado.

Resumo

A microencapsulação é uma técnica muito utilizada pelas indústrias de alimentos para a conservação e proteção das propriedades naturais do material encapsulado. As proteínas vegetais têm sido cada vez mais aplicadas como material de parede para a proteção de compostos com propriedades bioativas, em substituição parcial aos carboidratos e as proteínas do soro de leite. A castanha-do-Brasil (*Bertholletia excelsa*) é uma semente que possui cerca de 60% de lipídeos que são majoritariamente constituídos por ácidos graxos insaturados, principalmente pelos ácidos oleico e linoleico. Esses ácidos estão relacionados com a diminuição da incidência de doenças cardiovasculares. Com intuito de criar um método para a conservação das propriedades naturais do óleo de castanha-do-Brasil, o mesmo foi encapsulado com três diferentes tipos de concentrados proteicos vegetais: arroz (CPA), ervilha (CPE) e soja (CPS). Para tanto se caracterizou os concentrados proteicos vegetais, e após o processo de secagem avaliou-se as características físico-químicas das microcápsulas, bem como sua capacidade de manter as propriedades do óleo estáveis durante o armazenamento por seis semanas ao abrigo da luz a 25°C. Neste período avaliou-se a atividade de água, a umidade, o índice de acidez e de peróxidos e a qualidade microbiológica dos produtos. As proteínas apresentaram baixa solubilidade (35%) e valores de potencial *Zeta* próximos a -30 mV. Desta forma adicionou-se 15% de goma arábica (GA) nas emulsões para melhorar a estabilidade destas. A emulsão mais estável, após sete dias de avaliação, foi composta por CPA+GA. A eficiência de encapsulação foi de $79,9 \pm 1,4\%$ para CPA+GA, $72,2 \pm 0,9\%$ para CPE+GA e $75,0 \pm 1,4\%$ para CPS+GA. As micrografias mostraram uma estrutura mais porosa para CPE+GA, e o tamanho médio das partículas apresentaram-se dentro do esperado para produtos liofilizados. Os índices de acidez e peróxidos demonstram que em armazenamento (6 semanas) as microcápsulas apresentaram menores sinais de oxidação, do que óleo *in natura*. A umidade apresentou-se abaixo de 3,5% e atividade de água $< 0,3$ para todos os produtos encapsulados. A contagem dos microrganismos ficou abaixo de 10^6 UFC/g, sendo as microcápsulas CPA+GA mais estáveis. O óleo *in natura* e as microcápsulas não apresentaram sinais de oxidação durante o armazenamento (6 semanas) em seus respectivos perfis de ácidos graxos. Conclui-se assim que é possível a microencapsulação do óleo de castanha e que este produto tem potencial como ingrediente para novas formulações.

Palavras-chave: Conservação, estabilidade e *Bertholletia excelsa*.

Abstract

Microencapsulation is a technique widely used by food industries for the conservation and protection of the natural properties of encapsulated material. Plant proteins have been increasingly applied as a wall material for the protection of compounds with bioactive properties, partially replacing carbohydrates and whey proteins. Brazil nuts (*Bertholletia excelsa*) is a seed that has about 60% of lipids that are mostly unsaturated fatty acids, mainly oleic and linoleic acids. These acids are related to the decreased incidence of cardiovascular disease. In order to create a method for the conservation of the natural properties of Brazil nut oil, it was encapsulated with three different types of vegetable protein concentrates: rice (CPA), pea (CPE) and soybean (CPS). For this purpose, the vegetable protein concentrates were characterized, and after the drying process, the physical and chemical characteristics of the microcapsules were evaluated, as well as their ability to keep the oil properties stable during storage for six weeks in the dark at 25°C. During this period, water activity, humidity, acidity and peroxide index and microbiological quality of products were evaluated. The proteins had low solubility (35%) and Zeta potential values close to -30 mV. Thus 15% gum arabic (GA) was added to the emulsions to improve their stability. The most stable emulsion after seven days of evaluation was composed by CPA + GA. The encapsulation efficiency was $79.9 \pm 1.4\%$ for CPA + GA, $72.2 \pm 0.9\%$ for CPE + GA and $75.0 \pm 1.4\%$ for CPS + GA. The micrographs showed a more porous structure for CPE + GA, and the average particle size was as expected for lyophilized products. The acidity and peroxide indexes show that in storage (6 weeks) the microcapsules showed lower signs of oxidation. Humidity was below 3.5% and water activity <0.3 for all encapsulated products. The microorganism count was below 10^6 CFU / g, and the CPA + GA microcapsules were more stable. Fresh oil and microcapsules showed no signs of oxidation during storage (6 weeks) in their respective fatty acid profiles. It is therefore concluded that it is possible to microencapsulate the nut oil and that this product has potential as an ingredient for new formulations.

Keywords: Conservation, stability and *Bertholletia excelsa*.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Relação entre os benefícios clínicos e o consumo de castanha-do-Brasil.....	21
Tabela 2 - Perfil de ácidos graxos (%) do óleo extraído da castanha-do-Brasil.....	27
Tabela 3 - Identificação dos testes com suas respectivas composições.....	58
Tabela 4 - Descrição das análises durante o tempo de armazenamento do óleo <i>in natura</i> e encapsulado.....	64
Tabela 5 - Resultados dos testes físico-químicos do óleo bruto de castanha.....	69
Tabela 6 - Detecção de aflatoxinas extraídas do óleo por dois métodos distintos.....	71
Tabela 7 - Valores médios de capacidade de absorção de água (% CAA), de óleo (% CAO) e Potencial Zeta dos concentrados proteicos.....	74
Tabela 8 - Resultados médios para higroscopicidade e molhabilidade das microcápsulas de concentrados proteicos de arroz, soja e ervilha e goma arábica.....	83
Tabela 9 - Distribuição do tamanho das partículas das microcápsulas de concentrados proteicos de arroz, soja e ervilha e goma arábica.....	87
Tabela 10 - Eficiência de encapsulação das microcápsulas de concentrados proteicos de arroz, soja e ervilha e goma arábica.....	90
Tabela 11 - Estabilidade microbiológica do óleo <i>in natura</i> e encapsulado com as diferentes matrizes proteicas.....	102
Tabela 12 - Perfil de ácidos graxos do óleo de castanha <i>in natura</i> e encapsulado durante o período de armazenamento.....	106

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Fruto e Amêndoas de Castanha-do-Brasil.....	20
Figura 2 - Representações de um tipo de triacilglicerol misto.....	23
Figura 3 - Diagrama de fases da água.....	32
Figura 4 - Microcápsulas e microesferas.....	37
Figura 5 - Castanha-do-Brasil.....	46
Figura 6 - Fluxograma do beneficiamento da castanha com e sem casca.....	47
Figura 7 - Prensa mecânica utilizada para extração do óleo.....	48
Figura 8 - Teste de atividade antifúngica <i>Aspergillus niger</i> e <i>Aspergillus fumigatus</i>	72
Figura 9 - Gráfico de solubilidade dos concentrados proteicos.....	76
Figura 10 - Aspecto macroscópico de separação de fases das misturas dos concentrados proteicos e goma arábica após 24 horas.....	77
Figura 11 - Aspecto macroscópico de separação de fases das emulsões e seus respectivos índices de estabilidade.....	79
Figura 12 - Comportamento reológico das emulsões dos concentrados proteicos de arroz, soja e ervilha e goma arábica.....	80
Figura 13 - Relação de viscosidade e taxa de deformação as emulsões contendo os concentrados proteicos de arroz, soja e ervilha e goma arábica.....	81
Figura 14 - Microcápsulas de óleo de castanha-do-Brasil.....	82
Figura 15 - Comportamento termogravimétrico de microcápsulas de concentrados proteicos de arroz, soja e ervilha e goma arábica.....	85
Figura 16 - Morfologia superficial das microcápsulas de concentrados proteicos de arroz, soja e ervilha e goma arábica.....	88
Figura 17 - Atividade antioxidante celular das microcápsulas e do óleo <i>in natura</i>	92
Figura 18 - Índice de peróxidos do óleo encapsulado com concentrados proteicos de arroz, soja e ervilha e goma arábica e do óleo <i>in natura</i>	95
Figura 19 - Índice de acidez do óleo encapsulado com concentrados proteicos de arroz, soja e ervilha e goma arábica e do óleo <i>in natura</i>	96
Figura 20 - Umidade das microcápsulas de concentrados proteicos de arroz, soja e ervilha e goma arábica.....	98
Figura 21 - Atividade de água das microcápsulas de concentrados proteicos de arroz, soja e ervilha e goma arábica e do óleo <i>in natura</i>	99

Figura 22 – Cromatograma do perfil de ácidos graxos do óleo encapsulado com o concentrado proteico de ervilha e goma arábica.....104

SUMÁRIO

1.0 INTRODUÇÃO.....	16
2.0 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	19
2.1 Castanha-do-Brasil.....	19
2.2 Óleos Vegetais.....	22
2.2.1 Óleo de castanha-do-Brasil.....	25
2.2.2 Avaliação da atividade antifúngica.....	29
2.3 Secagem.....	30
2.3.1 Liofilização.....	31
2.4. Microencapsulação.....	36
2.4.1 Material de parede.....	39
2.4.1.1 Goma Arábica.....	40
2.4.1.2 Concentrados proteicos vegetais.....	41
2.4.1.3 Concentrado proteico de soja.....	43
2.4.1.4 Concentrado proteico de ervilha.....	43
2.4.1.5 Concentrado proteico de arroz.....	44
3.0 OBJETIVOS.....	45
3.1 Objetivo geral.....	45
3.2 Objetivos específicos.....	45
4.0 MATERIAL E MÉTODOS.....	46
4.1 Matéria-prima.....	46
4.1.1 Extração do óleo de castanha-do-Brasil por prensagem a frio.....	48
4.1.2 Caracterização físico-química do óleo.....	49
4.1.2.1 Determinação do índice de acidez titulável.....	49
4.1.2.2 Determinação do índice de peróxidos.....	49
4.1.2.3 Determinação da densidade relativa.....	50
4.1.3 Análises de aflatoxinas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).....	51
4.1.3.1 Extração das aflatoxinas.....	51

4.1.3.2 Condições cromatográficas.....	52
4.1.4 Avaliação da atividade antifúngica.....	53
4.2 Concentrados proteicos.....	53
4.2.1 Determinação do teor proteico.....	54
4.2.2 Capacidade de absorção de água e de óleo.....	55
4.2.3 Potencial Zeta.....	56
4.2.4 Solubilidade em água.....	56
4.3 Preparo das Emulsões.....	57
4.4 Caracterização da Emulsão.....	58
4.4.1 Estabilidade das emulsões.....	58
4.4.2 Reologia das emulsões.....	59
4.5 Liofilização.....	59
4.6 Caracterização das microcápsulas.....	60
4.6.1 Molhabilidade.....	60
4.6.2 Higroscopicidade.....	60
4.6.3 Análise Termogravimétrica.....	60
4.6.4 Análise da microestrutura.....	61
4.6.5 Análise de tamanho de partículas.....	61
4.6.6 Eficiência de encapsulação.....	61
4.6.7 Avaliação da citotoxicidade.....	62
4.6.8 Avaliação da atividade antioxidante celular.....	63
4.7 Caracterização e estabilidade dos produtos microencapsulados.....	64
4.7.1 Umidade.....	64
4.7.2 Atividade de água (aw).....	65
4.7.3 Cromatografia gasosa.....	65
4.7.4 Análises microbiológicas.....	66
4.7.4.1 Mesófilos.....	66
4.7.4.2 Contagem de bolores e leveduras.....	67
4.7.5 Determinação do índice de peróxidos e da acidez titulável.....	67

4.8 Análises Estatísticas.....	68
5.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	69
5.1 Caracterização físico-química do óleo de castanha-do-Brasil.....	69
5.1.1 Análises de aflatoxinas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).....	70
5.1.2 Avaliação da atividade antifúngica.....	71
5.2 Caracterização dos concentrados proteicos.....	72
5.2.1 Determinação do teor proteico.....	72
5.2.2 Capacidade de absorção de óleo e de água.....	73
5.2.3 Potencial Zeta.....	74
5.2.4 Solubilidade em água.....	75
5.3 Caracterização das emulsões.....	78
5.3.1 Estabilidade das emulsões.....	78
5.3.2 Reologia das emulsões.....	79
5.4 Liofilização e caracterização das microcápsulas.....	81
5.4.1 Molhabilidade e Higroscopicidade.....	82
5.4.2 Análise Termogravimétrica (TGA).....	84
5.4.3 Análise da microestrutura e tamanho de partícula.....	85
5.4.4 Eficiência de encapsulação.....	89
5.4.5 Avaliação da citotoxicidade e da atividade antioxidante celular.....	90
5.5 Caracterização e estabilidade dos produtos microencapsulados.....	92
5.5.1 Determinação dos índices de peróxidos e acidez titulável.....	93
5.5.2 Umidade e Atividade de água.....	96
5.5.3 Análises microbiológicas.....	99
5.5.4 Perfil de ácidos graxos.....	102
6.0 CONCLUSÃO.....	106
7.0 REFERÊNCIAS.....	107
8.0 ANEXOS.....	121
8.1 Análise de variância para a caracterização da matéria-prima e das microcápsulas.....	121
8.2 Análise de variância para índice de peróxidos e acidez durante o armazenamento.....	122

8.3	Análise de variância para umidade e atividade de água durante o armazenamento.....	123
8.4	Análise de variância para avaliação microbiológica água durante o armazenamento....	124

1.0 INTRODUÇÃO

A castanha-do-Brasil (*Bertholletia excelsa*) é consumida mundialmente por suas qualidades nutricionais intrínsecas, ligadas a sua excelente composição nutricional. Os derivados da castanha-do-Brasil tem obtido espaço no mercado, porém estudos voltados para a conservação e estabilidade do óleo, por exemplo, podem aumentar o seu valor comercial. O processo de microencapsulação é uma técnica bastante eficiente na conservação de alimentos e pode ser aplicada à preservação do óleo de castanha-do-Brasil (JUNIOR *et al*, 2017; REBELLO, 2009).

Quanto à composição da castanha-do-Brasil, os valores médios encontrados para seus macronutrientes são: 15,52% de proteínas, 12,36% de carboidratos, 66,16% de lipídeos e 7,7% de fibras (CARDOSO *et al*, 2017). O óleo bruto de castanha-do-Brasil é majoritariamente constituído por ácidos graxos insaturados (74% - 85%) e em menor quantidade por ácidos graxos saturados (13% - 15%). No grupo de ácidos graxos insaturados que compõem os lipídeos da castanha-do-Brasil pode-se encontrar em torno de 25% de ácidos graxos monoinsaturados e 21% de ácidos graxos poliinsaturados. Estes são importantes por estarem relacionados à diminuição da incidência de doenças cardiovasculares. (YANG; XIAO; DING, 2009; VENKATACHALAM; SATHE, 2006).

Além dos ácidos graxos supracitados, na composição do óleo de castanha-do-Brasil, pode-se encontrar tocoferóis e tocotrienóis que são conhecidos como um grupo de lipídeos antioxidantes naturais que impedem danos oxidativos em estruturas celulares (NELSON; COX, 2015). As características do óleo da castanha-do-Brasil tornam este produto alvo de estudos e investimentos, visto que possui grande valor nutricional e comercial capaz de proporcionar benefícios à saúde humana.

Uma das formas de agregar valor ao óleo de castanha-do-Brasil é aplicar tecnologias que aumentem sua vida útil e mantenham e/ou melhorem suas características naturais. A microencapsulação, por exemplo, é uma técnica que vem sendo aplicada em diversas áreas principalmente em setores industriais como têxtil, agrícola e farmacêutico (MARTINS *et al*, 2014). Este processo armazena compostos de interesse por envolvimento destes em cápsulas protetoras, gerando assim maior estabilidade ao produto durante seu armazenamento (PAULO; SANTOS *et al*, 2015; GOANKAR *et al*, 2014). Aplicada por meio de diversos tipos de secagem, esta técnica pode ser empregada na conservação de alimentos. As microcápsulas são formadas durante o processo de secagem, onde o composto bioativo é envolvido por um material encapsulante (DIAS, 2017). O material encapsulante torna-se então uma embalagem natural, conferindo proteção a danos causados pelo ambiente e assegurando estabilidade ao produto encapsulado (NAZZARO *et al*, 2012).

Após serem isolados do estado natural os óleos vegetais, como o da castanha-do-Brasil, podem sofrer oxidação lipídica o que leva à perda da qualidade nutricional, além da formação de sabor desagradável e da possível produção de compostos tóxicos prejudiciais à saúde (LI *et al*, 2018; KERRIHARD *et al*, 2015). Portanto a conservação do óleo de castanha-do-Brasil torna-se necessária para a manutenção das suas qualidades originais. A encapsulação de compostos é um processo que pode ser aplicado na manutenção da estabilidade e na diminuição da perecibilidade do óleo de castanha-do-Brasil. Um método que auxilie na conservação das propriedades do óleo de castanha-do-Brasil visa não só o aumento da vida útil do produto, mas também estimula a economia regional e possibilita a geração de um produto alternativo de qualidade e com atividade funcional ao organismo.

O presente trabalho tem como objetivo desenvolver um método de conservação do óleo de castanha-do-Brasil por meio da microencapsulação deste, utilizando três tipos de

concentrados proteicos vegetais (oriundos do arroz, soja e ervilha). Já que são escassos os dados relativos à encapsulação de óleo de castanha-do-Brasil com diferentes tipos de concentrados proteicos.

2.0 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 A castanha-do-Brasil

A castanheira (*Bertholletia excelsa*) é uma espécie nativa da América do Sul e seu crescimento dá-se em floresta de terra firme e bem drenada. A castanha-do-Brasil é encontrada na floresta amazônica brasileira, sendo uma das importantes fontes de recurso local. Esta espécie pode ser também encontrada em áreas adjacentes como, por exemplo, Bolívia, Peru, Colômbia, Venezuela e Guiana. A classificação botânica da castanha-do-Brasil é: Divisão – *Angiospermae*; Classe – Dicotiledônea; Ordem – *Myrtiflorae*; Família – *Lecythidaceae*; Gênero – *Bertholletia*; espécie – *excelsa* (JUNIOR *et al*, 2017; SHEPARD; RAMIREZ, 2011).

Anteriormente, conhecida por castanha-do-pará passou a ser denominada como castanha-do-Brasil em 1961, por meio do decreto 51.209, por uma questão de valorização da origem do produto ao mercado exterior. No interior do Brasil ainda pode-se encontrar este produto com diferentes nomes, os mais comuns são: castanha-do-maranhão, iniá, niá, nhá, eracy, tocery, tucá, yá e yuvia (PACHECO; SCUSSEL, 2006).

A castanha-do-Brasil tecnicamente não é uma noz e sim uma semente oleaginosa, envolta por um fruto, popularmente conhecido como ouriço, grande, pesado e quase globoso que pode ter de 8 a 16 cm de diâmetro (Figura 1). Suas árvores são colossais, podendo atingir até 60 metros de altura e sua circunferência pode ser encontrada de 10 a 18 metros. Essas estão geralmente dispostas em bosques conhecidos como castanhais (ROCKWELL *et al*, 2015; PACHECO; SCUSSEL, 2006).



Figura 1 - Fruto e Amêndoas de Castanha-do-Brasil - (a) Ouriço e (b) Amêndoas de Castanha-do-Brasil.

Fonte: Google Imagens (2018).

A castanha-do-Brasil possui grande valor econômico para a região amazônica. Sua exploração extrativista tem impacto direto na geração de emprego e renda da população ribeirinha. Além do reconhecimento no mercado doméstico, esta semente possui grande impacto no mercado de exportação, elevando assim seu valor mediante ao desenvolvimento socioeconômico das comunidades e mantendo os benefícios diretos e indiretos para a floresta (SALOMÃO, 2014; TONINI; PEDROZO, 2014).

A castanha-do-Brasil é apreciada por seu sabor característico, mas também pelo seu elevado valor nutricional. A castanha possui grande valor energético e alto valor biológico provenientes de seus macronutrientes. Em sua composição pode-se encontrar ainda valores significativos de micronutrientes como cálcio, fósforo, magnésio, vitaminas do complexo B e, sobretudo de selênio, que se destaca por ser um antioxidante natural e estar relacionado à diminuição de risco de câncer e doenças cardiovasculares (FERREIRA *et al*, 2006; SOUZA; MENEZES, 2004). O selênio está associado ainda à atividade da glutathiona peroxidase, uma enzima que protege estruturas biológicas contra estresse oxidativo pela eliminação dos peróxidos (VONDERHEIDE *et al*, 2002).

Associados à composição da semente da castanha-do-Brasil ainda pode-se encontrar compostos fenólicos e flavonoides, porém em concentrações inferiores aos alimentos considerados ricos destas substâncias (vinho tinto, cacau e chá preto). No entanto, estes compostos podem apresentar sinergia e gerar benefícios à saúde humana, pois estudos associam estes à diminuição da peroxidação lipídica. Por ser rica em ácidos graxos insaturados a castanha-do-Brasil ainda pode auxiliar na redução da pressão arterial, na prevenção da resistência à insulina e na redução de níveis de marcadores inflamatórios sistêmicos (MASSI *et al*, 2014; COLPO *et al*, 2014).

Estudos importantes associam a ingestão regular de ácidos graxos insaturados à redução da mortalidade por doenças cardiovasculares. Além desses benefícios, comprovou-se que a castanha-do-Brasil é capaz de modular o perfil lipídico, através do aumento dos níveis séricos da lipoproteína de alta densidade e diminuição da lipoproteína de baixa densidade (COLPO *et al*, 2014; VADIVEL; KUNYANGA; VADIVEL, 2012). A ingestão regular de castanha-do-Brasil está relacionada também a promoção da saúde humana e ao melhoramento de quadros clínicos de algumas patologias, como se pode observar na Tabela 1.

Benefícios Clínicos	Perfil de consumo associado	Autor
Melhora nos níveis de hormônios tireoidianos em pacientes em hemodiálise	1 castanha por dia	Stockler-Pinto <i>et al</i> , 2015
Melhora em funções cognitivas, principalmente na fluência verbal e praxia construtiva de idosos com comprometimento cognitivo leve	1 castanha por dia	Cardoso <i>et al</i> , 2017
Melhora no perfil lipídico e a diminuição de marcadores inflamatórios	20g a 30g de castanha por dia	Colpo <i>et al</i> , 2014
Potencial efeito antimutagênico e antígenotóxico por redução de fragmentação do DNA e da frequência de micronúcleo	1 castanha por dia	Macan, 2017

Tabela 1 – Relação entre os benefícios clínicos e o consumo de castanha-do-Brasil

A reunião de todas as características e principalmente pelo valor delas frente a alguns problemas da saúde humana, tornam a castanha-do-Brasil um produto valioso e que pode ser considerado como um nutracêutico (JOHN; SHAHIDI, 2010). A castanha-do-Brasil é um produto altamente versátil, suas aplicações vão desde o consumo *in natura* até a possível utilização dos seus compostos bioativos na indústria de alimentos, farmacêutica e de cosméticos. A extração do seu componente majoritário, o óleo, é totalmente aceita e viável, uma vez que ele pode oferecer muitos benefícios à saúde (FREITAS *et al*, 2007) e ser aplicado na formulação de cosméticos em indústrias farmacêuticas.

2.2 Óleos Vegetais

Óleos são substâncias insolúveis em água e podem ser encontradas em vegetais. Compostos predominantemente por triacilglicerídeos que são substâncias constituídas por três moléculas de ácidos graxos e uma de glicerol (Figura 2). Também pode-se encontrar em pequenas concentrações nos óleos vegetais moléculas como tocoferóis, diglicerídeos, ácidos graxos livres, fosfolipídios, esteróis e carotenoides. O ponto de fusão é o que determina a diferença entre óleos e gorduras, os óleos apresentam geralmente forma líquida à temperatura de 25 °C. Os óleos e as gorduras representam grande importância nutricional, já que estes são fonte de energia, contribuem para a sensação de saciedade, auxiliam na metabolização de vitaminas lipossolúveis (A, D, E e K), tornam os alimentos mais saborosos. São essenciais na formulação de muitos alimentos como pães, bolachas, bolos, cremes e sorvetes (BRASIL, 2005; O'BRIEN; FARR; WAN, 2000).

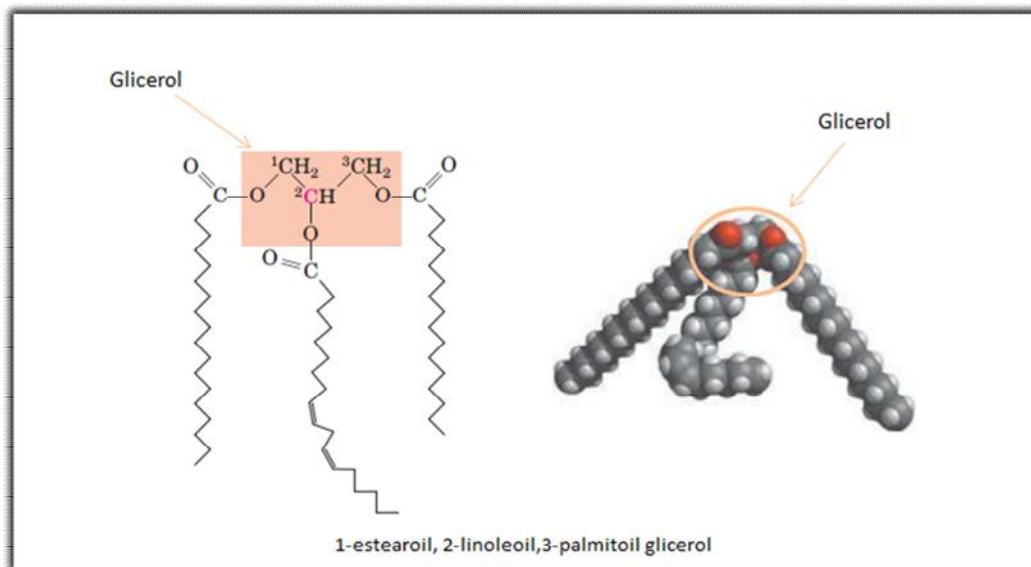


Figura 2 - Representações de um tipo de triacilglicerol misto

Fonte: Adaptado de Nelson e COX (2015).

Os óleos vegetais podem ser encontrados em plantas, sementes, nozes, frutas e legumes e são fontes importantes de ácidos graxos monoinsaturados e poliinsaturados. A composição desses ácidos graxos pode sofrer variação determinada por diversos fatores, incluindo clima, solo, tipo de fruto, grau de maturidade e a genética do material utilizado. Esses óleos podem ser obtidos por centrifugação, extração com solvente, prensa a frio, prensa mecânica com temperatura controlada entre outros métodos (ARAÚJO, 2011).

O grau de insaturação e a distribuição dos ácidos graxos na molécula de glicerol são fatores principais que podem influenciar as características originais dos óleos vegetais. As principais reações químicas que afetam a qualidade do óleo são hidrólise e a oxidação (COSTA, 2012). Junto a estas reações existem outros fatores que podem ser considerados como agentes de degradação de óleos vegetais, tais como: incidência de luz, ação enzimática, exposição à atmosfera de oxigênio e elevadas temperaturas. Estes fatores em conjunto ou não, comprometem a estabilidade química e física dos óleos durante o processamento,

armazenamento e uso, pois estão ligados diretamente ao processo de oxidação (ALMEIDA-DORIA; REGITANO-D'ARCE, 2000).

A reação de oxidação, ou seja, a ligação do oxigênio com as moléculas de ácidos graxos ocorrem em suas insaturações. A oxidação pode ocorrer por via enzimática quando as enzimas do próprio vegetal ou de microrganismos iniciam o processo de degradação, ou por via não enzimática e nesta incluem-se a degradação por ação direta do oxigênio (autooxidação), pela presença de metais, por alterações na temperatura ou por fotoxidação. A degradação dos óleos inicia-se com a perda de ácidos graxos insaturados e a formação de hidroperóxidos. Posteriormente, pode ser detectada a presença de compostos carbonil, aldeídos, hidrocarbonetos e produtos tóxicos, o que pode ser considerada como rancidez oxidativa (ARAÚJO *et al*, 2015; ALMEIDA-DORIA; REGITANO-D'ARCE, 2000).

A avaliação da qualidade do óleo pode ser realizada com a determinação dos índices químicos, que refletem as possíveis alterações em suas propriedades originais. A determinação do índice de acidez, por exemplo, é um processo que reflete o nível do produto de uma reação (enzimática ou não) que gera ácidos graxos em forma livre e altera a concentração de hidrogênios. Os índices elevados de acidez indicam aumento de hidrólises de ésteres (MACHADO; CHAVES; ANTONIASSI, 2006; BRASIL, 2005). Outro parâmetro que pode auxiliar na avaliação da qualidade dos óleos vegetais é a determinação de índice de peróxidos. Este método determina substâncias, em termos de miliequivalentes de peróxidos, que oxidam o iodeto de potássio nas condições de teste. Essas substâncias são consideradas como peróxidos ou produtos provenientes da oxidação das gorduras (DE FREITAS, 2016; MACHADO; CHAVES; ANTONIASSI, 2006; KOROB, 2005).

2.2.1 Óleo de castanha-do-Brasil

A castanha-do-Brasil é composta majoritariamente por lipídeos. Estes podem ser extraídos por métodos distintos, sendo o mais comum realizado mecanicamente por prensagem a frio. Este método consiste em colocar as sementes inteiras em uma prensa hidráulica e com aplicação de pressão o óleo é extraído. O óleo pode passar por centrifugação, filtração, decantação ou destilação fracionada para a separação deste de partes residuais provenientes da extração (SCHONS *et al*, 2017).

A obtenção do óleo de castanha-do-Brasil pode ainda ser realizada por solventes apolares, sendo utilizado um ou mais tipos de solventes, geralmente aplicado ao método de extração por soxhlet. No entanto, o uso deste método tem sido desconsiderado, pois os solventes apolares em sua grande maioria apresentam-se danosos ao ambiente e à saúde humana (FREITAS *et al*, 2007). Outros métodos estão sendo cada vez mais aplicados com o intuito de aperfeiçoar a extração de óleos, de maneira a tornar o método mais eficiente, minimizando resíduos no ambiente.

A extração assistida por ultrassom e a extração com fluido supercrítico são exemplo de novas metodologias, que podem ser aplicadas à extração de óleos sem a utilização de solventes orgânicos. A extração assistida por ultrassom não é comumente usada para óleos vegetais, mas tem-se relatos de otimização desta técnica para extração destes (SCHONS, *et al* 2017). Ela consiste na propagação de ondas ultrassônicas e das forças de cavitação resultantes, com a consequente formação de bolhas que se chocam e estouram rompendo o tecido vegetal e liberando o conteúdo intracelular no solvente (GIL-CHÀVEZ, 2013).

A extração com fluido supercrítico vem ganhando notoriedade entre os sistemas de extração de óleos vegetais. Durante esse processo de extração a matriz (sólida ou líquida) é

carregada por um sistema que possui controle de temperatura e pressão, que alteram as propriedades do fluido supercrítico permitindo uma extração mais seletiva (HUANG; LI *et al*, 2018). Com a redução do uso de solventes orgânicos, por questões de segurança dos produtos recuperados e da poluição do ambiente, o dióxido de carbono tem sido o principal solvente utilizado na extração com fluido supercrítico (GROSSO *et al*, 2015; QUITAIN *et al*, 2013).

Durante o beneficiamento da castanha-do-Brasil há o recolhimento de sementes quebradas e de sementes pequenas que não passaram no processo de classificação, para a extração de óleo. Esse processo é uma forma sustentável e econômica de se obter outros produtos a partir da matéria-prima original, já que as sementes quebradas perdem em torno de 40% do seu valor comercial (RODRIGUES *et al*, 2005). O óleo de castanha-do-Brasil possui componentes importantes no que diz respeito à questão nutricional e à saúde humana. As sementes possuem de 60% a 70% de lipídeos, sendo que destes a maioria pertence à classe dos ácidos graxos insaturados, que possuem grande valor terapêutico (QUEIROGA *et al*, 2009).

A Tabela 2 demonstra o perfil de ácidos graxos encontrados no óleo de castanha-do-Brasil extraído por métodos distintos. Dentre os prevalentes temos o ácido graxo linoleico, o ácido graxo oleico, o palmítico e o esteárico. Esses ácidos graxos já foram descritos por muitos autores como agentes promotores da saúde humana, com evidências de uma correlação da ingestão regular destes através da dieta com o aumento da prevenção de diversas doenças.

Ácido Graxo		SANTOS <i>et al</i> (2012)*	SANTOS <i>et al</i> (2013)**	COLPO <i>et al</i> (2014)*
(C 12:0)	Ácido Láurico	-	0,767	-
(C 14:0)	Ácido Mirístico	0,06	0,565	0,07
(C 16:0)	Ácido Palmítico	14,24	14,04	16,74
(C 16:1)	Ácido Palmitoleico	0,01	0,016	0,43
(C 17:0)	Ácido Margárico	-	-	0,14
(C 18:0)	Ácido Esteárico	11,19	10,63	9,97
(C 18:1) (ω 9)	Ácido Oleico	36,26	34,55	28,52
(C 18:2) (ω 6)	Ácido Linoleico	37,53	40,15	36,04
(C 18:3) (ω 3)	Ácido Linolênico	0,08	0,085	0,11
(C 20:0)	Ácido Araquidônico	-	-	0,17
(C 20:1) (ω 9)	Ácido Gadoleico	-	-	0,09
(C 22:0)	Ácido Behênico	-	-	-
(C 22:1)	Ácido Euríxico	0,28	0,436	-
(C 22:2)	Ácido Docosa-hexanóico	0,06	0,108	-

Tabela 2 - Perfil de ácidos graxos (%) do óleo extraído da castanha-do-Brasil

* Óleo extraído por solvente orgânico, **Óleo extraído por CO2 Supercrítico / (-) = Não fornecido pelo autor (ω 9) = ômega 9, (ω 6) = ômega 6, (ω 3) =ômega 3

Os ácidos graxos poliinsaturados possuem grande valor nutricional, principalmente aqueles com ligações duplas entre os carbonos 3 e 7, a contar da extremidade da cadeia com um grupo metila. Esse é o caso dos ácidos graxos linolênico e linoleico conhecidos respectivamente como ômega-3 e ômega-6, que podem ser encontrados na castanha-do-Brasil (NELSON; COX, 2015). O metabolismo desses ácidos torna possível a produção de vários mediadores lipídicos, que desempenham papéis importantes em processos inflamatórios, na circulação sanguínea, na contração da musculatura lisa e na imunidade. Além disso, esses ácidos graxos são importantes para estrutura e função das membranas celulares, na sinalização celular e na regulação da expressão gênica (HUERTA-YÉPEZ; TIRADO-RODRIGUEZ; HANKINSON, 2016).

Os ácidos graxos essenciais, que não podem ser sintetizados pelo corpo humano, devem ser inseridos na dieta regularmente. O ácido graxo mais abundante na castanha-do-Brasil é o linoleico (ômega-6) conforme se observa na Tabela 2. Estudos demonstram que existe uma linha tênue no equilíbrio dos ácidos graxos poliinsaturados do tipo ômega-3 e ômega-6 absorvidos pelo organismo. Já que a atuação destes na inibição ou na promoção de diversos tipos de câncer e no estabelecimento de diversas doenças associadas ao processo inflamatório, ainda não possuem mecanismos completamente elucidados (HUERTA-YÉPEZ; TIRADO-RODRIGUEZ, HANKINSON, 2016; LEAVER *et al*, 2002). A dieta mediterrânea tem sido associada à diminuição de doenças cardíacas, pois nela se encontra em abundância a presença de ácidos graxos ômega-3, e assim mantém-se um equilíbrio com o ácido graxo ômega-6 (NELSON; COX, 2015).

Entre os ácidos graxos mais abundantes do óleo de castanha-do-Brasil, pode-se destacar o ácido graxo palmítico e oleico. Há relatos da associação destes ao aumento da sensibilidade à insulina (IBARROLA-JURADO *et al*, 2014) e com a atividade antimicrobiana sobre *Propionibacterium acnes*, pelo aumento da expressão de β -defensina tipo 2 que pode promover a diminuição da incidência, tamanho, e multiplicação de lesões de pele (NAKATISUJI *et al*, 2010).

O ácido graxo oleico ingerido na dieta pode gerar benefícios através do seu mediador lipídico oleoiletanolamida. Este mediador está relacionado ao aumento da biossíntese de glicofosfolipídeos de membrana, à diminuição do peso corporal e ao aumento da sensação de saciedade (BOWEN *et al*, 2017; PALOMER *et al*, 2017). Relatos na literatura associam ainda o ácido graxo oleico à atividade antimicrobiana sobre as cepas de *Staphylococcus aureus*, incluindo as resistentes à meticilina (CHAO-HSUAN *et al*, 2011).

Um dos componentes importantes que podem compor o óleo de castanha-do-Brasil é a vitamina E, termo geral utilizado para tocoferóis e tocotrienóis (a-,b-,g-,e d-). Estes são solúveis em lipídeos e, portanto podem se acumular em óleos vegetais (SATTLER *et al*, 2004). Os tocoferóis possuem um anel aromático substituído e uma cadeia lateral longa de isoprenoide, essas estruturas podem se associar a membranas celulares, aos depósitos de lipídeos e também as lipoproteínas no sangue. Caracterizam-se pelo papel de antioxidante biológico, pois seus anéis aromáticos ligam-se a formas reativas de radicais de oxigênio e de outros radicais livres, destruindo-as. Desta forma, essas moléculas são capazes de conferir proteção aos ácidos graxos insaturados, impedindo o dano oxidativo aos lipídeos de membrana (NELSON; COX, 2015; FUNAZAKI *et al*, 2012).

Os altos teores de ácidos graxos da castanha-do-Brasil tornam este produto passível à peroxidabilidade, já que podem ocorrer processos oxidativos que levam à redução do valor terapêutico e nutricional destes compostos. Além disso, a degradação dos lipídeos pode conferir ao produto mau cheiro e sabor alterado, oriundos da rancificação, principalmente quando as castanhas são armazenadas por muito tempo em temperaturas e umidades relativas altas (DA SILVA; ASCHERI; DE SOUZA, 2010). A aplicação de tecnologias que auxiliem a manutenção das propriedades do óleo da castanha-do-Brasil ao longo do tempo de armazenamento, é de valor essencial para as empresas alimentícias e farmacêuticas.

2.2.2 Avaliação da atividade antifúngica

O Brasil é conhecido mundialmente pela sua diversidade vegetal. Muitos extratos e óleos vegetais são utilizados como tratamento em infecções fúngicas (BOTELHO *et al*, 2007). Na região Amazônica, devido à sua biodiversidade, é comum o uso de extratos e óleos vegetais para fins medicinais (MENEZES *et al*, 2009). Dentre as espécies utilizadas tem - se:

Carapa guianensis (Andiroba), com efeito inibitório sobre o gênero *Fusarium* (FARIAS *et al*, 2016); *Copaifera multijuga* (Copaíba), efeito inibitório promissor contra algumas cepas dos gêneros *Aspergillus* e *Candida* (DEUS *et al*, 2011); *Bryophyllum calycinum* Salisb. (Folha-de-pirarucu) com atividade contra o crescimento do gênero *Candida* (MENEZES *et al*, 2009) e por fim, *Eleutherine plicata* Herb., com atividade contra o crescimento do gênero *Cladosporium* (ALVES *et al*, 2003).

Neste contexto, o presente estudo propôs uma investigação *in vitro* da atividade antifúngica do óleo de castanha-do-Brasil contra duas cepas patogênicas, *Aspergillus fumigatus* e *Aspergillus niger*. Os fungos deste gênero são capazes de gerar a aspergilose, infecção fúngica oportunista que atinge a região respiratória de humanos e alguns animais (galinhas, perus e pinguins) (POESTER *et al*, 2015). Estes fungos caracterizam-se por serem filamentosos com hifas hialinas septadas e ramificadas, que se diferenciam em estruturas reprodutivas típicas para originar os conídios (PARK; MEHRAD, 2005).

2.3 Secagem

Os animais e os vegetais são as fontes de alimentos em geral, no entanto a apresentação destes alimentos pode ser realizada de diversas maneiras. A forma com que se apresentam os alimentos pode influenciar na conservação destes. A adoção de métodos de conservação dos alimentos é importante, pois minimiza danos causados pelo meio, conserva os níveis das propriedades nutricionais e mantém o alimento seguro por mais tempo. Os danos degradativos podem ocorrer devido a problemas mecânicos, físicos, químicos ou biológicos (MUJUMDAR, 2004).

A secagem é um método de remoção da água presente nos alimentos, sendo uma das formas mais econômicas de se preservar um produto. A redução da umidade presente em alimentos pode diminuir a degradação provocada por microrganismos, além de diminuir o volume do alimento e assim melhorando as formas de armazenamento e transporte. O processo de secagem é complexo, pois envolve transferência transitória de calor e massa. Essa transferência pode levar a transformações químicas ou físicas, o que pode causar alterações na qualidade do produto (CHEN *et al* 2019; MUJUMDAR; ZHONGHUA, 2007).

Existem basicamente dois processos de secagem: os naturais e os artificiais, que se diferem pelo tipo de agente responsável pela remoção da água do produto. Quando se trata de processos de desidratação artificiais, tem-se o controle minucioso da temperatura, umidade e corrente de ar. Neste caso, o produto pode ser seco com ar, vapor superaquecido, no vácuo, com gás inerte ou pela aplicação direta de calor (GAVA *et al*, 2009). Existem vários tipos de desidratadores, porém a escolha deve ser baseada na natureza do produto a ser desidratado, pelo fator econômico e pela forma que se deseja apresentar o produto final.

2.3.1 Liofilização

A liofilização é uma técnica de secagem de materiais, que forma produtos que podem ser considerados veículos adequados de vitaminas e nutrientes, sem a adição de conservantes. Diante do elevado valor nutricional da castanha-do-Brasil e de seus derivados, faz-se necessária à adoção de medidas de conservação destes, a fim de se manter as propriedades naturais por mais tempo.

A Figura 3 demonstra as fases da água em relação a duas variáveis: pressão e temperatura. Nesse gráfico pode-se perceber em que condições ocorrem o processo de

liofilização, sendo fundamentais os ajustes dos fatores extrínsecos para o sucesso de todas as fases da liofilização. Um material sólido que recebe uma quantidade de calor específico e abaixo do ponto triplo (Figura 3), sofre transformação direta da água contida neste material do estado sólido para o de vapor, ou seja, ocorre a sublimação da água contida no material (METTA; AYROSA; PALETTA, 2012).

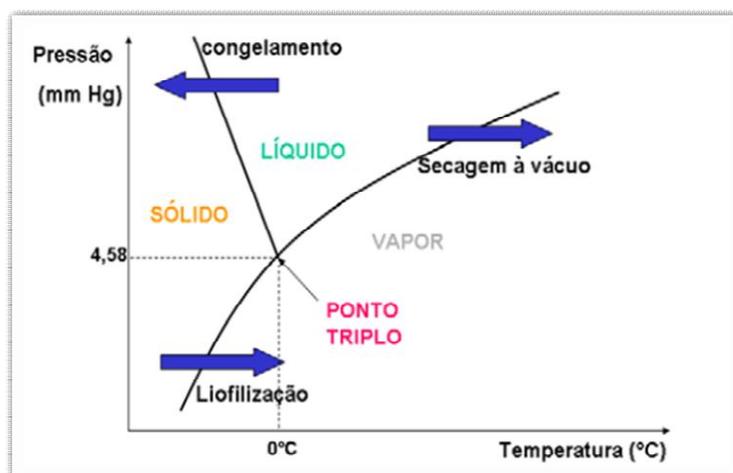


Figura 3 - Diagrama de fases da água

Fonte: Metta, Ayrosa e Paletta (2012).

A liofilização é uma técnica que consiste na secagem de um material iniciando-se com o congelamento do mesmo seguido da sublimação do gelo. Esta técnica torna-se vantajosa por não utilizar calor no processo de secagem, mantendo assim elementos termolábeis estáveis. Esta vantagem possibilita a aplicação desta técnica em diversas áreas como, farmacêutica, alimentícia e na biotecnologia, possibilitando o armazenamento de materiais biológicos e produtos químicos. Por esses motivos os produtos gerados através desta técnica são de qualidade superior aos que são desidratados por outras (SANTO *et al*, 2013; RATTI, 2001).

A liofilização mostra-se aplicável na produção e conservação de alimentos altamente nutritivos, conferindo preservação de suas características químicas e físicas. Este método torna-se uma alternativa eficaz frente ao aumento da demanda de alimentos de origem

vegetal, uma vez que a preservação destes está relacionada a manutenção de suas qualidades. Sendo assim, a retirada da água dos materiais por liofilização é uma técnica capaz de se preservar compostos voláteis, proteínas, vitaminas termosensíveis e de diminuir a proliferação de microrganismos (MUJUMDAR, 2004).

O processo de liofilização pode ser dividido em três estágios principais: o congelamento, sublimação e dessecamento.

O primeiro estágio é o congelamento, que consiste na transferência de calor em estado transiente, onde o alimento perde calor para o meio e o solvente separa-se do soluto para formar cristais de gelo. O sucesso de todo o processo de liofilização possui causa significativa atribuída ao sucesso no congelamento. É nesse momento em que o tamanho, distribuição e forma dos poros no material são definidos, e essas características influenciam a transferência de massa e calor durante o processo de secagem. O congelamento tem fundamental importância no tempo de secagem dos produtos (LIAPIS *et al apud* MARQUES, 2008).

A taxa de congelamento define a qualidade deste processo inicial. A forma, o tamanho e a distribuição dos cristais de gelo formados são determinados pela taxa de congelamento. Baixas taxas de congelamento geralmente estão associadas à formação de cristais de gelo e poros grandes no produto a ser liofilizado. Já as taxas de congelamento elevadas estão associadas a cristais de gelo e poros menores (ORDÓÑEZ, 2005), o que pode levar à diminuição da perda de qualidade do produto e à diminuição da desnaturação proteica, além de não causar danos em membranas celulares. Esses fatores relacionados ao congelamento rápido podem culminar na preservação de substâncias termolábeis, do aroma e sabor (DELGADO; RUBIOLO, 2005).

O segundo estágio da liofilização é um processo denominado de sublimação ou secagem primária. Esse é um processo endotérmico e, portanto depende do fornecimento de

calor gerado por mecanismos condutivos ou por radiação e ainda pela combinação destes. A secagem primária ocorre em um sistema fechado com uma pressão menor ou igual à pressão de vapor de equilíbrio do solvente congelado (SABLANI; RAHMAN, 2002). A temperatura é um ponto importante durante esse estágio, pois a estabilidade do produto está relacionada com a temperatura da camada congelada durante a secagem primária. Além da temperatura outros fatores podem influenciar a estabilidade do produto, incluindo pressão da câmara, temperatura da prateleira, coeficiente de transferência de calor dos frascos e resistência do produto (TANG; PIKAL, 2004).

Na secagem primária ocorre à sublimação do vapor d'água que carrega uma quantidade significativa de calor do produto, desta forma tem-se a redução da temperatura do produto congelado. O calor fornecido ao produto congelado deve ser monitorado, pois o aumento demasiado da temperatura pode causar danos a amostra seca. Esses danos podem acarretar na perda de bioatividade das moléculas, mudança na coloração do produto, reações degradativas e deformações estruturais na camada seca (MARQUES, 2008). Muitos estudos são feitos para aperfeiçoar esse estágio, que é o mais longo e tem papel fundamental no processo de liofilização. O fim desta etapa é marcado pelo desaparecimento da camada congelada e, portanto com o fim da interface de sublimação.

O terceiro estágio da liofilização é a secagem secundária, que consiste na retirada da água que está ligada à estrutura do material. Assim como na sublimação tem-se o fornecimento de calor que não deve exceder 50°C, levando à diminuição brusca da umidade residual e assim tornando o produto estável por mais tempo (CHENG; RU; QIN, 2002). A temperatura deve ser mantida alta durante o tempo necessário para permitir a dessorção da água, sendo mais eficiente a aplicação de altas temperaturas por pouco tempo. A aplicação de temperatura elevada na secagem secundária não é capaz de causar danos em estruturas

importantes como, por exemplo, das proteínas. Estudos revelam que proteínas em materiais secos com umidade menor que 15% sofrem desnaturação somente em temperaturas acima de 100 °C (MARQUES, 2008; DELGADO; RUBIOLO, 2005).

Todas as características da liofilização apresentadas neste estudo fazem desta técnica uma importante ferramenta na secagem de materiais para aumento da estabilidade e preservação da qualidade dos mesmos. Quando se trata de produtos de gênero alimentício, a preservação da cor, aroma e sabor são tão importantes quanto a preservação de moléculas bioativas presentes naturalmente nos alimentos. A liofilização tem como vantagem a não utilização de solventes orgânicos que atende o aspecto da “química verde”, na produção de alimentos.

Durante o beneficiamento da castanha-do-Brasil há o recolhimento de sementes quebradas para a extração de óleo. Esse processo é uma forma sustentável e econômica de se obter outros produtos a partir da matéria-prima original, já que as sementes quebradas perdem o seu valor comercial (RODRIGUES *et al*, 2005). O óleo de castanha-do-Brasil é rico em compostos bioativos, que podem ser explorados para a geração de novos produtos na indústria alimentícia, farmacêutica e de cosméticos. Por se tratar de um produto que sofre perdas significativas durante o tempo de armazenamento, é importante encontrar meios de conservação deste produto. A microencapsulação do óleo de castanha-do-Brasil por meio da liofilização pode fornecer não só a estabilidade do óleo, mas também agregar valor ao produto, criando assim novas opções de mercado para um dos derivados da castanha-do-Brasil.

2.4 Microencapsulação

A microencapsulação é um processo de empacotamento com finas coberturas poliméricas capazes de envolver materiais em diferentes estados (líquido, sólido ou gasoso). As partículas poliméricas denominadas de microcápsulas têm o potencial de envolver, proteger e liberar em uma velocidade específica e sob condições determinadas, o material envolvido. Essa tecnologia gera melhoramento do desempenho do material ativo e aumenta as opções de aplicação de um determinado produto (CONSTANT; STRINGHETA, 2002).

O material a ser encapsulado pode ser denominado de recheio ou núcleo e a partícula que envolve o material é denominada de material de parede, membrana, cobertura ou até mesmo material encapsulante. As cápsulas podem ser classificadas de acordo com o seu tamanho, cápsulas de tamanho entre 1 a 1000 μm são denominadas microcápsulas, entre 10 e 1000 nm nanocápsulas e as que possuem mais de 5000 μm são as macrocápsulas. Em relação a forma das microcápsulas podem-se perceber duas estruturas distintas: a microcápsula com o núcleo centralizado completamente envolvido por filme definido e contínuo composto pelo material de parede; microcápsula em que o núcleo se apresenta uniformemente disperso em uma matriz polimérica. As cápsulas ainda podem ser classificadas como microcápsulas ou microsferas (Figura 4), a primeira apresenta-se como reservatório e as microsferas como um sistema matricial (UMER *et al*, 2011; AZEREDO, 2008; CONSTANT; STRINGHETA, 2002).

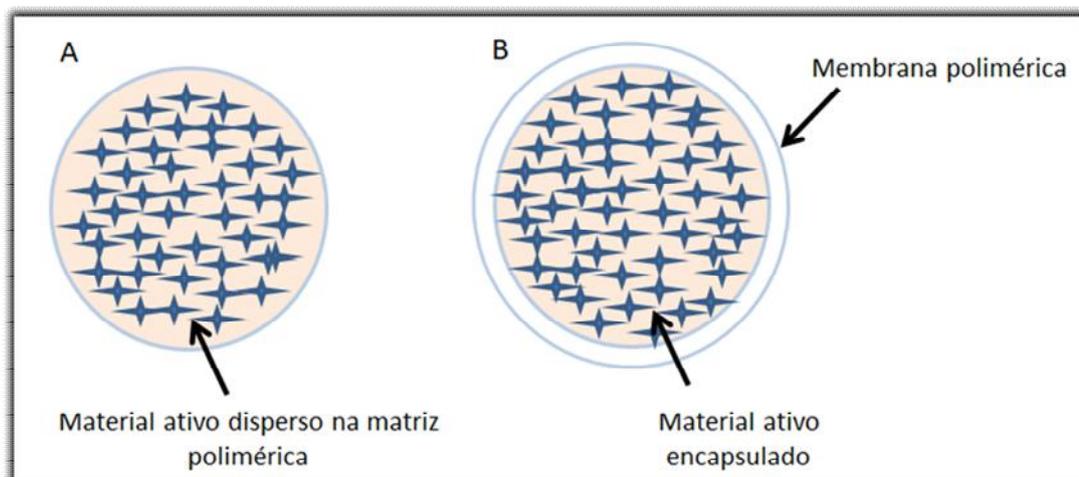


Figura 4 - Microcápsulas e microesferas - (A) Microesfera – material ativo disperso em uma matriz polimérica. (B) Microcápsula – material ativo está envolvido pelo polímero encapsulante.

Fonte: Adaptado de Suave *et al* (2006).

A microencapsulação pode ser utilizada para encapsular diversos tipos de materiais como, por exemplo, pigmentos, compostos que geram sabor, nutrientes, enzimas, conservantes, acidulantes, entre outros. Essa técnica vem ganhando grande destaque na indústria alimentícia, pois as microcápsulas podem melhorar a aparência e as propriedades de um material ativo, além de manter o produto estável por mais tempo (DESAI; PARK; MEHRAD, 2005). Dentre as vantagens de se encapsular um produto de gênero alimentício pode-se destacar:

- Redução da reatividade entre fatores ambientais e o material encapsulado. No que diz respeito aos fatores ambientais pode-se considerar luz, umidade, calor e oxigênio (BRASILEIRO, 2011);
- A liberação controlada do material encapsulado para o meio, evitando perdas do produto e das suas propriedades (REBELLO, 2009);

- Melhoria das propriedades do material, podendo-se assim mascarar algumas características como odor, sabor ou cor indesejáveis (DUBEY, 2009);
- Facilidade na produção e na reprodutibilidade (WU, 2004);
- Aumento do tempo de conservação do produto final, facilidade na manipulação e no transporte (BRASILEIRO, 2011).

Existem diversos métodos utilizados para a formação de microcápsulas e muitos autores classificam estes métodos em três categorias (MADENE *et al*, 2006; DESAI; PARK; MEHRAD, 2005; SANTOS; FERREIRA; GROSSO, 2000):

- Físicos: Atomização, extrusão estacionária, *spray drying*, suspensão por ar, *spray chilling* e *spray cooling*, leite fluidizado, co-cristalização e liofilização;
- Químicos: polimerização interfacial, indução molecular e polimerização *in situ*;
- Físico-químicos: coacervação simples e complexa, lipossomas, lipoesferas e evaporação do solvente.

A microencapsulação é um processo facilmente aplicado à indústria alimentícia, possibilitando uma maior conservação de vitaminas, microrganismos, enzimas, óleos, ácidos, bases, aminoácidos, óleos essenciais, corantes, gases e sais (DESAI; PARK; MEHRAD, 2005). Quando se trata de óleos com alto teor de ácidos graxos insaturados que estão mais susceptíveis a oxidação, a microencapsulação torna-se uma alternativa de manutenção desses ácidos graxos. Isso porque o material de parede cria uma barreira para ação de agentes ambientais que aceleram o processo de degradação.

2.4.1 Material de parede

O material de parede afeta a estabilidade das micropartículas, a eficiência do processo e o grau de proteção do material ativo. A natureza do material encapsulante é de fundamental importância para a garantia do sucesso da encapsulação (ASCHERI; MARQUEZ; MARTUCC, 2003). A escolha do material de parede deve complementar criteriosamente as características do material a ser encapsulado, levando em consideração as características físicas e químicas do produto. O material encapsulante deve apresentar características compatíveis com o núcleo, além de baixa viscosidade, alta concentração de sólidos, transição vítrea, capacidade de formação de filme, compatibilidade com o núcleo, fácil de reconstituição, baixo custo, baixa higroscopicidade, fáceis de controlar e com fatores econômicos que viabilizem a produção (DE MENEZES *et al*, 2013; AZEREDO, 2008).

Os materiais mais utilizados para a microencapsulação são os carboidratos, que possuem estruturas capazes de se ligar a diversos compostos, apresentam-se em diversidade e possuem baixo custo. Os mais utilizados dentro desta classe são as gomas, a maltodextrina e o amido. No entanto, é muito comum usar misturas para englobar o maior número de fatores que levam ao sucesso da encapsulação (AZEREDO, 2008). A estabilidade de emulsões é um fator importante na microencapsulação, para que o material seja um bom emulsificante ele deve apresentar grupos hidrofóbicos e hidrofílicos. Quanto maior a capacidade emulsificante do material de parede, melhor a retenção dos compostos (REINECCIUS, 2004). Frequentemente misturas de carboidratos e proteínas têm sido realizadas, a fim de melhorar as propriedades emulsificantes e filmogênicas durante o processo de microencapsulação (RUSLI; SANGUANSRI; AUGUSTIN, 2006).

2.4.1.1 Goma Arábica

A Goma Arábica é uma substância de cor amarelada extraída do caule e dos ramos das árvores de acácias, com baixa viscosidade em soluções aquosas, incompatível com gelatina e alginato de sódio e compatível com a maioria das gomas. Sua composição química é caracterizada pela presença de polissacarídeos em cadeia longa e ramificações formadas por galactose, arabinose, ramnose (WU *et al*, 2015), além de possuir uma fração de 2% de proteínas que garantem efeito emulsificante e aumentam poder de carrear moléculas bioativas (YANG; XIAO; DING, 2009).

Formada por um polímero hidrofílico tridimensional, a Goma Arábica possui a capacidade de absorção de grandes volumes de água (GEROLA *et al*, 2016). Muito utilizada como estabilizante, espessante, aditivos e para prevenir a cristalização do açúcar em diversas indústrias de alimentos (SARIKA; NIRMALA, 2016). A formação de misturas com a Goma Arábica é totalmente viável, já que esta é compatível com carboidratos, proteínas e amidos modificados, criando-se assim uma emulsão mais estável e melhorando o processo de formação da cápsula (WANDREY; BARTKOWIAK; HARDING, 2010).

A Goma Arábica apresenta muitas características que a tornam um material encapsulante por excelência, principalmente pela sua solubilidade, sabor suave e alta estabilidade oxidativa que é de suma importância quando aplicada a óleos. Por outro lado, ela possui alto custo e problemas com disponibilidade. Desta forma, a substituição parcial ou total da Goma Arábica tem sido promovida e cada vez mais estudada (COSTA, 2013; JAFARI; BEHESHTI; ASSADPOOR, 2012).

2.4.1.2 Concentrados proteicos vegetais

As proteínas possuem características importantes que as tornam emulsificantes de qualidade para alimentos, isso se deve principalmente a sua natureza anfifílica. Essa natureza lhes permite adsorver a superfície de gotas de óleos e reduzir a tensão superficial. As propriedades físico-químicas das proteínas podem influenciar nas taxas de adsorção na interface óleo-água, isso porque os padrões de resíduos hidrofóbicos e hidrofílicos na superfície das proteínas interferem na relação delas com a interface água-óleo. As frações de proteínas possuem propriedades funcionais distintas e que estão relacionadas à formação de gel, biocompatibilidade, bioestabilidade, estabilidade térmica e emulsificação (XIONG *et al*, 2018; DELAHAIJE *et al*, 2013).

Materiais derivados de produtos naturais são amplamente investigados para aplicações médicas, composição de novos produtos alimentícios e cosméticos. A demanda por concentrados proteicos vem crescendo a cada dia mais, por conta da sua funcionalidade, pelo baixo preço e por serem potenciais ingredientes funcionais. Esses concentrados proteicos podem ser subprodutos da produção de alimentos de maior demanda de mercado. A utilização de subprodutos das indústrias de alimentos torna-se uma alternativa sustentável para o aproveitamento de resíduos, que outrora seriam descartados. Os concentrados proteicos vegetais estão se destacando nas indústrias de alimentos, isso se deve ao aumento de uma necessidade apresentada pelos consumidores por tecnologias “verdes” e pela prática de dietas restritivas (MALIK; SAINI, 2018; TANSAZ *et al*, 2018).

As proteínas animais são dispendiosas em relação ao preço de mercado de proteínas vegetais, e necessitam de uma logística complexa de produção e fiscalização principalmente pelos riscos de transmissão de doenças, como a encefalopatia espongiforme bovina. Dessa

forma, o mercado vem sofrendo pressões para o uso de matérias-primas sustentáveis e de baixo custo (ENDRES, 2001). A substituição de proteínas animais requer ainda muitos estudos e investimentos tecnológicos, a fim de se compreender melhor o comportamento, as características físico-químicas e as propriedades funcionais das proteínas.

O sucesso da utilização de proteínas como material de parede depende das suas propriedades funcionais e não da sua qualidade nutricional. As propriedades funcionais refletem como as proteínas irão interagir com outros materiais. Essas propriedades estão relacionadas às características físicas, químicas e conformacionais das proteínas. O conhecimento da correlação entre estrutura e propriedades funcionais das proteínas é fundamental para aplicação destas em sistemas alimentares. No entanto, não se deve desconsiderar que as proteínas vegetais são altamente diversas e complexas (ALTSCHUL; WILCKE, 2013).

Uma característica importante das proteínas para aplicações industriais é a solubilidade, que pode ser compreendida como uma quantidade de proteína em uma solução ou dispersão coloidal sob condições específicas sem que estas sofram sedimentação por centrifugação. As proteínas vegetais possuem solubilidades distintas, por exemplo, as globulares (globulinas) são muito solúveis, já as proteínas constituintes de membranas e estruturais são essencialmente insolúveis. Há uma diversidade de proteínas vegetais, porém existem classes expressivas como glutenina (solúvel em soluções alcalinas aquosas), globulina (solúvel em soluções salinas), albumina e prolamina (solúveis em água e etanol, respectivamente) (AMAGLIAN *et al*, 2017). De maneira geral, a superfície polar ou apolar das proteínas determinará o grau de solubilidade, pois as interações entre solventes e proteínas ocorrem em resíduos de aminoácidos da superfície da proteína.

2.4.1.3 Concentrado proteico de soja

As sementes de soja possuem de 35 - 40% de proteínas das quais as mais abundantes são: glicinina e beta-conglicinina (50 – 90%). A fração de glicinina (globulina 11S) tem peso molecular 350 kDa quanto a beta-glicinina (globulina 7S) tem cerca de 70 kDa. As proteínas da soja possuem diversas propriedades que auxiliam no processo de microencapsulação, como por exemplo, elas apresentam boa solubilidade, boa adsorção de água e de gordura, boa estabilização de emulsões, geleificação, formação de espuma, boas propriedades filmogênicas e organolépticas (RUIZ-HENESTROSA *et al*, 2007).

As características das proteínas da soja podem ser alteradas pelo pH do meio, ou por tratamentos térmicos, concentração de sais e outros ingredientes (óleos e carboidratos, por exemplo) e pela porcentagem no núcleo ativo na mistura inicial. Vários autores relataram o uso das proteínas de soja como material encapsulante (ORTIZ *et al*, 2009). A mistura de proteínas de soja com carboidratos têm demonstrado melhor proteção ao núcleo, maior estabilidade oxidativa e melhores condições de secagem (NESTERENKO *et al*, 2013).

2.4.1.4 Concentrado proteico de ervilha

As sementes de ervilhas possuem de 20% a 30% de proteínas, e destas as mais abundantes são as globulinas, albuminas e glutelinas (CHEN *et al*, 2019). Dentre as globulinas tem-se a legumina, vicilina e convicilina. A legumina da ervilha representa a fração 11S com massa molecular entre 350 kDa, a vicilina e a convicilina com fração 7S e massa molecular de aproximadamente 150 kDa (KOYORO *apud* NESTERENKO *et al*, 2013).

As globulinas em especial possuem boas propriedades funcionais o que as tornam boas opções de material de parede. As proteínas de grãos de ervilha possuem boa capacidade de formação de gel e propriedade emulsificante (RAYMUNDO *et al*, 2005). No entanto, quando essas proteínas são associadas a carboidratos melhoram a solubilidade, aumentam a formação de espuma e tornam-se surfactantes. Essas misturas possibilitam a criação de emulsões estáveis, com melhor distribuição e maior eficiência na microencapsulação (LIU *et al*, 2010).

2.4.1.5 Concentrado proteico arroz

A quantidade de proteínas encontradas no arroz pode variar de acordo com o processo empregado para a moagem dos grãos em frações menores e pelas propriedades dos grãos. Desta forma, a fração proteica dos grãos de arroz pode variar de 6% até 15%. A fração proteica dos grãos de arroz é considerada hipoalergênica e hipocolesterolêmica (JU; HETTIARACHCHY, 2001). As quatro frações de arroz mais comuns são albumina que apresenta boa solubilidade em água, globulina que é solúvel em soluções salinas, glutelina que encontra boa solubilidade em meios ácidos e prolamina que é solúvel em álcool (SHIH, 2003).

Apesar da baixa solubilidade das proteínas de arroz, estas têm sido empregadas em diversas áreas da produção de alimentos, formando suplementos nutricionais e esportivos. Em outros casos, tem sido utilizadas como ingredientes de valor agregado á diversos produtos, tornando-se uma alternativa às proteínas de leite e de soja (RECHE *et al*, 2010; AGOSTINI *et al*, 2007; FIOCCHI *et al*, 2006; LASEKAN *et al*, 2006). As proteínas de arroz são obtidas a partir de farelo de arroz, grãos de arroz quebrados e dos resíduos da extração de amido do arroz. Assim, o processo torna-se menos dispendioso e mais sustentável (HOOGENKAMP; KUMAGAY; WANASUNDARA, 2016).

3.0 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Desenvolver um novo produto através da microencapsulação do óleo de castanha-do-Brasil utilizando uma mistura de proteínas vegetais e goma arábica como material de parede, e eleger a melhor matriz polimérica para o encapsulamento do óleo de castanha. Além de avaliar a estabilidade oxidativa e a qualidade físico-química dos produtos gerados em comparação ao óleo *in natura*.

3.2 Objetivos específicos

- Extrair e caracterizar o óleo de castanha-do-Brasil;
- Caracterizar os concentrados proteicos vegetais;
- Testar a microencapsulação por liofilização do óleo de castanha-do-Brasil com uma mistura de goma arábica e três tipos de concentrados proteicos de arroz, soja e ervilha;
- Caracterizar por testes físico-químicos os produtos microencapsulados;
- Executar testes de vida de prateleira dos produtos microencapsulados e avaliar sua estabilidade oxidativa em comparação ao óleo *in natura*, além de realizar testes microbiológicos.
- Eleger o melhor material de parede para a microencapsulação do óleo de castanha-do-Brasil, ressaltando as diferenças no efeito protetor das microcápsulas ao óleo de castanha.

4.0 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Matéria-prima

A castanha-do-Brasil foi obtida em uma usina de beneficiamento do Estado do Pará, Lote CA008/18 data de fabricação: 11/06/2018. Este lote é composto pela reunião de castanhas de três regiões diferentes do estado do Pará, Wai-wai, Trombetas e Carapanã. A castanha-do-Brasil apresentou-se seca, sem casca, com película e embaladas em sacos aluminizados a vácuo (Figura 5). O processo de beneficiamento da castanha-do-Brasil é realizado em etapas. Estas etapas possibilitam a caracterização, a avaliação da qualidade, o emprego de métodos de conservação e a classificação das castanhas recebidas de diversas regiões (PACHECO; SCUSSEL, 2006). A Figura 6 é um fluxograma que demonstra as etapas do processo de beneficiamento da castanha.



Figura 5 - Castanha-do-Brasil

Fonte: Próprio autor (2018).

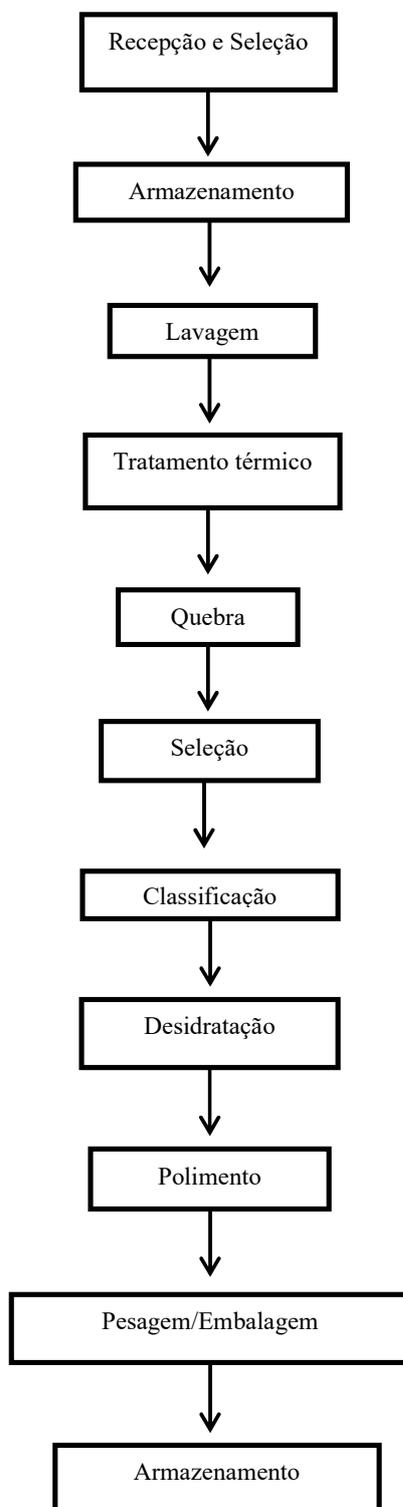


Figura 6 - Fluxograma do beneficiamento da castanha com e sem casca

Fonte: Adaptado de Pacheco e Martins (2013).

4.1.1 Extração do óleo de castanha-do-Brasil por prensagem a frio

A extração do óleo foi realizada por prensagem a frio através de prensa mecânica com as amêndoas inteiras. Em seguida, o óleo bruto ficou em repouso em frasco âmbar e ao abrigo da luz por 48 horas. Ao fim destas, o sobrenadante foi recolhido e a parte residual descartada. O óleo de castanha-do-Brasil extraído ficou armazenado sob refrigeração e ao abrigo da luz até o início das análises.



Figura 7 – Prensa mecânica utilizada para extração do óleo

Fonte: Próprio autor (2018).

4.1.2 Caracterização físico-química do óleo

As determinações realizadas em análise de óleos e gorduras são geralmente denominadas de índices, que expressam as propriedades físico-químicas destes. No presente estudo, foi realizada a determinação do índice de peróxidos e de acidez titulável (métodos volumétricos) (AOAC, 2016). Além disso, pode-se analisar o óleo quanto à presença de aflatoxinas e o seu potencial antifúngico foi testado. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

4.1.2.1 Determinação do índice de acidez titulável

Pesou-se 2g do óleo de castanha-do-Brasil em frasco Erlenmeyer de 125 mL. Adicionou-se 25 mL da solução de éter:álcool (2:1) neutra. Posteriormente, com a adição de 2 gotas de solução de fenolftaleína, foi realizada a titulação com solução de hidróxido de sódio 0,01M padronizada, até o surgimento da coloração rósea (AOAC, 2016). A coloração persistiu por mais de 30 segundos. O índice de acidez titulável foi determinado pela equação:

$$\text{Índice de Acidez} = (V \times F \times 5,610) / P$$

Onde:

V = nº de mL de solução de hidróxido de sódio 0,1 M gasto na titulação;

F = fator da solução de hidróxido de sódio;

P = nº de g da amostra.

4.1.2.2 Determinação do índice de peróxidos

Pesou-se 5 g do óleo de castanha-do-Brasil em frasco Erlenmeyer de 125 mL. Adicionou-se 30 mL da solução de ácido acético-clorofórmio (3:2) e agitou-se a solução até a

dissolução total do óleo. Foram adicionados 0,5 mL de solução saturada de iodeto de potássio e toda a mistura foi colocada em repouso, ao abrigo da luz por aproximadamente um minuto. Acrescentou-se 30 mL de água destilada, titulou-se esta solução com solução de tiosulfato de sódio 0,01N em constante agitação, até que a coloração amarela tivesse quase desaparecida. Adicionou-se 0,5 mL de solução indicadora de amido e continuou-se a titulação até o completo desaparecimento da coloração azul. Foi realizada uma prova em branco nas mesmas condições de análise. O índice de peróxidos foi calculado pela equação abaixo:

$$\text{Índice de peróxidos} = ((A-B) \times N \times F \times 1000) / P$$

A = nº de mL da solução de tiosulfato de sódio 0,1 (ou 0,01 N) gasto na titulação da amostra;

B = nº de mL da solução de tiosulfato de sódio 0,1 (ou 0,01 N) gasto na titulação do branco;

N = normalidade da solução de tiosulfato de sódio;

F = fator da solução de tiosulfato de sódio;

P = nº de g da amostra.

4.1.2.3 Determinação da densidade relativa

Para a determinação da densidade relativa foi utilizado picnômetro de vidro limpo e seco. Primeiramente, foi pesado o picnômetro vazio, em seguida pesou-se com água destilada e por fim com óleo de castanha-do-Brasil (AOAC, 2016). O procedimento foi realizado em triplicata. O valor da densidade da amostra foi obtido através da equação abaixo:

$$\text{Densidade Relativa} = M2-M0 / M1- M0$$

Onde:

M0= peso do picnômetro vazio;

M1= peso do picnômetro com água;

M2= peso do picnômetro com óleo.

4.1.3 Análises de aflatoxinas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

4.1.3.1 Extração das Aflatoxinas

Para o primeiro teste (a) de extração das aflatoxinas do óleo de castanha-do-Brasil bruto foi separada 50g do mesmo, e adicionou-se 250mL da solução metanol-água (55:45) e 50mL de solução de ácido clorídrico 0,1 N. A mistura foi agitada e centrifugada a 3000g por 15 minutos a 25°C. Posteriormente, realizou-se a filtração em papel Whatman nº1 e 50 mL do filtrado foi recolhido em um funil de separação de 250 mL. Neste funil adicionou-se 50 mL de solução de cloreto de sódio (10%) e toda a mistura foi agitada por 30 segundos. No final da agitação acrescentou-se 50 mL de hexano, agitou-se a mistura e 25 mL da parte inferior foi separada para outro funil de separação. Aos 25 mL da mistura adicionou-se 25 mL de diclorometano (a extração com diclorometano foi realizada 3 vezes). O diclorometano foi evaporado em banho-maria, adicionaram-se 200 µL de hexano e 50 µL de ácido trifluoracético esta mistura ficou em repouso por 5 minutos. Ao final adicionou-se 1,950 µL da solução de água:acetonitrila (9:1), agitou-se por 30 segundos, novamente repouso por 10 minutos. A parte inferior foi separada em vial. Este método de extração foi com base nos métodos 970:40 da AOAC (1990) aprovado novamente em 2000 (AOAC, 2016) e Magzoub *et al* (2019).

Foi realizado um segundo teste (b) para a extração de aflatoxinas do óleo de castanha-do-Brasil, onde 10 µL do mesmo foi incubado por 7 dias a 25°C em placas de Petri contendo meio Ágar Extrato de Malte previamente esterilizado. Após 7 dias, as colônias que apresentaram crescimento foram repicadas para placas de Petri nas mesmas condições aplicadas anteriormente. Os meios com as colônias fúngicas foram cortados e transferidos para um Erlenmayer de 250 ml. Neste adicionou-se 10 ml de metanol (grau HPLC), agitou-se moderadamente esta mistura por 1 hora. Após a agitação a mistura foi filtrada em gaze, o

filtrado foi coletado com seringa e filtrado novamente em filtros millipor 0,45µm e adicionados em vial. Este método foi adaptado com base no descrito por Costa (2015).

4.1.3.2 Condições cromatográficas

Uma curva padrão de oito pontos foi obtida através de uma solução de trabalho contendo as aflatoxinas B1, B2, G1 e G2. Para a detecção das aflatoxinas foi utilizada Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, com detector de fluorescência com excitação de 360 nm e emissão de 440 nm, sistema de derivatização Kobra-cell® para derivatização pós-coluna das aflatoxinas B1 e G1, ligado a uma corrente de 100µA. Coluna XBridge™ C18, 5µm, 4,6x250mm foram empregadas para separação dos compostos. A fase móvel utilizada foi composta por Acetonitrila: Metanol: Água: KBr: HNO3 4M nas proporções (15:20:65:198mg:585µL), em um fluxo de 0,8mL/min., com volume de injeção de 40µL. Os cálculos para derivatização pós-coluna (com Kobra-cell®) estão apresentados abaixo.

$$\text{Quantidade de Aflatoxinas } (\mu\text{g/kg}) = (\text{Ca} \times \text{V}_1 \times \text{V}_3) / \text{m} \times \text{V}_2$$

Onde:

Ca = concentração da amostra obtida através da curva de calibração (µg/mL);

V1 = volume de extração da amostra (250 mL);

V2= volume do filtrado adicionado à coluna de imunoafinidade (10 mL);

V3= volume de retomada do extrato purificado (3 mL);

m= massa da amostra em kg.

4.1.4 Avaliação da atividade antifúngica

Para avaliação da atividade antifúngica do óleo de castanha-do-Brasil, utilizou-se duas cepas patogênicas *Aspergillus fumigatus* (P40M2) e *Aspergillus Niger* (P47C30) da coleção da Embrapa/RJ, isoladas a partir do solo e armazenadas em solução salina a 4°C. As amostras fúngicas foram cultivadas separadamente em placas de Petri contendo Ágar Batata Dextrose (PDA) e incubadas a 28 °C por 5 dias. Ao fim destes dias, foi realizada uma suave raspagem da superfície das placas transferindo assim, as hifas e conídios para placas de Petri incubadas nas mesmas condições das apresentadas anteriormente. Inicialmente testou-se a atividade antifúngica do óleo em sua concentração máxima sobre as duas cepas cultivadas, para então posteriormente realizar testes de concentração mínima inibitória (CMI). Neste intuito, foram colocados discos de papel de filtro de 6 mm, embebidos com 200 µl óleo de castanha-do-Brasil, em placas de Petri com meio PDA solidificado com as cepas de *Aspergillus fumigatus* (P40M2) e *Aspergillus Niger* (P47C30) em cargas de até 10³ UFC/mL. Estes foram incubados por 5 dias a 28°C, posteriormente avaliou-se o crescimento das cepas ao redor do disco de papel (OSTROSKY *et al*, 2008).

4.2 Concentrados proteicos

Os concentrados proteicos de arroz, ervilha e soja foram adquiridos por compra virtual da empresa Growth Supplements Produtos Alimentícios Eireli (www.gsuplementos.com.br). Foram realizadas análises para caracterizar os concentrados proteicos.

4.2.1 Determinação do teor proteico

A determinação de proteínas totais foi realizada pelo processo de digestão *Kjeldahl* (AOAC, 2016), e os ensaios efetuados em triplicata. Pesou-se 1g dos concentrados proteicos em papel de seda. Transferiu-se este para um tubo digestor, adicionou-se 5 mL de ácido sulfúrico e 2 g da mistura catalítica (94 g de sulfato de potássio e 5g de sulfato e cobre). Os tubos foram levados ao bloco digestor em capela, até que a solução se torna azul-esverdeada. Deixou-se esfriar e posteriormente adicionou-se 10 mL de água destilada.

O tubo foi levado ao destilador automático, onde se neutralizou a solução com 15 mL de hidróxido de sódio 50%. O fruto da destilação foi recolhido em Erlenmeyer com 5 mL de solução de ácido bórico 2% e o indicador misto (vermelho de metila e verde de bromocresol). Titulou-se a solução com ácido clorídrico 0,02N, até a coloração rósea. O mesmo processo foi realizado para uma prova em branco. Os valores para determinação nitrogênio das amostras foram expressos em m/m de acordo com a equação abaixo:

$$\text{Proteínas por cento m/m} = ((V_a - V_b) \times N \times F \times 0,014 \times 100) / PA$$

Onde:

V_a = Volume de ácido clorídrico gasto na titulação com a amostra;

V_b = Volume de ácido clorídrico gasto na titulação do branco;

N = Normalidade de ácido clorídrico;

F = Fator da solução de ácido clorídrico;

PA = Peso da amostra.

4.2.2 Capacidade de absorção de água e de óleo

Para avaliar a capacidade de absorção de água pesou-se 0,5g dos concentrados proteicos em tubos graduados e adicionou-se 5 mL de água destilada. Para a capacidade de absorção de óleo pesou-se 0,5g dos concentrados proteicos em tubos graduados e adicionou-se 3 g de óleo de castanha-do-Brasil. Todos os tubos foram deixados em repouso por 30 minutos a temperatura ambiente, em seguida foram centrifugados por 30 minutos a 2600 rpm. A água e o óleo retidos após a centrifugação foram considerados absorvidos. Separou-se o sobrenadante e pesou-se apenas o sedimento do fundo (GLÓRIA; REGITANO-D'ARCE, 2000). A capacidade de absorção de água (CAA) foi calculada pela expressão:

$$\% \text{ CAA} = (\text{PS} / \text{PA}) \times 100$$

Onde:

PS = Peso do sobrenadante em gramas;

PA = Peso da amostra seca em gramas.

A capacidade de absorção em óleo (CAO) foi calculada pela expressão:

$$\% \text{ CAO} = (\text{PS} / \text{PA}) \times 100$$

Onde:

PS = Peso do sobrenadante em gramas;

PA = Peso da amostra seca em gramas.

4.2.3 Potencial Zeta

O valor do potencial Zeta é medido indiretamente, com uma estimativa do potencial na superfície de moléculas através da mobilidade eletroforética. Para tanto, uma suspensão coloidal de concentrado proteico e água (aproximadamente 1:10), foi posta em uma cuba com dois eletrodos e aplicou-se um potencial elétrico a suspensão. Este processo foi realizado no equipamento Zeta Sizer Malvern® que pertence ao Laboratório de Inovação e Desenvolvimento em Tecnologia Farmacêutica (LIDETEF – UFAM). O procedimento foi realizado em triplicata.

4.2.4 Solubilidade em água

Pesou-se 1g dos três concentrados proteicos a serem utilizadas como material de parede e adicionou-se 50 mL de água destilada. O pH foi ajustado nas faixas de 2 a 12 com ácido clorídrico 0,1N ou hidróxido de sódio 0,1N a 25 °C. Após 10 minutos, o pH foi conferido e quando houve necessidade o mesmo foi reajustado. A solução permaneceu em agitação por 40 minutos, as amostras foram centrifugadas a 2600 rpm por 15 minutos. Do sobrenadante foram recolhidos 5 µl, para a determinação da concentração de proteínas pelo método de Bradford (1976). Para tanto, foi adicionado 200 µl do reagente padrão em placas de 96 poços e a mistura ficou em repouso por 15 minutos ao abrigo da luz. Logo após a leitura foi realizada em espectrofotômetro a 595 nm. Este método foi adaptado de Glória e Regitano-D'arce (2000) e os ensaios foram realizados em triplicatas. O percentual de solubilidade proteica foi determinado pela seguinte equação:

$$\% \text{ solubilidade} = (CP_2 / CP_1) \times 100$$

Onde:

CP_2 = Concentração de proteínas encontrada em cada ponto de pH;

CP_1 = Concentração de proteínas encontrada em água destilada.

Para a avaliação da solubilidade e da dispersão dos concentrados proteicos em água, foi realizada uma comparação com a mistura destes com goma arábica. Foram feitos dois testes: (a) 5g de cada concentrado proteico foi solubilizado em 50 mL de água destilada; (b) 2 g de cada concentrado proteico foram solubilizados em 50 mL de água destilada com 3g de goma arábica. As misturas (a) e (b) foram colocadas em provetas de 50 mL separadamente, a temperatura ambiente, em local plano e longe de vibrações. O aspecto macroscópico da separação de fases foi observado 24 horas após.

4.3 Preparo das Emulsões

Inicialmente, 75 g de goma arábica foram diluídos em 350 mL água destilada. Esta mistura permaneceu em repouso por 12 horas em ambiente refrigerado (aproximadamente - 10°C). Posteriormente, foi adicionado 25g de óleo e 50g dos concentrados proteicos e as misturas foram homogeneizadas em Homogeneizador Digital Ultra-Turrax® por 5 minutos a 10.000 rpm. As proporções de material de parede e do óleo foram utilizadas de acordo com adaptações dos trabalhos de Azeredo (2008) e Costa (2013). Estas proporções estão explícitas na Tabela 3.

Teste *	Óleo de Castanha	CPS	CPE	CPA	GA	Água
CPS + GA	5%	10%	-	-	15%	70%
CPE+ GA	5%	-	10%	-	15%	70%
CPA+ GA	5%	-	-	10%	15%	70%

Tabela 3 - Identificação dos testes com suas respectivas composições

* CPA+ G = concentrado proteico de arroz e goma arábica, CPS+G= concentrado proteico de soja e goma arábica e CPE+ G = concentrado proteico de ervilha e goma arábica.

4.4 Caracterização da Emulsão

4.4.1 Estabilidade da emulsão

Para avaliar a estabilidade da emulsão utilizou-se o protocolo de Sarkar (2011), com algumas modificações. Imediatamente após o preparo das emulsões, alíquotas de 25 mL de cada amostra foram transferidas para provetas graduadas de 25 mL, seladas, estocadas em local plano e longe de vibrações, a temperatura ambiente por 7 dias. A estabilidade foi medida através equação abaixo:

$$\text{Estabilidade da Emulsão (\%)} = (1 - (V / V_t)) * 100$$

Onde:

V = volume de separação de fase;

V_t = o volume total da solução.

4.4.2 Reologia das emulsões

O comportamento reológico das emulsões e suas respectivas viscosidades foram analisados através da determinação das curvas de escoamento, em um reômetro oscilatório MARS (Thermo Haake, Duisburgo, Alemanha). As medidas foram feitas em triplicata, em geometria de Placa paralela de 60 mm de diâmetro, com temperatura controlada a 25° C e Gap de 0,5 mm. As emulsões foram avaliadas 24 horas após o preparo. Utilizando-se um intervalo de taxa de deformação de 0 – 300 s⁻¹, e tensão de 0 – 20 (Pa). Os reogramas obtidos foram avaliados de acordo com modelos matemáticos empíricos e a viscosidade aparente das emulsões foi calculada com a relação entre a tensão (σ) e a taxa de deformação (γ).

4.5 Liofilização

As emulsões foram previamente congeladas a - 20°C por 15 horas, estas passaram pelo processo de liofilização no Laboratório de Abertura de Amostra e Ensaio Químico, Central Analítica, Universidade Federal do Amazonas, em um liofilizador CHRIST, modelo Alpha 1-2 LD plus. O processo foi realizado sob pressão 1,3 x 10⁻¹ mbar com temperatura de câmara de secagem a - 30°C.

Após o processo de liofilização o rendimento da microencapsulação do óleo de castanha-do-Brasil foi calculado pela razão entre o total de pó produzido e quantidade de material seco contido na emulsão.

4.6 Caracterização das microcápsulas

4.6.1 Molhabilidade

A molhabilidade dos pós produzidos a partir da liofilização das emulsões explícitas na Tabela 3, foi realizada pelo método descrito por Fuchs et al. (2006) e adaptado por Felix (2014). Onde se pesou 1 g de cada pó, que foi polvilhado sobre a superfície de 100 mL de água destilada a temperatura ambiente e sem agitação. O tempo necessário para as partículas do pó desaparecerem da superfície da água foi medido através de um cronômetro digital. Os ensaios foram realizados em triplicata.

4.6.2 Higroscopicidade

A higroscopicidade dos pós obtidos foi realizada de acordo com o método descrito por Felix (2014) com algumas modificações. As amostras de cada pó foram colocadas em recipiente com uma solução saturada de cloreto de sódio (75,29% de umidade relativa), a 25 °C por 7 dias. Em seguida, as amostras foram pesadas, e higroscopicidade foi determinada como a massa, em gramas, da umidade absorvida por 100 g de sólido seco (%).

4.6.3 Análise Termogravimétrica

A estabilidade térmica das microcápsulas de óleo de castanha-do-Brasil foi avaliada em aparelho de análises termogravimétricas automático de múltiplas amostras TGA-200 Las Navas Instrumentes (Carolina do Sul, Estados Unidos da América). As análises foram realizadas sob atmosfera de nitrogênio a uma vazão de 100 mL.min⁻¹, com aquecimento de 25

a 550 °C, com uma razão de aquecimento de 10 °C.min⁻¹. Foram utilizadas 0,5g de cada produto microencapsulado para realização das análises e estas foram efetuadas em triplicata.

4.6.4 Análise da microestrutura

O estudo da morfologia externa das diferentes microcápsulas de óleo de castanha-do-Brasil foi realizado através de microscopia eletrônica de varredura (MEV). As amostras foram montadas em “stub” e metalizadas com ouro em equipamento BAL-TEC modelo SCD 050. A observação e captura de imagens foram realizadas em microscópio eletrônico de varredura (MEV) modelo LEO 435 VP da Zeiss, no Laboratório Temático de Microscopia Eletrônica do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA).

4.6.5 Análise de tamanho de partículas

A distribuição do tamanho das partículas dos pós secos foi determinada em um analisador de partículas a laser MICROTRAC S3500 (Microtrac Inc., Montgomery Ville, USA). A análise foi conduzida em triplicata utilizando álcool isopropílico como dispersante (índice de refração de 1,377). As análises foram realizadas no Laboratório de Análises Físicas da Planta IV da Embrapa Agroindústria de Alimentos.

4.6.6 Eficiência de encapsulação

A quantidade de óleo superficial foi quantificada de acordo com o método descrito por Bae e Lee (2008), com algumas modificações. Um grama aproximadamente dos produtos liofilizados foram misturados a 10 mL de hexano em frascos de vidro com tampa. Estes foram agitados manualmente por 2 minutos, a temperatura ambiente para extração do óleo livre. A

mistura foi filtrada em papel Whatman nº 1. O pó coletado foi lavado com 10 mL de hexano e exposto ao calor em estufa (60°C), para evaporação do solvente retido em papel, até alcançar o peso constante. A quantidade de óleo superficial foi expressa pela relação de massa inicial e final, determinada pela equação abaixo:

$$EE\% = ((OT - OS) / OT) \times 100$$

Onde:

EE% = é a eficiência de encapsulação em percentual;

OT = é a quantidade de óleo total em gramas;

OS = é a quantidade de óleo superficial em gramas.

4.6.7 Avaliação da citotoxicidade

A citotoxicidade dos produtos gerados foi testada pelo método descrito por Ahmed *et al* (1994) e adaptado pelo Laboratório de Atividade Biológica (BIOPHAR), da Faculdade de Ciências Farmacêuticas (UFAM). Foi realizado o teste Alamar Blue para analisar a viabilidade celular de células da linhagem não neoplásica de fibroblasto de pulmão humano MRC-5 na presença dos encapsulados de óleo de castanha e do óleo *in natura*, em diferentes concentrações. As células foram cultivadas em garrafa de cultura com meio DMEM alta glicose completo. Estas foram transferidas para placas de 96 poços na concentração celular de $0,5 \times 10^4$ células/poço. A placa foi então mantida em cultura por 24 h em incubadora a 37 °C com atmosfera de 5 % de CO₂. Ao fim deste período, foram adicionadas as amostras nas concentrações 1.56, 3.12, 6.25, 12.5, 25 e 50 µg/mL e a placa permaneceu em cultura por 24 horas nas mesmas condições. O controle negativo recebeu no poço somente meio de cultura e como controle positivo de fármaco padrão de morte foi utilizado Doxorrubicina nas concentrações de 0.312, 0.625, 1.25, 2.5, 5, 10 e 20 µM. Decorrido 24h de tratamento, foi

acrescentado 10µL da solução de uso de Alamar Blue (solução estoque 0,4% -1:20 em meio de cultura sem soro fetal bovino) em cada poço da placa. Após 3 h de metabolização de exposição ao Alamar Blue, retirando da estufa meia hora antes do término, a fluorescência foi medida usando-se um leitor de microplaca Elisa (marca Beckman e Coulter).

4.6.8 Avaliação da atividade antioxidante celular

Foi avaliada a atividade antioxidante dos produtos gerados pela liofilização do óleo de castanha com os diferentes materiais de parede, em comparação ao óleo de castanha *in natura*. A avaliação da atividade antioxidante celular foi realizada utilizando a metodologia descrita por Wolfe e Liu (2007), com algumas modificações. Esta metodologia baseia-se na detecção da produção de espécies reativas de oxigênio intracelular utilizando o composto fluorescente: 2'7'-dicloro-fluoresceína-diacetato (DCFH-DA). Foram utilizadas células da linhagem MRC-5 semeadas na concentração de 6×10^4 células/poço em 100 µL de meio de crescimento e incubados por 24h. Posteriormente, o meio de cultura foi removido e os poços foram lavados com PBS. Em seguida, foi preparada uma solução a 25 µM de DCFH-DA dissolvido em tampão Hank's e os pós secos foram adicionados a esta solução de acordo com as concentrações previamente estabelecidas (6,25µg/mL, 12,5 µg/mL, 25 µg/mL, 50 µg/mL e 100 µg/mL). Foram adicionados 100 µL dessa diluição aos poços da placa e estes foram incubados durante 60 minutos a 37°C e 5% de CO₂. Os poços foram lavados novamente com PBS, e logo em seguida foi preparada uma solução de AAPH (Dicloridrato de 2,2 Azobis 2-metilpropionamida) a 600 µM dissolvida em tampão Hank'. 100 µL dessa solução foram adicionadas aos poços e em seguida foi realizada a leitura da placa com a fluorescência mensurada imediatamente no comprimento de onda de excitação 485 nm e de emissão 520 nm durante 60 minutos em intervalos de 5 min. Os controles com e sem DCFH-DA foram

preparados e submetidos a processos análogos. Quercetina foi utilizada como controle positivo da atividade antioxidante. Esse processo foi realizado no Laboratório de Atividade Biológica (BIOPHAR), da Faculdade de Ciências Farmacêuticas (UFAM).

4.7 Caracterização e estabilidade dos produtos microencapsulados

Para avaliar a qualidade, o nível de degradação e o comportamento dos produtos gerados pela microencapsulação do óleo de castanha-do-Brasil em comparação ao óleo *in natura*, foram efetuados testes físico-químicos por um período de 42 dias. As amostras foram armazenadas a 25°C sob abrigo da luz. As análises realizadas estão dispostas na Tabela 4.

Análises	Tempo de armazenamento em dias						
	0	7	14	21	28	35	42
Índice de Acidez Titulável	X	X	X	X	X	X	X
Atividade de Água	X	X	X	X	X	X	X
Índice de Peróxidos	X	X	X	X	X	X	X
Umidade	X	X	X	X	X	X	X
Cromatografia Gasosa	X			X			X
Microbiologia	X			X			X

Tabela 4 – Descrição das análises durante o tempo de armazenamento do óleo *in natura* e encapsulado

4.7.1 Umidade

Para o cálculo do teor de umidade, a massa de sólido seco (dos produtos liofilizados) foi levada à estufa a 105°C por 6 horas em formas de alumínio, previamente taradas, até o peso constante, de acordo com as normas estabelecidas pela AOAC (2016). Procedimento foi realizado em triplicata.

4.7.2 Atividade de água (a_w)

A atividade de água é dada pela razão entre a pressão de vapor de água do produto e a pressão de vapor de água pura à mesma temperatura. A determinação da atividade de água dos produtos liofilizados foi realizada a 25°C em triplicata no aparelho AquaLab 4TEV.

4.7.3 Cromatografia gasosa

Para as análises cromatográficas as amostras liofilizadas foram submetidas a extração do óleo de castanha-do-Brasil. Aproximadamente 1 g de cada produto liofilizado foi adicionado a 10 mL de clorofórmio, a mistura permaneceu em banho ultrassônico por 10 minutos. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 6500 rpm a temperatura ambiente e uma alíquota de 50µl do óleo será separada para análise cromatográfica.

Todas as amostras serão submetidas à derivatização, sendo convertidos aos seus respectivos ésteres metílicos, de acordo com o método HARTMAN e LAGO (1973) adaptado pelo Laboratório de óleo graxos da Embrapa Agroindústria de Alimentos. Inicialmente as amostras foram fundidas a 60°C em banho termostático e homogeneizadas manualmente. Pesou-se 0,1g de cada amostra em tubos falcon de 50 mL, adicionaram-se 1,5 mL de solução potassa metanólica 0,5M e todos os tubos foram colocados em banho termostático a 60°C por 5 minutos. Posteriormente, os tubos foram agitados três vezes em vórtex por 15 segundos. Adicionou-se 4,5 mL do reagente de esterificação (ácido sulfúrico, cloreto de amônio e metanol) e tubos foram levados ao banho termostático por 5 minutos a 60°C. Os tubos foram agitados duas vezes em vórtex por 15 segundos. Adicionou-se 10 mL de hexano em cada tubo e agitou-se duas vezes em vórtex por 15 segundos. Adicionou-se mais 10 mL de água

destilada e agitou-se duas vezes em vórtex por 15 segundos. Ao fim 2 mL da fase superior foi transferida para vial de cromatografia gasosa.

Os ésteres metílicos resultantes da derivatização das amostras foram analisados em equipamento Agilent 7890, que contém um detector de ionização por chama operando a 280°C. A análise foi realizada em coluna capilar HP FFAP (25 m x 0,2 mm x 0,30µm). A temperatura inicial foi 150 °C, de 150 a 180 °C com taxa de 30 °C/min, de 180 a 200 °C a 20 °C/min, de 200 a 230 °C a 3 °C/min e na temperatura final de 230 °C por 10 minutos. Utilizou-se variação de pressão inicial 15 psi por 10 min, de 15 a 25 psi com taxa de 5 psi/min e pressão final de 25 psi por 11 minutos. Foi injetado 1 µL de amostra em injetor aquecido a 250 °C operado no modo de divisão de fluxo de 1:50. Realizou-se a identificação por comparação dos tempos de retenção com os padrões da NU-CHEK PREP, Inc, (Elysian, MN) e a quantificação foi realizada por normalização interna.

4.7.4 Análises microbiológicas

4.7.4.1 Mesófilos

Para a contagem de mesófilos nos produtos armazenados, foi realizada previamente uma diluição seriada dos produtos liofilizados e do óleo *in natura* até a concentração 10^{-3} , em tubos contendo 9 mL de água peptonada 0,1%. Desta mistura foi coletado 1 mL e transferidos separadamente para placas de Petri estéreis, e adicionou-se aproximadamente 12 mL de Ágar Padrão para Contagem (PCA) previamente fundido e resfriado a 44 - 46°C, a placa foi agitada lentamente em superfície plana. A incubação ocorreu em placas invertidas e acondicionadas a 35 ± 1 °C de 24 às 48h (SILVA; JUNQUEIRA; SILVEIRA, 2001). A contagem das unidades

formadoras de colônias (UFC) ocorreu em um contador de colônias manual Modelo CP 608 (Phoenix-Luferco, Araraquara SP).

4.7.4.2 Contagem de bolores e leveduras

Para a contagem de bolores e leveduras nos produtos armazenados, foi realizada previamente uma diluição seriada dos produtos liofilizados e do óleo *in natura* até a concentração 10^{-3} , em tubos contendo 9 mL de água peptonada 0,1%. Desta mistura foi coletado 1 mL e transferidos separadamente para placas de Petri estéreis, e adicionou-se aproximadamente 12 mL de Ágar Batata Dextrose (PDA) previamente fundido e resfriado a 44 - 46°C, a placa foi agitada lentamente em superfície plana. A incubação ocorreu em placas invertidas e acondicionadas a 25 ± 1 °C de 3 a 5 dias (SILVA; JUNQUEIRA; SILVEIRA, 2001). A contagem das unidades formadoras de colônias (UFC) ocorreu em um contador de colônias manual Modelo CP 608 (Phoenix-Luferco, Araraquara SP).

4.7.5 Determinação do índice de peróxidos e da acidez titulável

A fim de se perceber diferenças significativas que alteram a estabilidade química do óleo de castanha-do-Brasil, foram realizadas análises de determinação da acidez titulável (descrito no item 4.1.3.1) e de peróxidos (descrito no item 4.1.3.2). Para tanto o óleo de castanha-do-Brasil encapsulado foi extraído com clorofórmio. Cerca de 2 g dos produtos foram adicionados a 20 mL de clorofórmio em banho ultrassônico por 10 minutos. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 6500 rpm a temperatura ambiente e uma alíquota foi separada para as determinações da acidez titulável e de peróxidos.

4.8 Análises Estatísticas

Com intuito de perceber diferenças significativas nos dados apresentados, estes foram analisados por Análise de Variância (ANOVA), e Teste de Tukey Student em nível de 5%, para perceber diferenças entre as médias apresentadas. Para tanto, foi utilizado o Software Excel® e programa estatístico R®.

5.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização físico-química do óleo de castanha-do-Brasil

O óleo de castanha-do-Brasil foi obtido através de prensagem a frio de 990 gramas das sementes inteiras, gerando 510 gramas de óleo bruto (51,5% de rendimento). A Tabela 5 mostra os resultados para as análises de índice de peróxidos, índice de acidez titulável e densidade do óleo bruto de castanha-do-Brasil. Os valores de acidez e peróxidos são parâmetros referenciais que atestam a qualidade e a segurança alimentar do óleo (SANTOS *et al*, 2015). Os valores encontrados para estes parâmetros estão dentro da faixa estabelecida pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), para óleos não refinados e prensados a frio (BRASIL, 2005).

Parâmetros	Valores Obtidos	Valores Aceitáveis
Índice de acidez (mgKOH/g)	1,3 ± 0,13	Máximo 4,0
Índice de peróxidos (meq/Kg)	1,3 ± 0,15	Máximo 15,0
Densidade Relativa	0,876 ± 0,00	-*

Tabela 5 - Resultados dos testes físico-químicos do óleo bruto de castanha * Sem determinação

Os valores experimentais encontrados para os índices de acidez e peróxido indicam um bom estado de conservação das sementes e conseqüentemente do óleo. Além disso, esses valores demonstram que o processo de extração do óleo não causou danos oxidativos. Valores superiores aos encontrados neste estudo foram relatados por Schons *et al* (2017), ao caracterizarem o óleo de castanha extraído por ultrassom. No entanto, mesmo que superiores

estes valores apresentaram-se abaixo do que preconiza a legislação, de forma geral confirmam a qualidade do processo de extração empregado neste trabalho. A extração do óleo de castanha-do-Brasil por prensa hidráulica ou mecânica é a maneira mais comum de se obter este subproduto da castanha, além de ser econômico e prático, preservando as características originais do produto (SANTOS *et al*, 2012; RODRIGUES *et al*, 2005).

5.1.1 Análises de aflatoxinas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

As análises realizadas para a detecção de aflatoxinas revelaram que o óleo obtido através da prensagem a frio das sementes inteiras, utilizado neste estudo, não apresentou valores considerados tóxicos destas micotoxinas (Tabela 6). Essas aflatoxinas são metabolitos secundários de fungos, sobretudo, das espécies *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*. Dependendo da dose, do estado nutricional, da idade e do gênero essas aflatoxinas podem levar ao surgimento de um número considerável de patologias. As AFB1, AFB2, AFG1 e AFG2 são as mais estudadas, e as seguidas do número 1 são consideradas as com maior poder toxinogênico e carcinogênico (HEDAYATI *et al.*, 2007; TEXEIRA, 2008).

O limite de detecção (LD) utilizado nas análises de aflatoxinas foi de 0,5 µg para cada Kg de amostra. No presente estudo, não se detectou valores acima do limite de detecção para nenhuma das amostras independente do método de extração (a ou b) utilizado (Tabela 6). Apesar de a legislação brasileira vigente (Brasil, 2011) não tratar de valores para óleo de castanha, os resultados das análises comprovaram a qualidade do produto. Vale ressaltar que, estes resultados atestam a qualidade da matéria-prima e conseqüentemente dos produtos gerados a partir dela, não oferecendo riscos à saúde.

Magzoub *et al* (2019) utilizaram o método de extração (a) para detectar aflatoxinas em amostras de óleo de amendoim descontaminadas, perceberam uma redução dos níveis detectados ao aplicar o tratamento. Esse resultado confirma a eficácia do método de extração aplicado neste trabalho. Idris *et al* (2010) ao utilizarem o mesmo método de extração em óleos comestíveis do Sudão, detectaram níveis distintos de aflatoxinas, o que atesta a qualidade do método empregado. A investigação de contaminantes em castanha-do-Brasil é comum, pois o processo de produção extrativista pode levar a contaminações por agentes microbiológicos que produzem aflatoxinas, gerando assim a contaminação da castanha (ALVARES, 2011). A avaliação da presença de aflatoxinas no óleo de castanha realizada neste trabalho confirma a qualidade do mesmo, uma vez nem as castanhas tampouco o óleo passou por processos de purificação.

<i>Método de extração</i>	<i>Aflatoxinas (µg/kg)</i>			
	<i>AFG1</i>	<i>AFG2</i>	<i>AFB1</i>	<i>AFB2</i>
Teste A	ND*	ND*	< LD**	< LD**
Teste B	ND*	ND*	ND*	ND*

Tabela 6 – Detecção de aflatoxinas extraídas do óleo por dois métodos distintos

*ND = não detectado e **LD = limite de detecção (0,5 µg/Kg).

5.1.2 Avaliação da atividade antifúngica

O teste de atividade antifúngica foi realizado inicialmente em discos estéreis com 200 µl do óleo de castanha-do-Brasil, se caso houvesse formação do halo de inibição, posteriormente seria realizado um teste de concentração inibitória. No entanto, percebe-se na Figura 8 que não houve formação de halo de inibição, para as cargas fúngicas testadas ao fim

dos 5 dias de incubação, indicando que o óleo de castanha não apresenta atividade antifúngica contra as espécies *Aspergillus fumigatus* e *Aspergillus niger*.

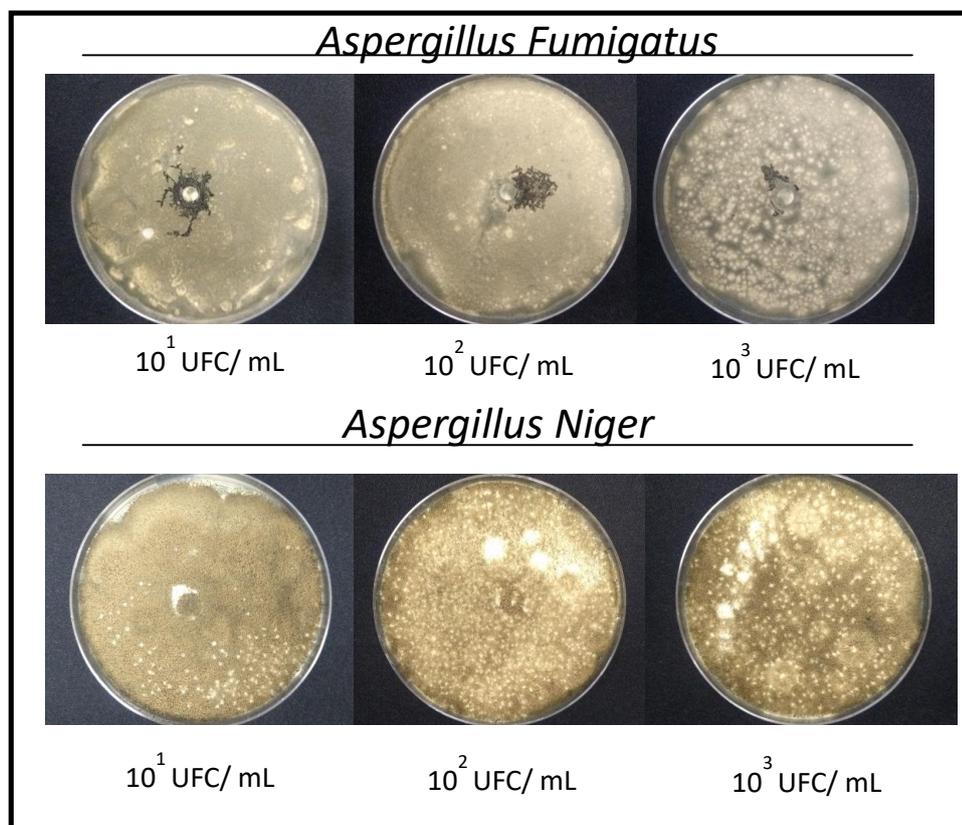


Figura 8 – Teste de atividade antifúngica *Aspergillus niger* e *Aspergillus fumigatus*

5.2 Caracterização dos concentrados proteicos

5.2.1 Determinação do teor proteico

Para cada concentrado proteico (Arroz, Ervilha e Soja) foram realizadas análises de determinação do teor proteico total. Os resultados foram: Soja – 73,8 (% N x 6,25); Ervilha – 71,0 (%N x 6,25); Arroz – 69,1% (%N x 5,95). Segundo a Resolução RDC nº 268, de 22 de setembro de 2005 (BRASIL, 2005), os valores encontrados caracterizam esses produtos como concentrados proteicos. Silva (2019) ao avaliar a composição centesimal do concentrado

proteico de arroz e de ervilha encontrou teores de proteínas próximos aos obtidos neste estudo para ervilha e superiores para arroz. Neste trabalho, Silva (2019) percebeu que a composição química da matéria-prima inicial pode afetar a composição final do extrato proteico. A relação entre os componentes da matéria-prima e o extrato proteico foi percebida em um trabalho com sementes de chia, indicando haver diminuição nos rendimentos pela correlação entre as proteínas e lipídeos (COELHO; SALAS-MELLADO, 2018). No entanto, as quantidades de proteínas obtidas neste estudo, para os produtos adquiridos, não inviabilizam o uso destes como material de parede em pesquisas de encapsulação de compostos (LE PRIOL *et al*, 2019).

5.2.2 Capacidade de absorção de óleo e de água

Os valores obtidos pelos testes de capacidade de absorção de água e de óleo revelam o grau de hidrofobicidade das moléculas. Os valores encontrados para os concentrados proteicos utilizados neste estudo (Tabela 7) exibem uma maior absorção de água do que de óleo (Tabela 7) para todas as amostras. Para os valores de absorção de água pode-se perceber pelo teste ANOVA (Anexo 8.1) que houve diferença significativa entre os concentrados proteicos, indicando capacidades distintas de absorção de água entre estes. Os concentrados proteicos vegetais apresentaram absorção de óleo consideráveis (Tabela 7), o teste ANOVA (Anexo 8.1) demonstrou que houve diferença significativa em pelo menos um dos valores em comparação aos demais. Isto indica que os concentrados proteicos utilizados possuem também capacidades distintas de absorção de óleo. Pelos resultados apresentados, o concentrado proteico com melhores absorções de água e óleo foi o de soja. Estes resultados corroboram com os apresentados na literatura, que relata valores de absorção de água

(447,6%) e óleo (133%) para concentrado proteico de soja (GLÓRIA; REGITANO-D'ARCE, 2000).

Cavalcanti, Bora e Carvajal (2009) relataram a importância da capacidade de absorção de água e de óleo que as proteínas ou alimentos proteicos possuem. Estes índices influenciam diretamente a estabilidade da emulsão, pela interação da interface água-proteína-óleo. Além disso, a relação de afinidade entre proteína e a água está diretamente ligada à textura, viscosidade e geleificação. A hidrofobicidade das proteínas ocupa o principal papel na absorção de óleo e favorece a utilização de alimento proteico na produção de carnes emulsionadas, linguiças, salsichas, patês, bolos e massas.

Concentrados proteicos	% CAA*	% CAO*	Potencial Zeta (mV)
<i>Soja</i>	$420 \pm 3,3^a$	$155 \pm 3,1^a$	$-30,6 \pm 0,31$
<i>Ervilha</i>	$327 \pm 2,0^b$	$131 \pm 3,2^b$	$-31 \pm 0,26$
<i>Arroz</i>	$193 \pm 3,6^c$	$159 \pm 4,9^a$	$-20,4 \pm 0,26$

Tabela 7 – Valores médios de capacidade de absorção de água (% CAA), de óleo (% CAO) e Potencial Zeta dos concentrados proteicos

*Letras diferentes na mesma coluna diferem significativamente ($p < 0,05$)

5.2.3 Potencial Zeta

O potencial Zeta dos concentrados proteicos foi mensurado a fim de se obter o perfil aproximado das cargas superficiais das proteínas, que podem influenciar na estabilidade das emulsões. De acordo com as análises realizadas, para cada concentrado proteico foi gerado um valor médio de três ensaios (Tabela 7). Esses valores expressam um baixo potencial das proteínas destes grupos em manter a estabilidade das emulsões. Gomes (2018) relatou que valores próximos de -30 mV são instáveis e podem flocular, precipitar e até mesmo separar fases, aumentando assim a probabilidade de agregação.

Valores mais negativos que -30 mV são os que indicam carga suficientemente alta, para que ocorra repulsão das partículas mantendo a estabilidade das emulsões (MALVERN, 2004). Esses resultados demonstram a baixa capacidade que esses concentrados proteicos possuem de formar emulsões estáveis, o que pode influenciar diretamente na eficiência de encapsulamento.

5.2.4 Solubilidade em água

Neste estudo, foi avaliado o efeito do pH na solubilidade dos concentrados proteicos vegetais. Todos os concentrados proteicos vegetais estudados apresentaram baixa solubilidade (< que 40%), porém com perfil bem similar (Figura 9). Withana-Gamege (2011) e Le Priol *et al.*, (2019) demonstraram que alguns isolados proteicos apresentavam perfil de solubilidade em forma de U, e associaram este perfil à fração solúvel possivelmente presente nestes isolados. Neste estudo, foram utilizados concentrados proteicos, com teor proteico menor que nos estudos supracitados, além disso, os distintos processos de extração podem alterar as frações solúveis de cada concentrado proteico. O que pode justificar a baixa solubilidade e o perfil gráfico encontrados neste estudo.

Para melhorar a solubilidade da proteína de ervilha, por exemplo, Chen *et al.* (2019) aplicaram testes térmicos e perceberam maior solubilidade e estabilidade da emulsão quando as proteínas sofreram aquecimento na faixa de 85 a 90°C. Os tratamentos térmicos podem expor regiões hidrofóbicas das proteínas, o que aumenta sua estabilidade na emulsão (PENG *et al.*, 2016). Em contrapartida, Labuschagne (2018) relatou a baixa solubilidade de proteínas vegetais em água fria, o que corrobora com os resultados encontrados neste estudo. Essa

desvantagem pode ser contornada com a associação destes concentrados proteicos a carboidratos (RUSLI; SANGUANSRI; SANGUANSRI, 2006).

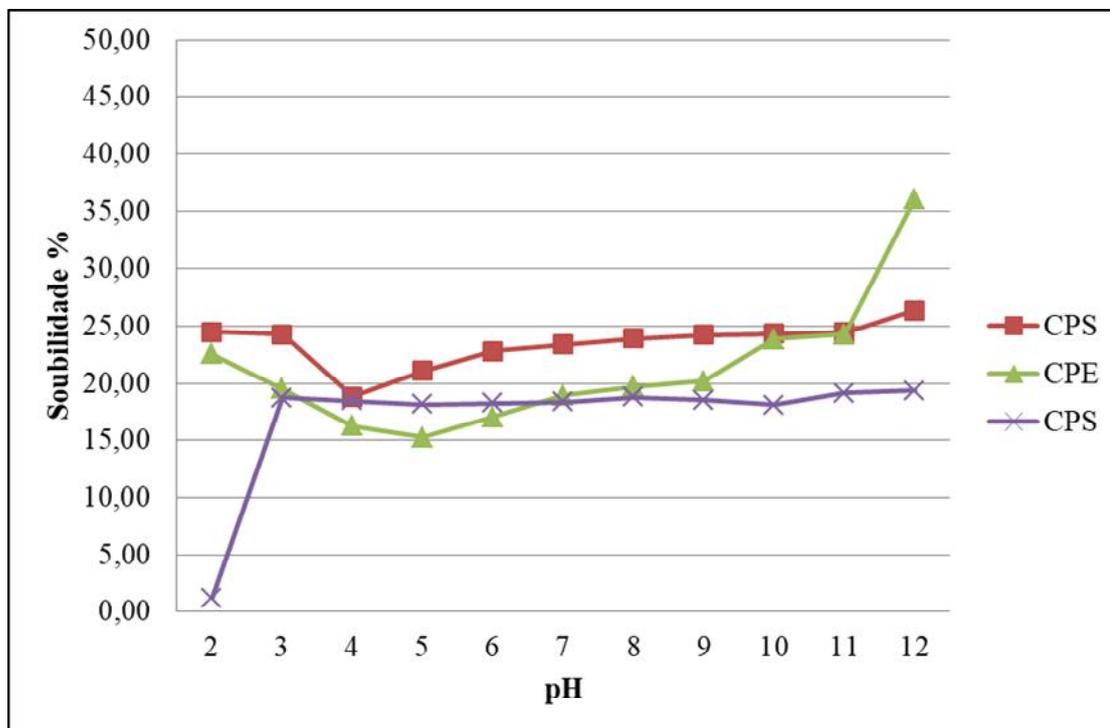


Figura 9 – Gráfico de solubilidade dos concentrados proteicos

CPA = concentrado proteico de arroz, CPS concentrado proteico de soja e CPE = concentrado proteico de ervilha.

Os resultados obtidos caracterizaram os concentrados proteicos utilizados neste estudo, e sugerem que estes concentrados isoladamente formam emulsões instáveis, o que poderia prejudicar a eficiência de encapsulação do óleo de castanha-do-Brasil. Desta forma, realizou-se a adição de goma arábica nas emulsões para garantir maior eficiência de encapsulação. A associação de carboidratos e proteínas em processos de microencapsulação é comum, podendo gerar aumento da capacidade emulsificante e filmogênica (RUSLI; SANGUANSRI; AUGUSTIN, 2006).

Com intuito de se perceber diferenças macroscópicas da separação de fases dos concentrados proteicos em água, estes foram solubilizados na presença e na ausência de goma arábica. Foi realizado registro no tempo inicial e 24 horas depois. As imagens (Figura 10) mostram que em todos os testes houve menor formação de precipitado na presença de goma arábica. Indicando assim maior estabilidade da mistura na presença deste carboidrato.

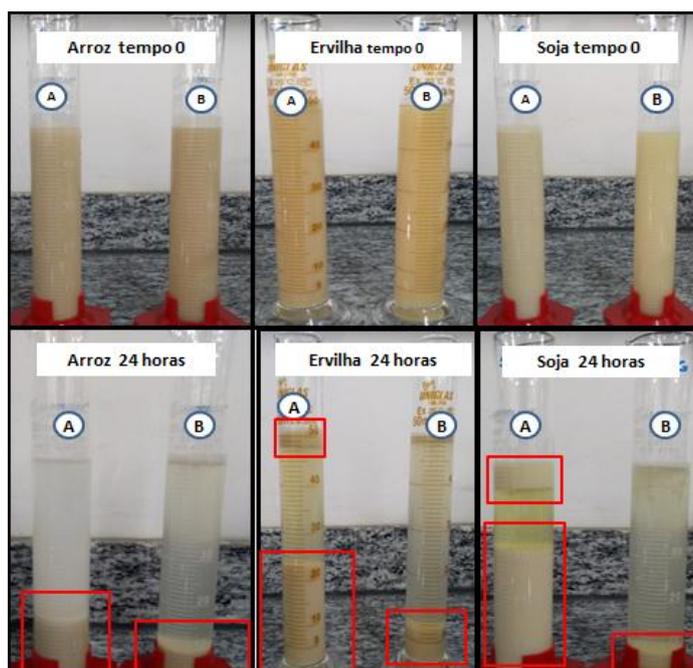


Figura 10 – Aspecto macroscópico de separação de fases das misturas dos concentrados proteicos e goma arábica após 24 horas

A=Concentrado proteico + água; B=Concentrado proteico + água + goma arábica

Os resultados apresentados pelo aspecto macroscópico da separação de fases (Figura 10) demonstra a solubilidade destes concentrados proteicos, a faixa superior, percebidas na Figura 10 nas provetas A para os concentrados de ervilha e soja, é a fase de cremação. A fase intermediária corresponde uma região mais estável e a inferior à precipitação das proteínas. Neste contexto, pode-se perceber que a solução com concentrado proteico de arroz manteve

maior estabilidade na presença e na ausência de goma arábica, sendo o melhor resultado após 24 horas de descanso.

5.3 Caracterização das emulsões

5.3.1 Estabilidade das emulsões

Avaliou-se a estabilidade das emulsões geradas a partir da mistura do óleo de castanha-do-Brasil com os concentrados proteicos vegetais e goma arábica. Após sete dias (Figura 11), as emulsões contendo os concentrados de soja e de ervilha apresentaram um aspecto de maior separação de fases com índices de estabilidade $62 \pm 2\%$ e $42 \pm 2\%$ respectivamente. A emulsão com o concentrado proteico de arroz apresentou $93 \pm 1\%$ de índice de estabilidade, sendo a emulsão com mais estável ao fim dos sete dias de avaliação (Figura 11). Esse resultado corrobora com os resultados encontrados por Le Priol *et al* (2019), que avaliaram a estabilidade de emulsões com diferentes proteínas vegetais em diferentes condições por 24 horas. Estes autores encontraram valores acima de 90% de índice de estabilidade para o isolado proteico de arroz integral.

A formação de uma emulsão líquida estável é um requisito para gerar o encapsulamento adequado por secagem (PINNAMANENI; DAS; DAS, 2003). A mistura de proteínas e carboidratos pode formar emulsões mais estáveis e melhorar a proteção dos compostos ativos contra a oxidação. Isto se deve ao fato que as proteínas agem como agente emulsificante e formadoras de filmes e os carboidratos atuam como material formador de matriz (GHARSALLAOUI *et al*, 2010).

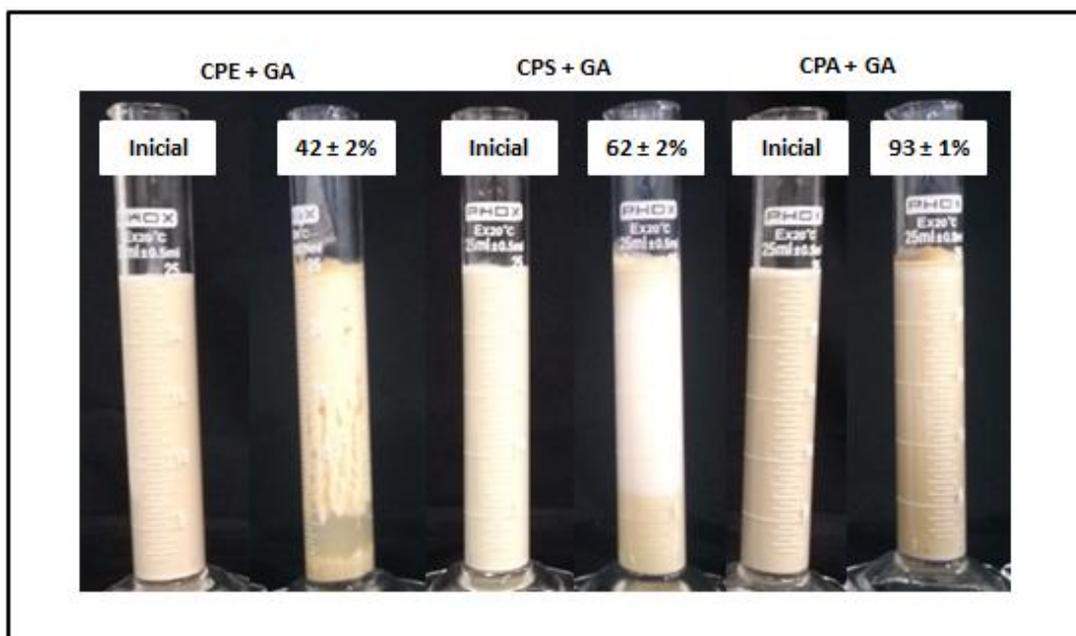


Figura 11 – Aspecto macroscópico de separação de fases das emulsões e seus respectivos índices de estabilidade
 CPA+ GA = concentrado proteico de arroz e goma arábica, CPS + GA = concentrado proteico de soja e goma arábica e CPE + GA = concentrado proteico de ervilha e goma arábica.

5.3.2 Reologia das emulsões

As propriedades reológicas caracterizam a relação entre tensão e deformação de um determinado material. Esta relação pode gerar informações importantes sobre a estrutura, estabilidade e possíveis impactos no processo de fabricação de diversos produtos (SECOLIM, 2014). A Figura 12 apresenta o comportamento reológico das emulsões deste estudo a 25°C. Pode-se perceber que as emulsões se caracterizam por serem do tipo Newtoniano. Esta caracterização é evidenciada pelo comportamento da viscosidade (Figura 13) das emulsões, na qual se apresenta constante independente das taxas de cisalhamento e não varia com o tempo.

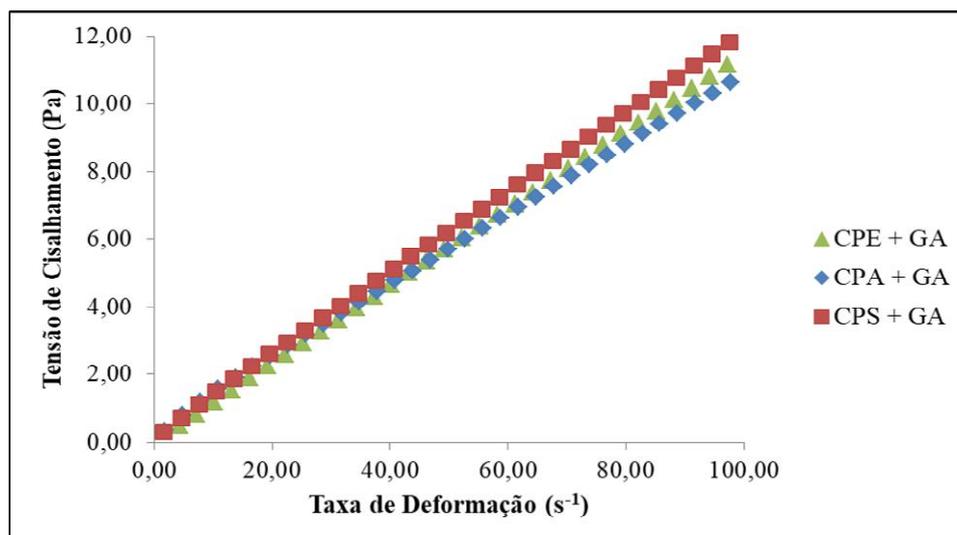


Figura 12 – Comportamento reológico das emulsões dos concentrados proteicos de arroz, soja e ervilha e goma arábica

CPA+ GA = concentrado proteico de arroz e goma arábica, CPS + GA = concentrado proteico de soja e goma arábica e CPE + GA = concentrado proteico de ervilha e goma arábica.

Observa-se na Figura 12 que o comportamento das emulsões com os diferentes concentrados proteicos é similar e com valores muito próximos, havendo pouca diferença entre estes. O comportamento Newtoniano foi observado também por Tonon *et al* (2012) em emulsões contendo óleo de linhaça, goma arábica e concentrado proteico de soro de leite. Bae e Lee (2008) reportaram o comportamento Newtoniano para emulsões compostas por óleo de abacate e maltodextrina/isolado de soro de leite como material de parede. As proteínas vegetais apresentam o mesmo comportamento reológico que as proteínas do soro de leite, o que as tornam alternativas ao uso das proteínas animais.

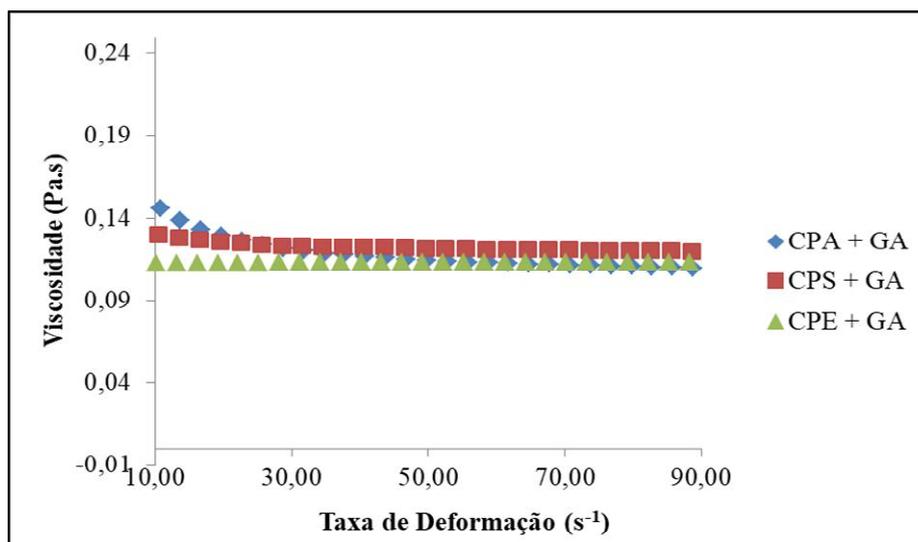


Figura 13 – Relação de viscosidade e taxa de deformação as emulsões contendo os concentrados proteicos de arroz, soja e ervilha e goma arábica

CPA+ GA = concentrado proteico de arroz e goma arábica, CPS + GA = concentrado proteico de soja e goma arábica e CPE + GA = concentrado proteico de ervilha e goma arábica.

5.4 Liofilização e caracterização das microcápsulas

O processo de liofilização gerou três pós com colorações distintas, porém com características similares (Figura 14). O rendimento deste processo foi calculado de acordo a relação entre a quantidade de pó obtido ao final do processo e o inserido nas emulsões. O rendimento obtido para as microcápsulas formadas a partir do concentrado proteico de arroz e goma foi $85,3 \pm 1,4\%$, para o concentrado de ervilha e goma $86,5 \pm 1,1\%$ e finalmente para concentrado de soja e goma $88,5 \pm 1,7\%$. O Anexo 8.1 demonstra por meio de ANOVA que não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre os valores de rendimentos dos produtos gerados por liofilização. O alto valor encontrado para esses rendimentos é característico do processo de liofilização, que apresenta menores índices de perda da matéria-prima. Os valores encontrados foram determinados por emulsões preparadas com a mesma metodologia, mostrando então ser a liofilização um processo com alto rendimento, independente da

variação de agentes encapsulantes vegetais adicionados à amostra. Santo *et al* (2013), demonstraram que o processo de secagem de materiais por liofilização possui rendimentos superiores ao processo de secagem por *spray drying*, o que corrobora com os altos rendimentos obtidos neste estudo.



Figura 14 – Microcápsulas de óleo de castanha-do-Brasil

5.4.1 Molhabilidade e Higroscopicidade

Molhabilidade pode ser definida como o tempo necessário para que uma quantidade conhecida de sólido seja totalmente molhada por um líquido. A higroscopicidade é capacidade de absorção de água de um determinado material. Nos processos alimentícios essas características podem influenciar na aglomeração, revestimento, dispersabilidade e na solubilidade dos produtos (FORNY; MARABI; PALZER, 2011). A Tabela 8 mostra os valores médios obtidos para cada uma dessas análises das microcápsulas composta por diferentes materiais de parede. Observa-se pelo teste Tukey que para ambas as análises houve diferença significativa em pelo menos um dos valores obtidos. Isso indica que o concentrado de proteína vegetal utilizado como material de parede influencia no tempo de molhabilidade e na absorção de água das microcápsulas. O Anexo 8.1 confirma através do ANOVA a diferença significativa dos resultados para os dois testes.

<i>Microcápsulas</i>	<i>Molhabilidade (min.)</i>	<i>Higroscopicidade (%)</i>
<i>CPS + GA</i>	$9,4 \pm 0,4^a$	$49,5 \pm 0,8^a$
<i>CPE + GA</i>	$21 \pm 0,4^b$	$14,3 \pm 0,7^b$
<i>CPA + GA</i>	$15,7 \pm 0,5^c$	$13,6 \pm 0,6^b$

Tabela 8 – Resultados médios para higroscopicidade e molhabilidade das microcápsulas de concentrados proteicos de arroz, soja e ervilha e goma arábica

*Letras diferentes numa mesma coluna diferem significativamente ($p < 0,05$) - CPA+ GA = concentrado proteico de arroz e goma arábica, CPS + GA = concentrado proteico de soja e goma arábica e CPE + GA = concentrado proteico de ervilha e goma arábica.

Pode-se perceber através dos resultados apresentados que as microcápsulas geradas a partir da mistura dos concentrados proteicos vegetais e goma arábica tiveram elevado tempo de molhabilidade. Os tempos elevados podem estar relacionados à exposição de grupos hidrofóbicos na superfície das partículas (BAE; LEE, 2008), que podem acontecer durante o processo de formação de emulsão e liofilização. A natureza do material de parede pode aumentar ou diminuir o tempo de molhabilidade. Bae e Lee (2008) citaram que a adição de maltodextrina diminuiu o tempo de molhabilidade de misturas com isolado proteico de soro de leite em comparação aos continham goma arábica.

Os resultados encontrados para higroscopicidade dos pós gerados a partir da mistura dos concentrados proteicos de arroz e ervilha com goma arábica, indicam baixa capacidade de retenção de água. Essa baixa higroscopicidade facilita a preservação da cor e dos compostos bioativos. Saikia, Mahnot e Mahanta (2015) salientaram que a baixa higroscopicidade foi observada em produtos liofilizados, isto pode se explicado pelo tamanho das partículas, que em processos de liofilização são ligeiramente maiores que em outros processos. Quanto maior o tamanho da partícula, menor é a área de superfície exposta, por consequência tem-se menor

absorção de água (REZENDE *et al* apud TONON, 2012). Valores elevados de higroscopicidade foram encontrados em microcápsulas com isolado proteico de soja, por Ortiz *et al* (2009), assim como no presente estudo. Possivelmente a interação entre o concentrado proteico de soja e a goma arábica influenciou no aumento da higroscopicidade. As proteínas da soja podem ter diminuído a exposição de grupos hidrofóbicos (ORTIZ *et al*, 2009) e a goma arábica possui em suas ramificações grupos hidrofílicos (FRASCARELI, 2010) o que levaria ao aumento da retenção de moléculas de água.

5.4.2 Análise Termogravimétrica (TGA)

A Figura 15 mostra os resultados obtidos com análise termogravimétrica realizada nas microcápsulas de óleo de castanha-do-Brasil. Pode-se observar que todas as microcápsulas apresentaram maior perda de massa na faixa entre 300 a 550°C, indicando que o tipo e a natureza do material de parede utilizado não influenciaram no comportamento térmico das microcápsulas. Nesterenko *et al* (2012), realizaram análises termogravimétricas em proteína isolada de soja e perceberam redução de massa a partir de 200°C. Este mesmo comportamento foi observado por Guerrero *et al* (2010), para isolado proteico de soja puro, com redução na faixa de 200 a 400°C. A estabilidade térmica da goma arábica pura foi avaliada por Westphalen *et al* (2015), com resultados de perda de massa sendo observados na faixa de 200 a 400°C.

No presente estudo pode-se perceber que as microcápsulas apresentaram maior resistência térmica do que os materiais de parede isolados (resultado obtido pelos autores supracitados). Sugere-se desta forma que os compostos presentes nas microcápsulas foram protegidos pelo material de parede, já que a confirmação da encapsulação está relacionada ao

aumento da resistência térmica das cápsulas em comparação ao material individualizado (WESTPHALEN *et al apud* AMMAR, 2015).

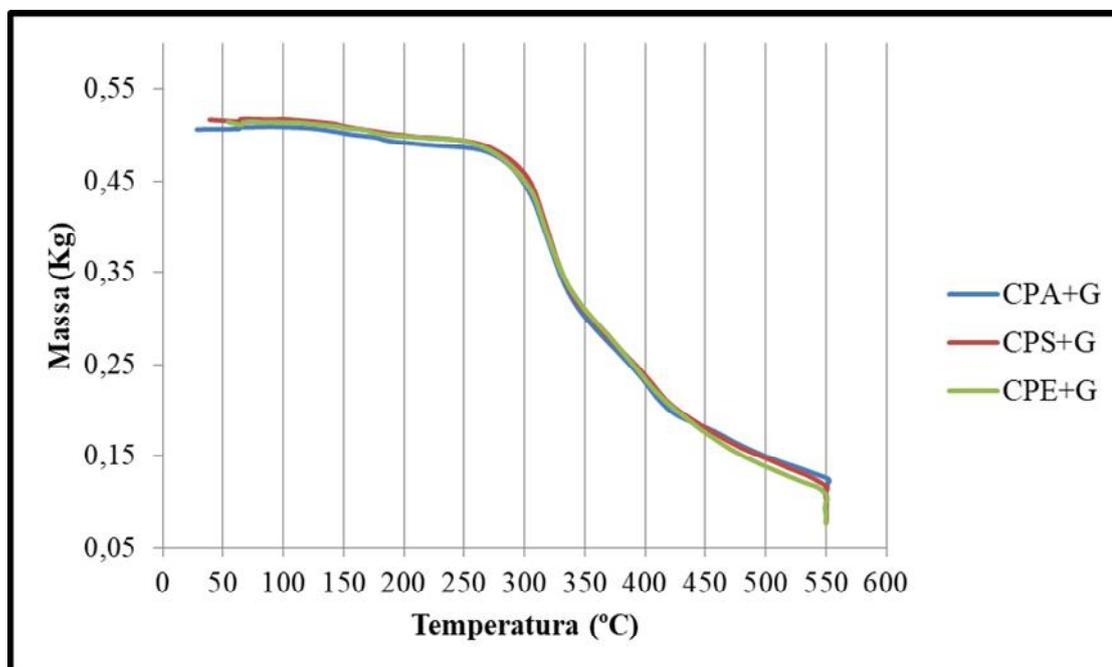


Figura – 15 Comportamento termogravimétrico de microcápsulas de concentrados proteicos de arroz, soja e ervilha e goma arábica

CPA+ G = concentrado proteico de arroz e goma arábica, CPS+G= concentrado proteico de soja e goma arábica e CPE+ G = concentrado proteico de ervilha e goma arábica.

5.4.3 Análise da microestrutura e tamanho de partícula

A análise da microestrutura das cápsulas é importante, pois nela pode-se perceber a capacidade de proteção apresentada por diferentes polímeros. Esta pode ser avaliada pelo grau de integridade e porosidade das microcápsulas (NUNES *et al*, 2015). A morfologia das micropartículas foi observada por microscopia eletrônica de varredura (MEV). Observa-se na Figura 16 que as partículas não apresentaram uma estrutura definida e com tamanho muito variável. Alguns poros podem ser observados nas estruturas formadas com o concentrado proteico de ervilha, e em menor quantidade nas estruturas formadas com o concentrado de

arroz. No entanto, a característica esponja, comum em processos de liofilização, foi detectada com maior expressão na estrutura formada pelo concentrado proteico de ervilha. Materiais com baixa capacidade encapsulante podem formar superfícies porosas, altamente rugosas e com partes quebradas. Esse tipo de estrutura resulta em produtos instáveis (RIGHETTO, 2003).

Todas as partículas apresentaram uma estrutura com aspecto de vidro quebrado, algumas em maior e outras em menor escala. As microcápsulas obtidas por liofilização exibem variações em suas morfologias superficiais, alguns estudos relataram uma morfologia similar para microcápsulas liofilizadas (EZHILARASI *et al*, 2013; ANANDHARAMAKRISHNAN; RIELLY; STAPLEY, 2010).

A distribuição do tamanho das partículas é um fator importante para avaliar o comportamento físico-químico dos produtos encapsulados, embora ainda existam controvérsias na literatura quanto à relação entre a retenção de compostos e o tamanho de partícula (RIGHETTO, 2003). A Tabela 9 mostra os valores obtidos para a variação do tamanho das diferentes microcápsulas de óleo de castanha. Determinou-se com a análise dos dados a faixa de diâmetro correspondente a 10 (d_{10}), 50 (d_{50}), 90 % (d_{90}) da distribuição das partículas. Pode-se perceber que independente do material de parede utilizado, as partículas apresentaram valores de diâmetro médio elevado.

As partículas obtidas a partir do concentrado proteico de soja demonstraram ser ligeiramente menores que as demais. A apresentação de partículas maiores em processo de liofilização é devido à baixa temperatura do processo, e à baixa força aplicada para quebrar as gotículas congeladas ou para mudar a superfície durante a secagem (SAIKIA; MAHNOT; MAHANTA, 2015). Rezende *et al* (2018), reportaram valores elevados de diâmetro das

partículas obtidas por liofilização de extratos da polpa e dos resíduos de acerola com goma arábica e maltodextrina. Esses resultados corroboram com os encontrados neste estudo.

<i>Microcápsulas</i>	<i>Distribuição dos tamanhos das partículas (μm)</i>				
	<i>D₁₀</i>	<i>D₅₀</i>	<i>D₉₀</i>	<i>D_m</i>	<i>Span</i>
<i>CPA + GA</i>	143,9	234,8	423,8	267,9	1,19
<i>CPE + GA</i>	77,57	273,3	449,4	266,7	1,36
<i>CPS + GA</i>	31,51	92,79	204,1	109,5	1,86

Tabela 9 - Distribuição do tamanho das partículas das microcápsulas de concentrados proteicos de arroz, soja e ervilha e goma arábica

CPA+ G = concentrado proteico de arroz e goma arábica, CPS+G= concentrado proteico de soja e goma arábica e CPE+ G = concentrado proteico de ervilha e goma arábica. Dm = diâmetro médio (μm).

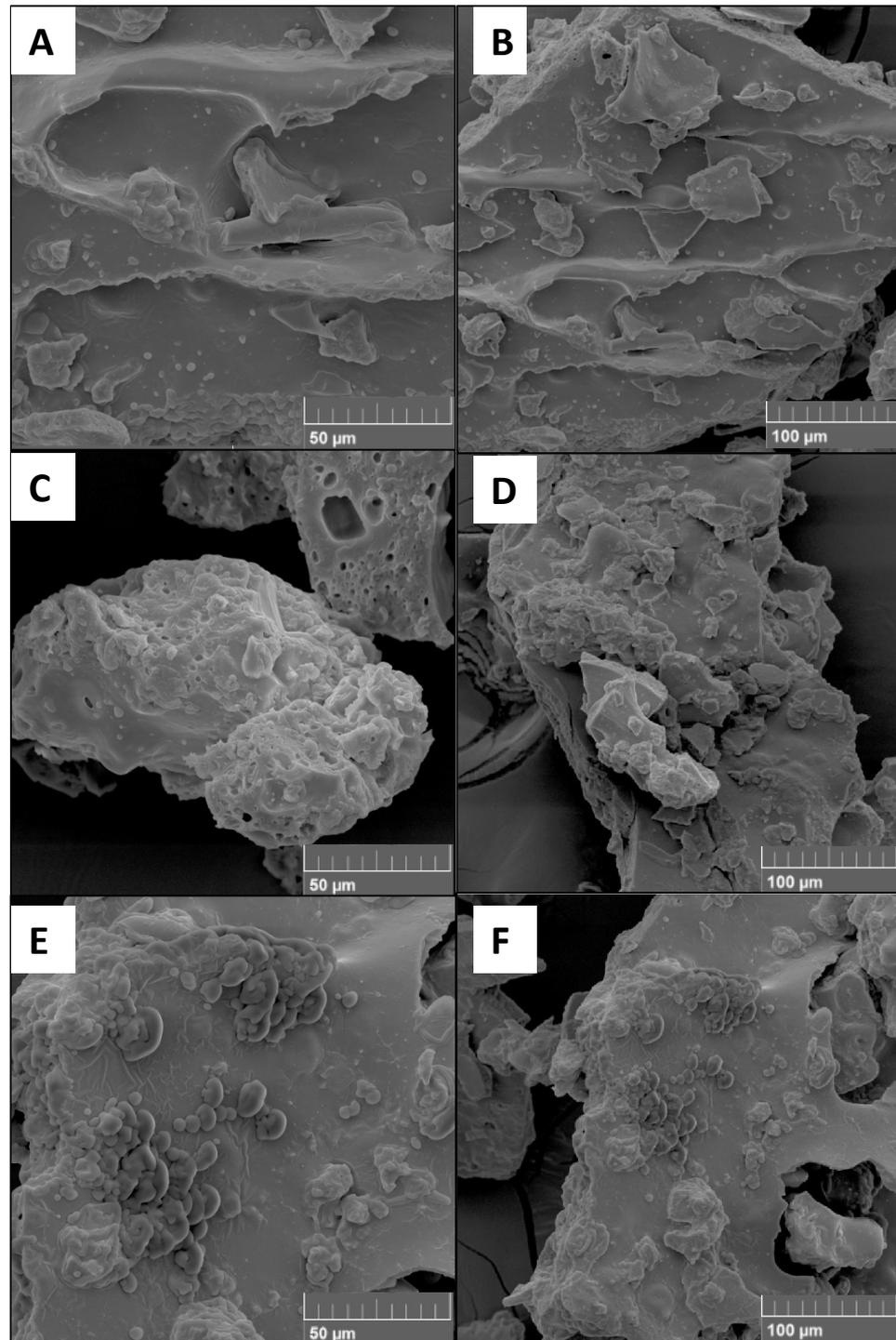


Figura 16 – Morfologia superficial das microcápsulas de concentrados proteicos de arroz, soja e ervilha e goma arábica

A e B são micrografias das partículas com concentrado proteico de arroz. C e D são micrografias das partículas com concentrado proteico de ervilha e D e E são micrografias das partículas com concentrado proteico de soja.

5.4.4 Eficiência de encapsulação

Os valores médios da eficiência de encapsulação das microcápsulas de óleo de castanha-do-Brasil com diferentes concentrados proteicos vegetais e goma arábica estão dispostos na Tabela 10. Por meio da análise de variância dos dados obtidos percebe-se diferença significativa ($p < 0,05$) entre pelo menos um dos valores apresentados (Anexo 8.1).

<i>Microcápsulas</i>	<i>Eficiência de encapsulamento</i>
<i>CPA + GA</i>	$79,9 \pm 1,4^a$
<i>CPE + GA</i>	$72,2 \pm 0,9^b$
<i>CPS + GA</i>	$75,0 \pm 1,4^c$

Tabela 10 – Eficiência de encapsulação das microcápsulas de concentrados proteicos de arroz, soja e ervilha e goma arábica

CPA + GA = concentrado proteico de arroz e goma arábica, CPS+G= concentrado proteico de soja e goma arábica e CPE+ G = concentrado proteico de ervilha e goma arábica. *Letras diferentes numa mesma coluna diferem significativamente ($p < 0,05$)

Através do teste Tukey pode-se perceber diferença significativa entre a eficiência de encapsulação dos diferentes produtos gerados. Esse resultado indica que os diferentes concentrados proteicos vegetais influenciam na eficiência de encapsulação do óleo de castanha-do-Brasil. As microcápsulas geradas a partir do concentrado proteico de arroz apresentaram maior eficiência de encapsulação, em relação aos demais produtos gerados.

Le Priol *et al* (2019), ao realizarem a encapsulação do óleo de girassol com diferentes isolados proteicos, obtiveram 88% de eficiência de encapsulação com o isolado proteico de ervilha comercial, 91% com isolado proteico de soja e 69% com proteína de arroz integral. Esses valores são superiores (para ervilha e soja) aos apresentados neste trabalho e inferior ao resultado obtido para proteínas do arroz. Essas diferenças podem estar relacionadas à

concentração de proteínas presentes nas matérias-primas, que no caso do trabalho citado é superior ao utilizado neste estudo. Além o processo de secagem para a formação das microcápsulas foi diferente, Le Priol *et al* (2019), aplicaram atomização para encapsular o óleo de girassol, neste estudo foi aplicada a técnica de liofilização para encapsular o óleo de castanha. Nesterenko *et al* (2013), ao avaliarem diferentes trabalhos com proteínas vegetais salientaram que a eficiência da encapsulação, dentre outras propriedades, podem ser influenciados por parâmetros como concentração do material de parede, técnica de encapsulação e temperatura e pH dos meio.

5.4.5 Avaliação da citotoxicidade e da atividade antioxidante celular

A citotoxicidade *in vitro* das microcápsulas de óleo e castanha-do-Brasil e do óleo *in natura* foi avaliada sobre a linhagem não neoplásica de fibroblasto de pulmão humano (MRC-5) utilizando o ensaio do Alamar blue. De acordo com os resultados obtidos, nenhuma das amostras apresentou toxicidade nas concentrações testadas, com valores de concentração inibitória média (CI50%) superiores a 50 µg/mL, assim como não foram capazes de inibir 50% das células, somente o fármaco de morte, doxorubicina, testado nas concentrações mencionadas apresentou valor de CI50% 0,20 µg/mL.

A avaliação da atividade antioxidante foi baseada no método desenvolvido para avaliar a atividade de suplementos dietéticos, fitoquímicos e alimentos contra espécies reativas de oxigênio. Alguns compostos fitoquímicos puros, extratos de frutas e óleos vegetais possuem a capacidade antioxidante, ou seja, inibem o processo de oxidação de um determinado substrato (VERRUCK; PRUDENCIO; DA SILVEIRA, 2018). Algumas moléculas consideradas antioxidantes naturais podem ser ingeridas através do consumo de

alimentos de origem vegetal, dentre eles destacam-se a vitamina C, alguns minerais, os carotenoides, compostos fenólicos e a vitamina E (ABDALLA; FAINE, 2008). Um dos compostos presentes no óleo de castanha-do-Brasil é a vitamina E, que exibe atividade antioxidante, quando ingerida na dieta, sendo transportada por componentes lipoproteicos e, em conjunto com as ubiquinonas, evitam a peroxidação lipídica (SATTLER *et al*, 2004; FUNAZAKI *et al*, 2012).

Ao avaliar atividade antioxidante do óleo de castanha-do-Brasil e das suas microcápsulas obtidas pela liofilização, pode-se perceber (Figura 17), que todos apresentaram atividade antioxidante em pelo menos duas das cinco concentrações testadas. O óleo de castanha-do-Brasil apresentou atividade antioxidante inferior aos produtos encapsulados em todas as concentrações testadas. A amostra encapsulada com o concentrado proteico de ervilha apresentou maior atividade em todas as concentrações testadas. No entanto, não há subsídios que comprovem que a interação do óleo de castanha-do-Brasil com os diferentes materiais de parede potencializou a atividade antioxidante do mesmo. Também não é possível afirmar que, algum composto específico do material de parede, possa ter gerado o ligeiro aumento da atividade antioxidante das diferentes amostras encapsuladas. Por fim, pode-se inferir que não houve supressão da atividade antioxidante do óleo e das microcápsulas.

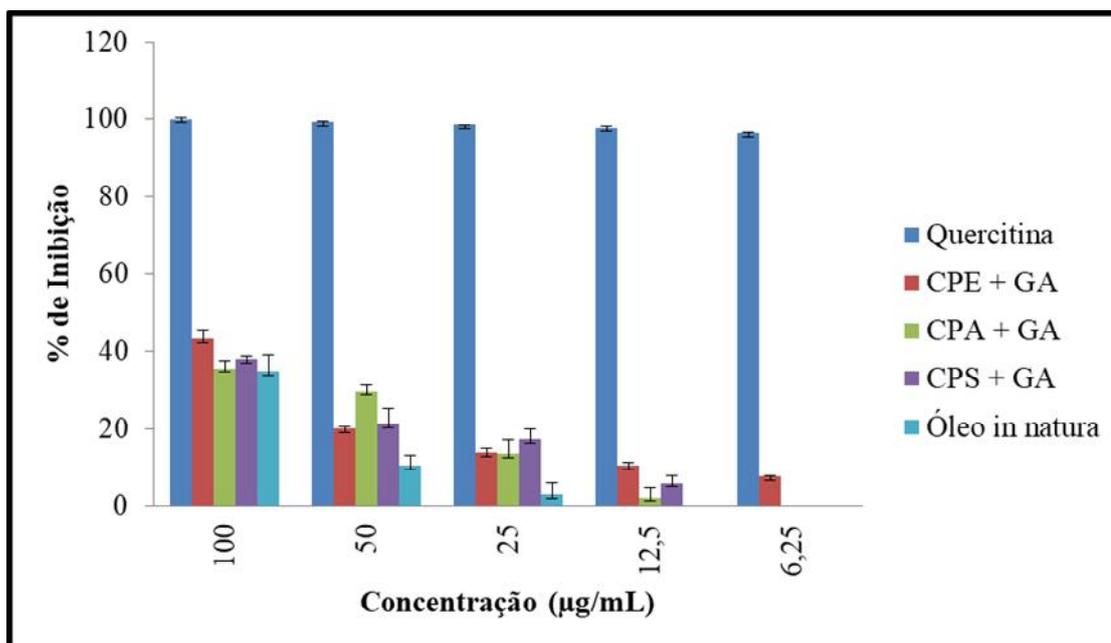


Figura 17 – Atividade antioxidante celular das microcápsulas e do óleo *in natura*

CPA + GA = concentrado proteico de arroz e goma; CPE + GA = concentrado proteico de ervilha e goma e CPS + GA = concentrado proteico de soja e goma Quercitina = fármaco controle.

5.5 Caracterização e estabilidade dos produtos microencapsulados

Análises para avaliar as características físico-químicas e a oxidação do óleo foram realizadas, a fim de se determinar os efeitos do encapsulamento na estabilidade do óleo durante o armazenamento. A estabilidade física, química e oxidativa são importantes critérios a serem analisados na microencapsulação de óleos, pois estes fatores podem determinar a capacidade que o material de parede tem de proteger o óleo contra a oxidação (KARADENIZ; SAHIM; SUMNU, 2018). Diferentes estudos de armazenamento com óleos vegetais encapsulados em diferentes matrizes vêm sendo reportados na literatura, para a avaliação da estabilidade dos produtos gerados em comparação ao óleo *in natura*. Estes estudos sugerem

melhora no armazenamento dos óleos encapsulados frente aos índices avaliados que determinam a qualidade do óleo (LUNA-GUEVARA *et al*, 2017).

Neste contexto, foi realizado o armazenamento das microcápsulas do óleo de castanha-do-Brasil preparadas com concentrados proteicos vegetais e goma arábica, bem como do óleo *in natura*. Para avaliar a estabilidade das microcápsulas, foram realizados testes de estabilidade durante o armazenamento de seis semanas a 25 ± 1 °C ao abrigo da luz. Testes de atividade de água, umidade, índice de peróxidos e índice de acidez titulável foram realizados a cada sete dias (em triplicata). No início do armazenamento (semana 0), na terceira e na sexta semanas foram avaliadas as condições microbiológicas dos produtos e o perfil de ácidos graxos.

5.5.1 Determinação dos índices de peróxidos e acidez titulável

Na Figura 18 pode-se perceber que todos os óleos encapsulados mantiveram os índices de peróxidos abaixo do que determina a legislação para óleos não refinados e prensados a frio (até 15 meq/Kg) durante o período de armazenamento. Em contrapartida, o óleo de castanha-do-Brasil *in natura* armazenado nas mesmas condições apresentou-se fora dos padrões da legislação a partir da quinta semana de armazenamento. Isso indica que os óleos encapsulados mostraram-se mais estáveis, independente dos materiais de parede utilizado, do que o óleo *in natura*. O teste Tukey foi aplicado para cada semana de análise, e pode-se perceber (Anexo 8.2) que houve diferença significativa ($p < 0,05$) nos valores obtidos a partir da primeira semana de armazenamento, ou seja, somente no ponto 0 inicial não houve diferença significativa entre os resultados.

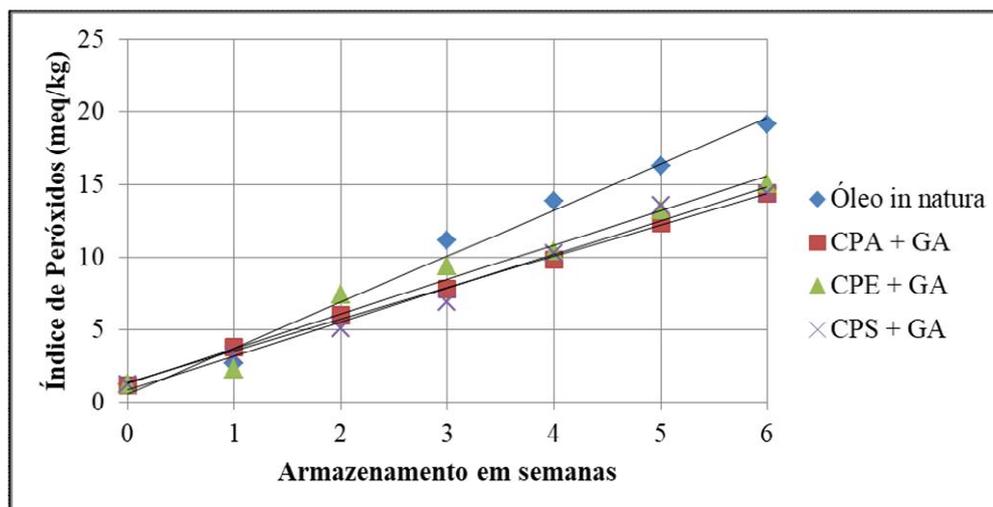


Figura 18 – Índice de peróxidos do óleo encapsulado com concentrados proteicos de arroz, soja e ervilha e goma arábica e do óleo *in natura*

CPA + GA = concentrado proteico de arroz e goma; CPE + GA = concentrado proteico de ervilha e goma e CPS + A = Concentrado proteico de soja.

A Figura 19 mostra os valores obtidos para o índice de acidez do óleo encapsulado com diferentes materiais de parede e do óleo *in natura*. O óleo *in natura* apresentou-se fora dos padrões da legislação (até 4 mgKOH/g) a partir terceira semana de armazenamento, já os produtos encapsulados mantiveram os valores dentro dos padrões. Somente na quinta semana o óleo encapsulado com concentrado proteico de ervilha e de soja ultrapassou o valor determinado pela legislação para óleos não refinados e prensados a frio. O óleo encapsulado com proteínas de arroz apresentou-se ligeiramente mais estável. O teste Tukey foi aplicado para cada semana de análise, e pode-se perceber (Anexo 8.2), que houve diferença significativa nos valores obtidos a partir da segunda semana, indicando que os materiais de parede influenciaram na estabilidade do óleo.

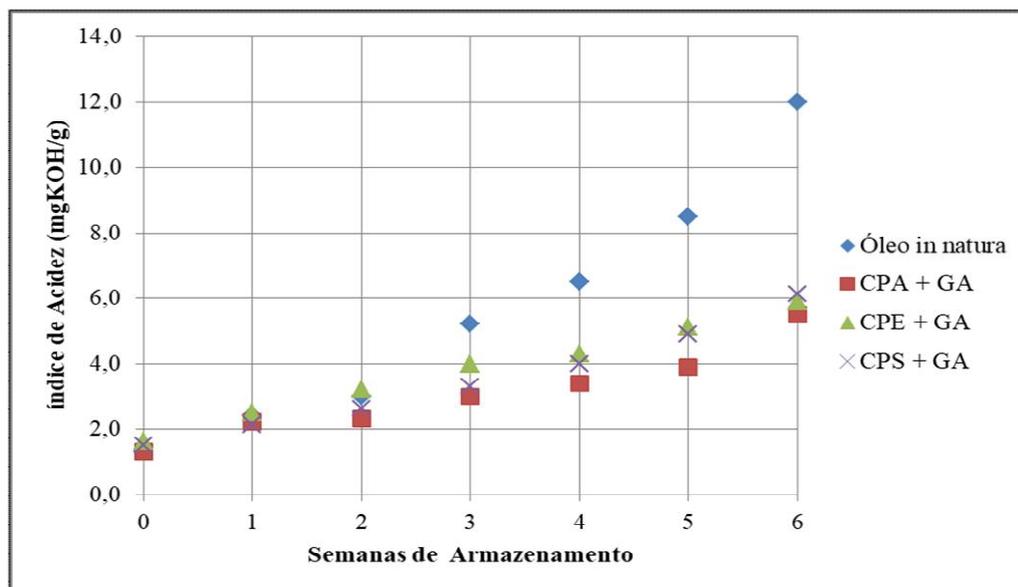


Figura 19 – Índice de acidez do óleo encapsulado com concentrados proteicos de arroz, soja e ervilha e goma arábica e do óleo *in natura*

CPA + GA = concentrado proteico de arroz e goma; CPE + GA = concentrado proteico de ervilha e goma e CPS + A = Concentrado proteico de soja.

Esses parâmetros são amplamente utilizados para avaliar a qualidade de óleos e gorduras. O índice de peróxidos, por exemplo, acessa os estágios iniciais do processo de oxidação, determinando as concentrações de hidroperóxidos gerados durante o armazenamento (NETO; BATISTA; DE ALMEIDA MEIRELLES, 2018). Alguns estudos com armazenamento em diferentes condições de óleos microencapsulados apontam maior conservação do óleo microencapsulado em comparação ao bruto armazenado nas mesmas condições (KARACA; LOW; NICKERESON, 2013; KAGAMI *et al*, 2003). Luna-Guevara *et al* (2017), reportaram um comportamento similar, aos resultados obtidos neste trabalho, para índices de peróxidos de óleos de nozes e amendoim microencapsulados e armazenados por 28 dias.

Durante o processo de armazenamento é comum que os óleos sofram oxidação. A maior estabilidade do óleo microencapsulado pode estar associada à combinação do material

de parede que gerou estruturas densas e contínuas (LUNA-GUEVARA *et al*, 2017; KAGAMI *et al*, 2003), principalmente nas superfícies das microcápsulas do concentrado proteico de arroz e soja percebidas nas micrografias (Figura 16). Os índices inferiores encontrados para os óleos encapsulados em comparação ao óleo bruto podem ter sido influenciados pela diminuição da difusão de oxigênio pela matriz, diminuindo assim a oxidação.

5.5.2 Umidade e Atividade de água

A vida útil de produtos encapsulados depende do teor de umidade, temperatura de operação e de armazenamento (QUISPE-CONDORE *et al*, 2011). A umidade pode ser considerada um fator de importante, que evidencia o sucesso do processo de secagem de produtos microencapsulados. De acordo com Klinkesorn *et al* (2006), a especificação máxima de umidade para a maioria dos pós secos na indústria alimentícia está entre 3 a 4%.

A Figura 20 traz os valores de umidade obtidos para o óleo de castanha-do-Brasil encapsulados com os concentrados proteicos e goma arábica. Todas as microcápsulas apresentaram valores inferiores a 3,5% em todo o período de armazenamento, sendo as microcápsulas com concentrado proteico de soja com valores mais altos. Pellicer *et al* (2019) encontraram umidade de 3,9 a 4,1% em produtos encapsulados por liofilização de compostos de sabor de morango com diversos materiais de parede. Os resultados deste estudo apresentaram-se ainda menores. Alguns estudos relatam óleos microencapsulados por pulverização com valores de umidade superiores aos deste estudo. Fernandes *et al* (2013) encontraram de 0,26 a 3,16% de umidade em microcápsulas de óleo de alecrim. Aghbashlo *et al* (2013) em estudos de secagem de óleo de peixe encontraram 2,11 a 5,67% de umidade.

Os valores de umidade obtidos após a microencapsulação (semana 0 – Figura 20) e durante o armazenamento sugerem que o processo de secagem foi eficiente em formar microcápsulas de óleo de castanha-do-Brasil estáveis. Pode-se perceber através da análise de variância (Anexo 8.3), que houve diferença significativa em pelo menos um dos valores a partir do ponto inicial do processo de armazenamento. Isto indica que os materiais de parede influenciaram na absorção de água durante o período de armazenamento.

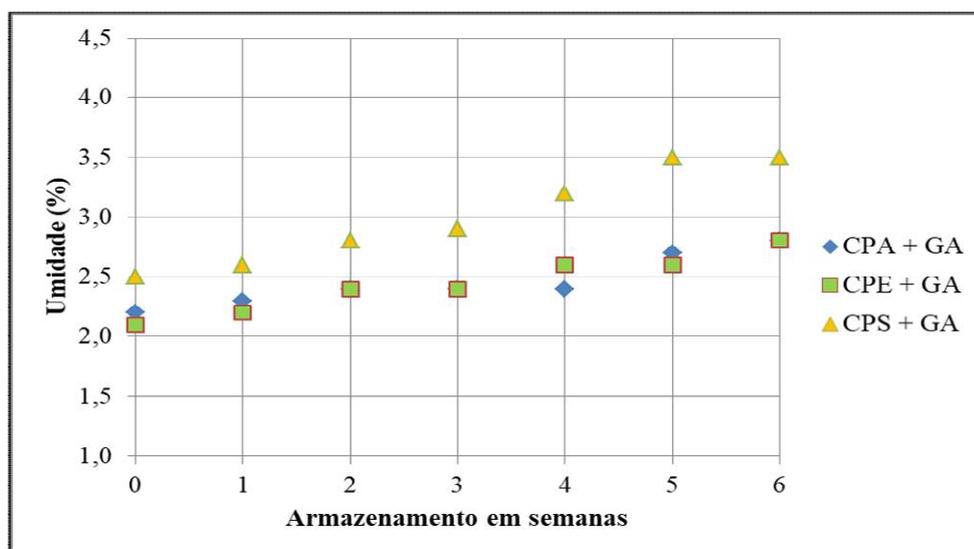


Figura 20 – Umidade das microcápsulas de concentrados proteicos de arroz, soja e ervilha e goma arábica

CPA + GA = concentrado proteico de arroz e goma; CPE + GA = concentrado proteico de ervilha e goma e CPS + A = Concentrado proteico de soja.

A atividade de água é uma característica importante a se considerar em óleos microencapsulados, pois determina em grande parte a estabilidade estrutural durante o armazenamento (NETO; BATISTA; DE ALMEIDA MEIRELLES, 2018). A presença de água em alimentos pode afetar a estabilidade oxidativa de óleos e favorecer o crescimento microbiano (SILVA, 1999). Alguns estudos verificaram que os processos de reações de oxidação mais baixos ocorrem na faixa 0,2 a 0,4 de atividade de água. Outros demonstraram alterações na composição de alimentos com o aumento da atividade de água (GRAY *et al*,

2008). No presente estudo foi avaliada a atividade de água do óleo de castanha-do-Brasil encapsulado com diferentes materiais de parede, logo após a secagem (semana 0) e durante o armazenamento, como mostra a Figura 21.

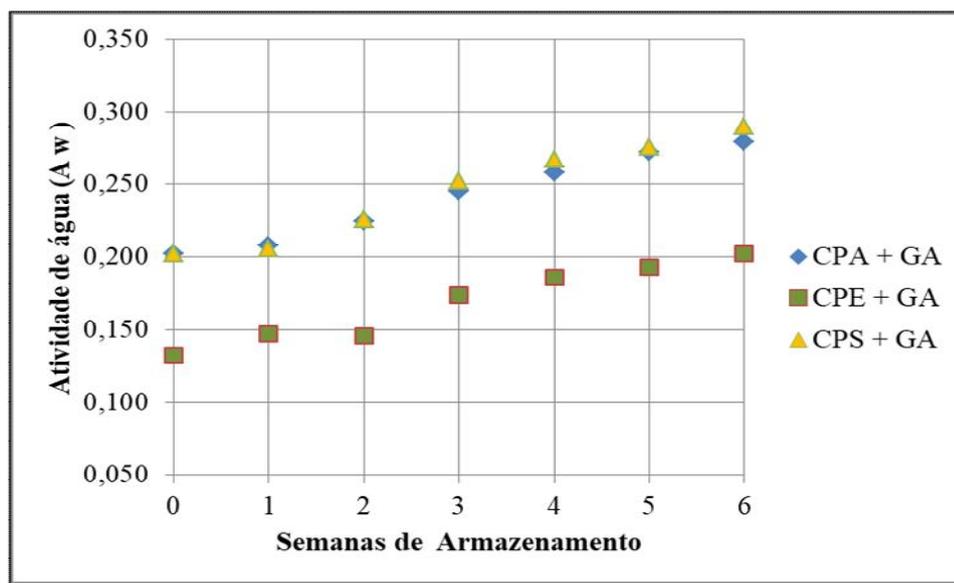


Figura 21 – Atividade de água das microcápsulas de concentrados proteicos de arroz, soja e ervilha e goma arábica e do óleo *in natura*

CPA + GA = concentrado proteico de arroz e goma; CPE + GA = concentrado proteico de ervilha e goma e CPS + A = Concentrado proteico de soja.

Pode-se notar através da Figura 21 que todas as microcápsulas apresentaram valores abaixo de 0,3 de atividade de água em todo o período de armazenamento. No entanto, os valores para microcápsulas com os concentrados de ervilha não ultrapassaram o valor de 0,21 durante o período de análises. Alguns estudos sugerem que a atividade de água com valores muito próximos a zero, ou inferiores a 0,2 pode acarretar em aumento das reações de oxidação. Esse aumento pode ser explicado pela formação de poros na matriz como resultado da eliminação de água, através dos quais é favorecida a migração do oxigênio (SOUZA,

2015). Neste caso, os baixos valores de atividade de água podem ser explicados pela estrutura superficial mais porosa, percebida em imagens de microscopia apresentadas neste trabalho na seção 5.4.2.

Jiménez, Garcia e Beristain (2010) ao estudarem os efeitos da atividade de água nas propriedades físicas do ácido linoleico microencapsulado com diferentes matrizes, concluíram que a condição de armazenagem ideal para as microcápsulas é com atividade de água abaixo de 0,5, mas a umidade deve ser considerada. Böger, Georgetti, Kurozawa (2018) encapsularam o óleo de uva com goma arábica e Silva (2018) o mesmo óleo com outras matrizes. Estes autores apresentaram resultados próximos aos deste trabalho. Delfini (2016) encapsulou óleo de semente de maracujá com diferentes materiais de parede, gerando microcápsulas que apresentaram atividade água na faixa de 0,106 a 0,233, esses resultados corroboram com os apresentados nesse trabalho.

5.5.3 Análises microbiológicas

A análise microbiológica permite identificar e quantificar microrganismos em alimentos. Esse recurso é fundamental para se revelar os possíveis riscos que o alimento pode oferecer à saúde do consumidor, as condições de higiene do processamento e determinar a vida útil do produto. Além disso, o perfil microbiológico e seu acompanhamento são de suma importância para verificação dos padrões e especificações legais (CARVALHO, 2010).

Para avaliação da estabilidade microbiológica foi realizado um estudo comparativo entre o óleo de castanha-do-Brasil encapsulado com proteínas vegetais e óleo *in natura*, ao longo de seis semanas para mesófilos aeróbios totais e bolores e leveduras. Vale ressaltar, que

não há regulação legal específica para os produtos gerados neste estudo pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA).

Desta forma avaliaram-se as condições microbiológicas que envolveram o processo de obtenção e conservação dos produtos encapsulados neste estudo. Alimentos que não possuem padrões estabelecidos para contagem de microrganismos, mostram sinais de deterioração e presença de patógenos quando apresentam contagens iguais ou superiores à ordem de 10^6 UFC/g. Nestas condições os alimentos podem sofrer alterações sensoriais, e perda de valor nutricional. (MOYSSIADI *et al*, 2004; SILVA, 2002). Na Tabela 11 é possível avaliar de maneira comparativa os resultados microbiológicos obtidos para os mesófilos aeróbios totais e fungos totais ao longo de seis semanas de armazenamento para o óleo de castanha-do-Brasil *in natura* e microencapsulado.

Quanto aos valores obtidos para a contagem dos microrganismos deste estudo, pode-se perceber que tanto os produtos encapsulados quanto o próprio óleo *in natura* permaneceram abaixo de 10^6 UFC/g ao longo das seis semanas. Esses resultados indicam que houve estabilidade microbiológica do óleo de castanha-do-Brasil microencapsulado dentro do período estudado, uma vez que valores abaixo da ordem de 10^6 UFC/ml garantem, segundo Silva (2002), a adequação do processo de obtenção do produto quanto à condição microbiológica. Da Costa *et al* (2019) encontraram resultados similares ao deste estudo, ao encapsular por liofilização extrato de junça com diferentes materiais de parede.

Mesófilos (UFC/g)			
Amostras	0	3	6
<i>Óleo in natura</i>	-*	$6,8 \times 10^2$	$2,3 \times 10^3$
<i>CPA + GA</i>	-*	$1,9 \times 10^2$	$8,8 \times 10^2$
<i>CPE + GA</i>	$3,9 \times 10^2$	$1,7 \times 10^3$	$1,1 \times 10^5$
<i>CPS + GA</i>	$5,1 \times 10^2$	$9,4 \times 10^2$	$1,6 \times 10^4$
Bolores (UFC/g)			
<i>Óleo in natura</i>	-*	$9,0 \times 10$	$1,8 \times 10^2$
<i>CPA + GA</i>	-*	$3,0 \times 10$	$5,5 \times 10^2$
<i>CPE + GA</i>	-*	$2,1 \times 10^2$	$2,6 \times 10^3$
<i>CPS + GA</i>	-*	-*	$3,0 \times 10$
Leveduras (UFC/g)			
<i>Óleo in natura</i>	$4,8 \times 10^2$	$6,8 \times 10^2$	$2,3 \times 10^3$
<i>CPA + GA</i>	$3,3 \times 10^2$	$3,4 \times 10^2$	$5,5 \times 10^2$
<i>CPE + GA</i>	$6,8 \times 10$	$1,5 \times 10^2$	$7,6 \times 10^3$
<i>CPS + GA</i>	$1,9 \times 10^2$	$7,6 \times 10^3$	$1,0 \times 10^4$

Tabela 11 – Estabilidade microbiológica do óleo *in natura* e encapsulado com as diferentes matrizes proteicas
 CPA + GA = concentrado proteico de arroz e goma; CPE + GA = concentrado proteico de ervilha e goma e CPS + A = Concentrado proteico de soja *Sem crescimento.

Em relação à contagem de mesófilos, percebe-se que as amostras do óleo, do concentrado de ervilha e de soja, possuem valores muito próximos no ponto inicial (0). No entanto, ao longo do armazenamento a amostra com concentrado de ervilha apresenta maior crescimento que as demais. O mesmo comportamento percebe-se nos resultados de bolores, sendo a amostra com o concentrado de soja apresentando o menor valor de crescimento durante o armazenamento. Para contagem de leveduras pode-se perceber que as microcápsulas com o concentrado de arroz mantiveram-se mais estáveis que as demais. De modo geral, a amostra que apresentou valores mais estáveis de crescimento foi a amostra com concentrado de arroz, o que corrobora com os resultados obtidos para análises de umidade e atividade de água deste estudo, já que esses fatores influenciam diretamente no crescimento de microrganismos em alimentos.

Na Tabela 11 é possível avaliar que os resultados microbiológicos obtidos foram satisfatórios, ao longo de seis semanas de armazenamento das microcápsulas e do óleo *in natura*. Através do teste Tukey (Anexo 8.4), pode-se perceber diferença significativa ($p < 0,05$) entre os valores obtidos desde o início do armazenamento. Esses resultados revelam que os materiais de parede utilizados foram capazes de influenciar no crescimento microbiano de cada amostra. Revelam também que nem todas as microcápsulas apresentaram-se mais estáveis que o óleo, somente aquela produzida com concentrado de arroz, indicando que houve maior proteção do óleo por essa cápsula.

5.5.4 Perfil de ácidos graxos

A Tabela 12 mostra os resultados da composição de ácidos graxos do óleo de castanha-do-Brasil obtido por prensagem a frio, e deste mesmo óleo, após a encapsulação com proteínas vegetais e goma arábica durante o período de armazenamento. Os valores de ácidos oleico e linoleico são predominantes e estão de acordo com os valores encontrados por outros autores, para extração assistida por ultrassom (SCHONS *et al*, 2017), por prensagem e soxhlet (CASTELO *et al*, 2016; QUEIROGA *et al*, 2009; ARAÚJO, 2008; FREITAS *et al*, 2007; FERREIRA *et al*, 2006).

A cromatografia gasosa permitiu a avaliação do perfil dos ácidos graxos presentes no óleo de castanha-do-Brasil utilizado neste estudo ao longo do processo de armazenamento. O óleo *in natura* apresentou inicialmente 73,38% de ácidos graxos insaturados, os óleos extraídos das microcápsulas apresentaram 74,85% para CPA+GA, 73,21% para CPE+GA e 74,67% para CPS+GA de ácidos graxos insaturados. Estes resultados indicam que o processo de secagem não causou danos ao produto original, e que tanto o óleo *in natura*, quanto o encapsulado podem ser caracterizados como sendo de excelente qualidade. Esses resultados

estão de acordo com os valores encontrados para índice de peróxidos e acidez obtidos logo após a secagem.

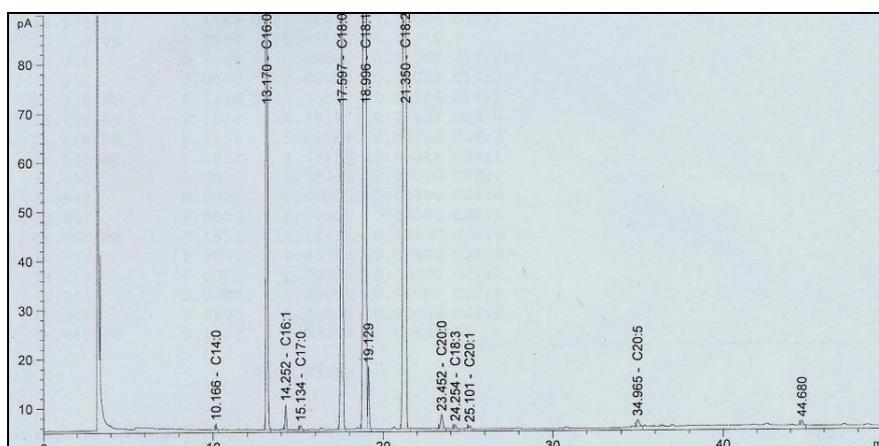


Figura 22 – Cromatograma do perfil de ácidos graxos do óleo encapsulado com o concentrado proteico de ervilha e goma arábica

Ao fim do armazenamento pode-se perceber que o percentual de ácidos graxos insaturados quase não sofreu alteração, apesar de apresentar algumas diferenças estatísticas (Tabela 12) entre os grupos. Esse resultado é um pouco contraditório quando relacionados aos valores encontrados para os índices de peróxidos e acidez, no final do processo de armazenagem, sobretudo para o óleo *in natura*. No entanto, a degradação dos ácidos graxos nos óleos vegetais pode estar ligada ao tipo de via inicial da oxidação ou até mesmo com a posição dos ácidos graxos na estrutura do triacilglicerol, e não somente ao grau de insaturações dos ácidos graxos (BRANCO, 2013). Isto poderia justificar parte dos resultados apresentados para o perfil de ácidos graxos insaturados encontrados no fim do processo de armazenamento.

As condições de armazenagem, bem como o próprio processo de encapsulação do óleo permitiram a manutenção da estabilidade oxidativa, que pode ser definida como o tempo necessário para que o óleo comece a apresentar sinais de rancidez, momento em que se

consegue estimar a susceptibilidade à deterioração oxidativa (VIEIRA, 2008). Vale ressaltar que alguns antioxidantes presentes no óleo podem inibir retardar ou interromper o processo de deterioração oxidativa por um tempo determinado (IQBAL; BHANGER, 2007). O que também pode justificar parte dos resultados deste estudo.

<i>Perfil de Ácidos Graxos - Óleo in natura</i>									
<i>Semanas</i>	<i>C14:0</i>	<i>C16:0</i>	<i>C16:1</i>	<i>C17:0</i>	<i>C18:0</i>	<i>C18:1</i>	<i>C18:2</i>	<i>C18:3</i>	<i>C20:0</i>
0	0,05 ± 0,00 ^a	14,15 ± 0,08 ^a	0,30 ± 0,00 ^a	0,07 ± 0,00 ^a	10,99 ± 0,03 ^a	37,6 ± 0,04 ^a	35,41 ± 0,01 ^a	0,07 ± 0,00 ^a	0,3 ± 0,00 ^a
3	0,06 ± 0,00 ^a	14,18 ± 0,04 ^a	0,3 ± 0,00 ^a	0,07 ± 0,00 ^a	10,94 ± 0,02 ^a	37,6 ± 0,06 ^a	35,58 ± 0,01 ^a	0,07 ± 0,00 ^a	0,3 ± 0,00 ^a
6	0,05 ± 0,00 ^a	14,17 ± 0,12 ^a	0,3 ± 0,00 ^a	0,07 ± 0,00 ^a	10,96 ± 0,03 ^a	37,66 ± 0,04 ^a	35,26 ± 0,05 ^a	0,07 ± 0,00 ^a	0,3 ± 0,00 ^a
<i>Perfil de Ácidos Graxos - CPA + GA</i>									
<i>Semanas</i>	<i>C14:0</i>	<i>C16:0</i>	<i>C16:1</i>	<i>C17:0</i>	<i>C18:0</i>	<i>C18:1</i>	<i>C18:2</i>	<i>C18:3</i>	<i>C20:0</i>
0	0,06 ± 0,00 ^a	14,85 ± 0,09 ^b	0,31 ± 0,00 ^a	0,07 ± 0,00 ^a	8,91 ± 0,03 ^b	37,36 ± 0,06 ^b	37,1 ± 0,04 ^b	0,08 ± 0,00 ^b	0,27 ± 0,00 ^b
3	0,06 ± 0,00 ^a	14,71 ± 0,06 ^b	0,31 ± 0,00 ^a	0,07 ± 0,00 ^a	8,91 ± 0,06 ^b	37,37 ± 0,10 ^b	37,04 ± 0,15 ^b	0,08 ± 0,00 ^b	0,27 ± 0,00 ^b
6	0,06 ± 0,00 ^a	14,82 ± 0,04 ^b	0,31 ± 0,00 ^a	0,07 ± 0,00 ^a	8,91 ± 0,01 ^b	37,17 ± 0,02 ^b	37,12 ± 0,04 ^b	0,08 ± 0,00 ^b	0,27 ± 0,00 ^b
<i>Perfil de Ácidos Graxos - CPE + GA</i>									
<i>Semanas</i>	<i>C14:0</i>	<i>C16:0</i>	<i>C16:1</i>	<i>C17:0</i>	<i>C18:0</i>	<i>C18:1</i>	<i>C18:2</i>	<i>C18:3</i>	<i>C20:0</i>
0	0,05 ± 0,00 ^a	14,28 ± 0,10 ^b	0,31 ± 0,00 ^a	0,07 ± 0,00 ^a	10,96 ± 0,01 ^a	37,53 ± 0,04 ^a	35,3 ± 0,04 ^a	0,07 ± 0,00 ^a	0,3 ± 0,00 ^a
3	0,06 ± 0,00 ^a	14,89 ± 0,09 ^b	0,31 ± 0,00 ^a	0,07 ± 0,00 ^a	8,93 ± 0,01 ^b	37,17 ± 0,06 ^b	37,14 ± 0,05 ^b	0,08 ± 0,00 ^b	0,27 ± 0,00 ^b
6	0,06 ± 0,00 ^a	14,66 ± 0,04 ^b	0,31 ± 0,00 ^a	0,07 ± 0,00 ^a	8,93 ± 0,02 ^b	37,44 ± 0,01 ^b	36,99 ± 0,03 ^b	0,08 ± 0,00 ^b	0,27 ± 0,00 ^b
<i>Perfil de Ácidos Graxos - CPS + GA</i>									
<i>Semanas</i>	<i>C14:0</i>	<i>C16:0</i>	<i>C16:1</i>	<i>C17:0</i>	<i>C18:0</i>	<i>C18:1</i>	<i>C18:2</i>	<i>C18:3</i>	<i>C20:0</i>
0	0,06 ± 0,00 ^a	14,77 ± 0,06 ^b	0,31 ± 0,00 ^a	0,07 ± 0,00 ^a	8,95 ± 0,01 ^b	37,36 ± 0,02 ^b	36,92 ± 0,03 ^b	0,08 ± 0,00 ^b	0,27 ± 0,00 ^b
3	0,06 ± 0,00 ^a	14,87 ± 0,04 ^b	0,31 ± 0,00 ^a	0,07 ± 0,00 ^a	8,95 ± 0,02 ^b	37,22 ± 0,01 ^b	37,01 ± 0,02 ^b	0,08 ± 0,00 ^b	0,27 ± 0,00 ^b
6	0,06 ± 0,00 ^a	14,86 ± 0,18 ^b	0,31 ± 0,00 ^a	0,07 ± 0,00 ^a	8,93 ± 0,05 ^b	37,02 ± 0,05 ^b	37,27 ± 0,04 ^b	0,08 ± 0,00 ^b	0,27 ± 0,01 ^b

Tabela 12 - Perfil de ácidos graxos do óleo de castanha in natura e encapsulado durante o período de armazenamento

CPA + GA = concentrado proteico de arroz e goma; CPE + GA = concentrado proteico de ervilha e goma e CPS + A = Concentrado proteico de soja *Letras diferentes numa mesma coluna diferem significativamente ($p < 0,05$).

6.0 CONCLUSÃO

Conclui-se que é possível a microencapsulação do óleo de castanha-do-Brasil com proteínas vegetais e goma arábica. A caracterização das proteínas e das microcápsulas mostraram o potencial que esses concentrados proteicos vegetais possuem para se tornar alternativas ao uso de proteínas animais. Os testes de estabilidade evidenciaram de modo geral que os óleos encapsulados apresentaram-se mais estáveis do que o óleo bruto. O óleo de castanha microencapsulado com proteínas vegetais é potencialmente capaz de ser inserido em vários processos alimentícios, inclusive aqueles que atendam aos consumidores de dietas restritivas.

Diante do desempenho na estabilidade da emulsão, da superfície das partículas, da eficiência de encapsulação, na estabilidade apresentada para índices de peróxidos, acidez, percentuais de umidade e atividade de água, além da estabilidade microbiológica, pode-se concluir que entre os três concentrados utilizados, o de arroz conferiu maior proteção e estabilidade ao óleo de castanha-do-Brasil.

Os produtos gerados neste estudo podem ser utilizados como ingredientes em formulações de alimentos e/ou suplementos em dietas específicas. Este estudo é de suma importância para a região amazônica, pois agrega valor a produção de uma semente regional. Além de colaborar com a diminuição da produção de resíduos, já que óleo é um subproduto da castanha-do-Brasil.

7.0 REFERÊNCIAS

ABDALLA, D. S. P.; FAINE, L. A. **Radicais livres e antioxidantes**. Fundamentos de Toxicologia. 3ª edição. São Paulo: Atheneu Editora, p. 37-58, 2008.

AGHBASHLO, M. *et al.* Influence of wall material and inlet drying air temperature on the microencapsulation of fish oil by spray drying. **Food and Bioprocess Technology**, v. 6, n. 6, p. 1561-1569, 2013.

AHMED, S. A. *et al.* A new rapid and simple non-radioactive assay to monitor and determine the proliferation of lymphocytes an alternative to [3H] thymidine incorporation assay. **Journal of Immunological Methods**, v. 170, n. 2, p. 211-224, 1994.

ALMEIDA-DORIA, R. F.; REGITANO-D'ARCE, M. A. B. Antioxidant activity of rosemary and oregano ethanol extracts in soybean oil under thermal oxidation. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.20, n.2, p.197-203, 2000.

ALTSCHUL, A. M.; WILCKE, H. L. **New Protein Foods: Seed Storage Proteins**. Academic press, 2013.

ÁLVARES, V. S. *et al.* Qualidade da castanha-do-brasil do comércio de Rio Branco, Acre. **Acta Amazonica**, v. 42, n. 2, 2011.

ANANDHARAMAKRISHNAN, C.; RIELLY, C.D.; STAPLEY, A. G. F. Spray-freeze-drying of whey proteins at sub-atmospheric pressures. **Dairy Science and Technology**, v. 90, n. 2-3, p. 321-334, 2010.

ARAÚJO, A. P. C. *et al.* Avaliação do sobreaquecimento de óleos vegetais através de análises químicas e espectroscopia UV/visível. **Blucher Chemical Engineering Proceedings**, v. 1, n. 2, p. 5023-5030, 2015.

ARAÚJO, J. M. **Química de alimentos: teoria e prática**. 5ª edição. Editora: UFV, Viçosa-MG, 2011.

ARAÚJO, L. A. **Estudo das propriedades físicas, químicas e termofísicas de óleos regionais e suas misturas**. Dissertação (Mestrado em Ciências e Tecnologia de Alimentos) 127p. Instituto de Tecnologia, Universidade Federal do Pará, Belém, 2008.

ASCHERI, D. P. R.; MARQUEZ, M. O. M.; MARTUCCI, E. T. Microencapsulação de óleo essencial de laranja: seleção de material de parede. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. Campinas, 23(supl.), 1-6, dez. 2003.

ASSOCIATION OF OFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists**. 19th ed. Gaithersburg, 3172 p. 2016.

AZEREDO, H. M. C. Encapsulação: aplicação à tecnologia de alimentos. **Alimentos e Nutrição Araraquara**, v. 16, n. 1, p. 89-97, 2008.

ARYEE, A. N. A.; AGYEI, D.; UDENIGWE, C. C. Impact of processing on the chemistry and functionality of food proteins. In: **Proteins in Food Processing**. Woodhead Publishing, p. 27-45, 2018.

BAE, E. K.; LEE, S. J. Microencapsulation of avocado oil by spray drying using whey protein and maltodextrin. **Journal of Microencapsulation**, v. 25, n. 8, p. 549-560, 2008.

BÖGER, B. R.; GEORGETTI, S. R.; KUROZAWA, L. E. Microencapsulation of grape seed oil by spray drying. **Food Science and Technology**, 2018.

BOTELHO M. A. *et al.* Antimicrobial activity of the essential oil from *Lippia siloides*, carvacrol and thymol against oral pathogens. **Braz J Med Biol Res.** 40:349-56, 2007.

BOWEN, K. J. *et al.* Oleic acid-derived oleoylethanolamide: A nutritional science perspective. **Progress in lipid research**, v. 67, p. 1-15, 2017.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.

BRANCO, V. N. C. **Transformações químicas na oxidação acelerada de óleos vegetais e sua relação com a capacidade antioxidante total, uma abordagem multivariada**. Tese (Doutorado em Ciências dos Alimentos) 171f. Instituto de Química, Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2013.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução nº 268, de 22 de setembro de 2005**. Aprova o "regulamento técnico para produtos proteicos de origem vegetal". Diário Oficial de Brasília, de 23 de setembro de 2005.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução-RDC n. 7, de 18 de fevereiro de 2011**. Dispõe sobre limites máximos tolerados para micotoxinas em alimentos. Diário Oficial de Brasília. Seção 1, p. 66-67, 2011.

BRASILEIRO, J. S. **Microencapsulação de compostos bioativos: inovação em diferentes áreas**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) 71f. Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Fernando Pessoa, Porto, Portugal. 2011.

BURGOS-DÍAZ, C. *et al.* Multilayer emulsions stabilized by vegetable proteins and polysaccharides. **Current opinion in colloid & interface science**, v. 25, p. 51-57, 2016.

CARDOSO, B. R. *et al.* Brazil nuts: Nutritional composition, health benefits and safety aspects. **Food Research International**, v. 100, p. 9-18, 2017.

CARVALHO, I. T. **Microbiologia Básica**. Recife: EDUFRPE, 111 p, 2010.

CASTELO B. V. N., et al. Antioxidant capacity is a surrogate measure of the quality and stability of vegetable oils. **Eur. J. Lipid Science Technolog.** v. 118; p. 224-235, 2016.

CAVALCANTI, M. T.; BORA, P. S.; CARVAJAL, J. C. L. Propriedades funcionais das proteínas de amêndoas da faveleira (*Cnidoscylus phyllacanthus* (Mart.) Pax. et K. Hoffm.) com e sem espinhos. **Ciência Tecnologia de Alimentos**, v. 29, n. 3, p. 507-602, 2009.

CHAO-HSUAN, C. *et al.* An Innate Bactericidal Oleic Acid Effective Against Skin Infection of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: A Therapy Concordant with Evolutionary Medicine. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, vol.21, n.4, p.391-399, janeiro, 2011.

CHEN, M. *et al.* Study on the emulsifying stability and interfacial adsorption of pea proteins. **Food Hydrocolloids**, v. 88, p. 247-255, 2019.

CHENG, J.; RU Y. Z; QIN C. H. Analytical solutions for the moving interface problem in freeze-drying with or without back heating. **Drying technology**, v. 20, n. 3, p. 553-567, 2002.

COELHO, M. S.; SALAS-MELLADO, M. M. How extraction method affects the physicochemical and functional properties of chia proteins. **LWT- Food Science and Technology**, v. 96, n. February, p. 26–33, 2018.

COLPO, E. *et al.* Brazilian nut consumption by healthy volunteers improves inflammatory parameters. **Nutrition**, v. 30, p. 459-465, 2014.

CONSTANT, P. B.; STRINGHETA, P. C. Microencapsulação de ingredientes alimentícios. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 36, n. 1, p. 12-18, 2002.

COSTA, C. F. A. **Efeito inibitório de óleos essenciais sobre o crescimento e acumulação de aflatoxinas por *Aspergillus***. Dissertação (Mestrado em Bioengenharia) 124p. Escola de Engenharia, Universidade do Minho. 2015.

COSTA, D. S. **Uso de óleos amazônicos na flotação de minérios fosfáticos**. Tese (Doutorado em engenharia metalúrgica, materiais e de minas) 191p. Faculdade de engenharia - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte. 2012.

COSTA, J. M. G. **Eficiência de diferentes encapsulantes e condições operacionais de secagem por atomização na produção e aplicação de micropartículas de bioaroma de queijo suíço**. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) 151 f. Departamento de Ciência dos Alimentos, UFLA. Lavras-MG, 2013.

DA COSTA N. J. *et al.* Microencapsulation of tiger nut milk by lyophilization: Morphological characteristics, shelf life and microbiological stability. **Food chemistry**, v. 284, p. 133-139, 2019.

DA SILVA, R. F.; ASCHERI, J. L.; DE SOUZA, J. M. L. Influência do processo de beneficiamento na qualidade de amêndoas de castanha-do-brasil. **Embrapa Agroindústria de Alimentos-Artigo em periódico indexado**, 2010.

DE FREITAS, R. A. Análise qualitativa do óleo de castanha-do-Brasil. **Jornada Científica UNESC**, n. 1, 2016.

DE MENEZES, C. R. *et al.* Microencapsulação de probióticos: avanços e perspectivas. **Ciência Rural**, v. 43, n. 7, p. 1309-1316, 2013.

DELAHAIJE, R. J. *et al.* Protein concentration and protein-exposed hydrophobicity as dominant parameters determining the flocculation of protein-stabilized oil-in-water emulsions. **Langmuir**, v. 29, n. 37, p. 11567-11574, 2013.

DELFINI, F. T. **Microencapsulação de óleo da semente do maracujá através da secagem por atomização**. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) 113p. Faculdade de Engenharia de Alimentos. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2016.

DELGADO, A. E.; RUBIOLO, A. C. Microstructural changes in strawberry after freezing and thawing processes. **LWT-Food Science and Technology**, v. 38, n. 2, p. 135-142, 2005.

DESAI, K. G. H.; PARK, H. J. Recent developments in microencapsulation of food ingredients. **Drying Technology**, London, v. 23, n. 7, p. 1361-1394, 2005.

DEUS, R. J. A. *et al.* Avaliação do efeito antifúngico do óleo resina e do óleo essencial de copaíba (*Copaifera multijuga* Hayne). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 13, n. 1, p. 1-7, 2011.

DIAS, M. I. M. **Cultura in vitro e técnicas de microencapsulação: aumento da produção e da estabilidade de compostos bioativos de espécies vegetais**. Tese (Doutorado em Química Sustentável), Faculdade de Ciências, Universidade do Porto, Porto, 2017.

DUBEY, R. Microencapsulation technology and applications. **Defence Science Journal**, v. 59, n. 1, p. 82, 2009.

EZHILARASI, P. N. *et al.* Freeze drying technique for microencapsulation of Garcinia fruit extract and its effect on bread quality. **Journal of Food Engineering**, v. 117, n. 4, p. 513-520, 2013.

FARIAS, O. T. *et al.* Óleo essencial de andiroba (*Carapa guianensis* Aubl.) e copaíba (*Copaifera langsdorffii* Desf) sobre a sanidade e fisiologia de sementes de feijão macassar (*Vigna unguiculata* L. Walp). **Rev. Bras. Pl. Med**, v. 18, n. 3, p. 629-635, 2016.

FELIX P. H. C. **Microencapsulação de óleo essencial de canela por atomização com emprego de diferentes materiais de parede.** Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) 92p. Escola de Engenharia, Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais, Brasil. 2014.

FERNANDES, R. V. B. *et al.* Microencapsulation of Rosemary essential oil: characterization of particules. **Drying Technology**. 31, 1245-1254. 2014.

FERREIRA, E. S. *et al.* Caracterização físico-química da amêndoa, torta e composição dos ácidos graxos majoritários do óleo bruto da Castanha-do-Brasil (*Bertholletia excelsa H.B.K.*). **Alimentos e Nutrição**, Araraquara, v. 17, n. 2, p. 203-208, 2006.

FIOCCHI, A. *et al.* A hydrolysed rice-based formula is tolerated by children with cow's milk allergy: a multi-centre study. **Clinical & Experimental Allergy**, v. 36, n. 3, p. 311-316, 2006.

FORNY, L.; MARABI, A.; PALZER, S. Wetting, disintegration and dissolution of agglomerated water soluble powders. **Powder Technology**, v. 206, n. 1-2, p. 72-78, 2011.

FRASCARELI, E. C. **Microencapsulação de óleo de café através de secagem por atomização: avaliação das propriedades da emulsão e do tipo de material de parede sobre as características do pó.** Dissertação (Mestre em Engenharia de Alimentos). 153 f. Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2010.

FREITAS S. P. *et al.* Extração e fracionamento simultâneo de óleo castanha-do-brasil com etanol. *Rev. Ciência e Tecnologia de Alimentos* 27: 14-17, 2007.

FUCHS M. *et al.* Encapsulation of oil in powder using spray drying and fluid bed agglomeration. **Journal of Food Engineering**, 75, 27–35, 2006.

GAVA, A. J. *et al.* **Tecnologia de alimentos: princípio e aplicações.** NBL Editora, Rio de Janeiro, 2009.

GEROLA, A. P. *et al.* The effect of methacrylation on the behavior of Gum Arabic as pH-responsive matrix for colon-specific drug delivery. **European Polymer Journal**, New York, v. 78, p. 326–339, May 2016.

GHARSALLAOUI, A. *et al.* Utilisation of pectin coating to enhance spray-dry stability of pea protein-stabilised oil-in-water emulsions. **Food Chemistry**. 122, 447–454, 2010.

GLÓRIA, M. M.; REGITANO-D'ARCE, M. A. B. Concentrado e concentrado protéico de torta de castanha do Pará: obtenção e caracterização química e funcional. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 20, n. 2, p. 240-245, 2000.

GOMES, A. F. T. **Obtenção e caracterização de micropartículas de quitosana e proteína bioativa de tamarindo (*Tamarindus Indica L.*).** Trabalho de Conclusão de Curso. Universidade Federal do Rio Grande do Norte. 2018.

GRAY, D. A. *et al.* Lipid oxidation in glassy and rubbery-state starch extrudates. **Food chemistry**, v. 106, n. 1, p. 227-234, 2008.

GROSSO, C. *et al.* Alternative and efficient extraction methods for marine-derived compounds. **Marine drugs**, v. 13, n. 5, p. 3182-3230, 2015.

GUERRERO, P. *et al.* Mechanical and thermal properties of soy protein films processed by casting and compression. **Journal of Food Engineering**, v. 100, n. 1, p. 145-151, 2010.

HEDAYATI, M. T. *et al.* *Aspergillus flavus*: human pathogen, allergen and mycotoxin producer. **Review: Microbiology**, v. 153, p. 1677-1692, 2007.

HOOGENKAMP, H.; KUMAGAI, H.; WANASUNDARA, J. P. Rice Protein and Rice Protein Products. **In: Sustainable Protein Sources**. p. 47-65, 2016.

HUANG, D.; LI, W. A brief review on the buoyancy criteria for supercritical fluids. **Applied Thermal Engineering**, 2017.

HUERTA-YÉPEZ, S.; TIRADO-RODRIGUEZ, A. B.; HANKINSON, O. Role of diets rich in omega-3 and omega-6 in the development of cancer. **Boletín Médico Del Hospital Infantil de México (English Edition)**, v. 73, n. 6, p. 446-456, 2016.

IBARROLA-JURADO, N. *et al.* Prevention of Diabetes With Mediterranean Diets. **Ann International Medicine**, v. 160, p. 1-10, 2014.

IDRIS, Y.M. A. *et al.* Determination of aflatoxin levels in Sudanese edible oils. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, n. 8-9, p. 2539-2541, 2010.

IQBAL, S.; BHANGER, M. I. Stabilization of sunflower oil by garlic extract during accelerated storage. **Food Chemistry**, v. 100, p. 246-254, 2007.

JAFARI, S. D.; BEHESHTI, P.; ASSADPOOR, E. Rheological behavior and stability of Dlimonene emulsions made by a novel hydrocolloid (Angum gum) compared with Arabic gum. **Journal of Food Engineering**, v.109, p.1-8, 2012

JIMÉNEZ, M., GARCIA, H. S., BERISTAIN, C. I. Effect of water activity on physical properties of conjugated linoleic acid (CLA) microcapsules. **Journal of Food Process Engineering**, 33, 434-447, 2010.

JOHN, A.J.; SHAHIDI, F. Phenolic compounds and antioxidant activity of Brazil nut (*Bertholletia excelsa*). **Journal of functional foods**, v. 2, p. 196–209, maio, 2010.

JU, Z. Y.; HETTIARACHCHY, N. S.; RATH, N. Extraction, denaturation and hydrophobic properties of rice flour proteins. **Journal of food science**, v. 66, n. 2, p. 229-232, 2001.

JUNIOR, E. S.; *et al.* Natural variation of selenium in Brazil nuts and soils from the Amazon region. **Chemosphere**, 188, 650-658, 2017.

KAGAMI, Y. *et al.* Oxidative stability, structure, and physical characteristics of microcapsules formed by spray drying of fish oil with protein and dextrin wall materials. **Journal Food Science**. 68 (7), 2248–2255, 2013.

KARACA, A. C.; LOW, N.; NICKERSON, M. Encapsulation of flaxseed oil using a benchtop spray dryer for legume protein-maltodextrin microcapsule preparation. **J. Agric. Food Chemistry**. 61 (21), 5148–5155, 2013.

KARADENIZ, M.; SAHIN, S.; SUMNU, G. Enhancement of storage stability of wheat germ oil by encapsulation. **Industrial crops and products**, v. 114, p. 14-18, 2018.

KERRIHARD, A. L. *et al.* Oxidative stability of commodity fats and oils: modeling based on fatty acid composition. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 92, n. 8, p. 1153-1163, 2015.

KLINKESORN, U. *et al.* Characterization of spray-dried tuna oil emulsified in two-layered interfacial membranes prepared using electrostatic layer-by-layer deposition. **Food Research International**, 39, 449–457.2006.

LABUSCHAGNE, P. Impact of wall material physicochemical characteristics on the stability of encapsulated phytochemicals: A review. **Food research international**, v. 107, p. 227-247, 2018.

LASEKAN, J. B. *et al.* Growth, tolerance and biochemical measures in healthy infants fed a partially hydrolyzed rice protein-based formula: a randomized, blinded, prospective trial. **Journal of the American college of nutrition**, v. 25, n. 1, p. 12-19, 2006.

LE PRIOL, L. *et al.* Comparative study of plant protein extracts as wall materials for the improvement of the oxidative stability of sunflower oil by microencapsulation. **Food Hydrocolloids**, v. 95, p. 105-115, 2019.

LEAVER, H. A. *et al.* Antitumour and pro-apoptotic actions of highly unsaturated fatty acids in glioma. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids (PLEFA)**, v. 66, n. 1, p. 19-29, 2002.

LI, J. *et al.* The mathematical prediction model for the oxidative stability of vegetable oils by the main fatty acids composition and thermogravimetric analysis. **LWT**, v. 96, p. 51-57, 2018.

LIU, S. *et al.* Effect of pH on the functional behaviour of pea protein isolate–gum Arabic complexes. **Food Research International**, v. 43, n. 2, p. 489-495, 2010.

LUNA-GUEVARA, J. J. *et al.* Microencapsulation of walnut, peanut and pecan oils by spray drying. **Food structure**, v. 12, p. 26-32, 2017.

MACAN, T. P. **Efeitos do consumo da castanha-do-Brasil (*Bertholletia excelsa* HBK) na modulação do estresse oxidativo e instabilidade genômica em indivíduos com diabetes mellitus tipo 2.** Tese (Doutorado em Ciências da Saúde) 133p. Universidade do Extremo Sul Catarinense, Criciúma. 2017.

MACHADO, G. C.; CHAVES, J. B. P.; ANTONIASSI, R. Composição em ácidos graxos e caracterização física e química de óleos hidrogenados de coco babaçu. **Revista Ceres**, vol. 53, n.308, p. 463-470, agosto, 2006.

MADENE, A. *et al.* Flavour encapsulation and controlled release—a review. **International journal of food science & technology**, v. 41, n. 1, p. 1-21, 2006.

MALIK, M. A.; SAINI, C. S. Rheological and structural properties of protein isolates extracted from dephenolized sunflower meal: Effect of high intensity ultrasound. **Food Hydrocolloids**, v. 81, p. 229-241, 2018.

MALVERN INSTRUMENTS Ltd. **Technical information provided for the Zeta-sizer Nano.** 2014.

MAGZOUB, R. A. M. *et al.* Photocatalytic detoxification of aflatoxins in Sudanese peanut oil using immobilized titanium dioxide. **Food control**, v. 95, p. 206-214, 2019.

MARQUES, L. F. **Liofilização de Frutas Tropicais.** Tese (Doutorado em Engenharia Química) 135p. Universidade Federal de São Carlos, São Carlos-SP. 2008.

MARTINS, I. M. *et al.* Microencapsulation of essential oils with biodegradable polymeric carriers for cosmetic applications. **Chemical Engineering Journal**, v. 245, p. 191-200, 2014.

MASSI, F. P. *et al.* Brazil nuts are subject to infection with B and G aflatoxinproducing fungus, *Aspergillus pseudonomius*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 186, p. 14-21, 2014.

MENEZES, T. O. A. *et al.* Avaliação *in vitro* da atividade antifúngica de óleos essenciais e extratos de plantas presentes na região amazônica sobre cepa de *Candida albicans*. **Revista de Odontologia da UNESP**. V.38, p. 184-191, 2009.

METTA, F. I.; AYROSA, A. M.; PALETTA, F. C.; O papel da liofilização na conservação de alimentos pelo controle da umidade. **XII Safety, Health and Environment World Congress 2012**.

MOYSSIADI, T. *et al.* Effect of light transmittance and oxygen permeability of various packaging materials on keeping quality of low fat pasteurized milk: chemical and sensorial aspects. **International Dairy Journal**. vol.14 p.429-436, 2004.

MUJUMDAR, A. S. Dehydration of products of biological origin. **Science Publishers**, 2004.

MUJUMDAR, A. S.; ZHONGHUA, W. Thermal drying technologies-Cost-effective innovation aided by mathematical modeling approach. **Drying Technology**, v. 26, n. 1, p. 145-153, 2007.

NAZZARO, F. *et al.* Microencapsulation in food science and biotechnology. **Current opinion in biotechnology**, v. 23, n. 2, p. 182-186, 2012.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger: principios de bioquímica**. São Paulo: Sarvier, 2015.

NESTERENKO, A. *et al.* Influence of soy protein's structural modifications on their microencapsulation properties: α -Tocopherol microparticle preparation. **Food Research International**, v. 48, n. 2, p. 387-396, 2012.

NESTERENKO, A. *et al.* Vegetable proteins in microencapsulation: A review of recent interventions and their effectiveness. **Industrial crops and products**, v. 42, p. 469-479, 2013.

NETO, O. Z. S.; BATISTA, E. A. C.; DE ALMEIDA MEIRELLES, A. J. The employment of ethanol as solvent to extract Brazil nut oil. **Journal of cleaner production**, v. 180, p. 866-875, 2018.

NUNES, G. L. *et al.* Microencapsulation of freeze concentrated Ilex paraguariensis extract by spray drying. **Journal of Food Engineering**, 151,60–68, 2015.

O'BRIEN, R.D.; FARR, W.C.; WAN, P.J. **Introduction to fats and oils technology**. 2.ed. Champaign: AOCS Press, 2000.

ORDÓÑEZ, J. A. **Tecnologia de alimentos: Componentes dos alimentos e processos**. Porto Alegre: Artmed, v.1, p.294, 2005.

ORTIZ, S. E. *et al.* Production and properties of casein hydrolysate microencapsulated by spray drying with soybean protein isolate. **LWT-Food Science and Technology**, v. 42, n. 5, p. 919-923, 2009.

OSTROSKY, E. A. *et al.* Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 2, p. 301-307, 2008.

PACHECO, A. M., SCUSSEL, V. M. **Castanha-do-Brasil: da floresta tropical ao consumidor**. Florianópolis, Santa Catarina : Editograf, 173p., 2006.

PALOMER, X. *et al.* Palmitic and Oleic Acid: The Yin and Yang of Fatty Acids in Type 2 Diabetes Mellitus. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, 2017.

PARK, S. J. ; MEHRAD, B. Innate immunity to *Aspergillus* species. **Clinical microbiology reviews**, v. 22, n. 4, p. 535-551, 2009.

PAS. Programa Alimentos Seguros. 2004. **Manual de qualidade e segurança da Castanha do Brasil**. Brasília, DF: Campo PaS, 62 pp. (Série Qualidade e Segurança dos alimentos). 2004.

PAULO, F.; SANTOS, L. Design of experiments for microencapsulation applications: A review. **Materials Science and Engineering: C**, v. 77, p. 1327-1340, 2017.

PELLICER, J. A. et al. Stability of microencapsulated strawberry flavour by spray drying, freeze drying and fluid bed. **Powder technology**, v. 347, p. 179-185, 2019.

PENG, W. *et al.* Effects of heat treatment on the emulsifying properties of pea proteins. **Food Hydrocolloids**, v. 52, p. 301-310, 2016.

PINNAMANENI, S.; DAS, N. G.; DAS S. K. Comparison of oil-in-water emulsions manufactured by microfluidization and homogenization. **Die Pharmazie**, 58(8), 554–558, 2003.

POESTER, V. R. *et al.* Isolamento e identificação de fungos do gênero *Aspergillus* spp. de água utilizada na reabilitação de pinguins-de-magalhães. **Ciência Animal Brasileira**, v. 16, n. 4, p. 567-573, 2015.

QUEIROGA, V. *et al.* Brazil nut (*Bertholletia excelsa* H.B.K) seed kernel oil: characterization and thermal stability. **Revista de biologia e farmácia**, vol.3, n.1, p.33-42, 2009.

QUISPE-CONDORI, S. *et al.* Microencapsulation of flax oil with zein using spray and freeze drying. **LWT-Food Science and Technology**, v. 44, n. 9, p. 1880-1887, 2011.

QUITAIN, A. T. *et al.* Supercritical carbon dioxide extraction of fucoxanthin from *Undaria pinnatifida*. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 61, n. 24, p. 5792-5797, 2013.

RATTI, C. Hot air and freeze-drying of high-value foods: a review, **Journal of Food Engineering**, 49, pp. 311-319, 2001.

RAYMUNDO, A. *et al.* Fat mimetic capacity of *Chlorella vulgaris* biomass in oil-in-water food emulsions stabilized by pea protein. **Food Research International**, v. 38, n. 8-9, p. 961-965, 2005.

REBELLO, F. F. P. Microencapsulação de ingredientes alimentícios. **Revista Agrogeoambiental**, v. 1, n. 3, 2009.

RECHE, M. *et al.* The effect of a partially hydrolysed formula based on rice protein in the treatment of infants with cow's milk protein allergy. **Pediatric Allergy and Immunology**, v. 21, n. 4p1, p. 577-585, 2010.

REINECCIUS, G. A. The spray drying of food flavors. **Drying Technology**, London, v. 22, n. 6, p. 1289-1324, 2004.

REZENDE, *et al.* Microencapsulation of extracts of bioactive compounds obtained from acerola (*Malpighia emarginata* DC) pulp and residue by spray and freeze drying: Chemical, morphological and chemometric characterization. **Food chemistry**, v. 254, p. 281-291, 2018.

RIGHETTO, A. M. **Caracterização físico-química e estabilidade de suco de acerola verde microencapsulado por atomização e liofilização**. Tese (Doutorado em Ciência da Nutrição) 200p. Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas 2003.

ROCKWELL, C. A. *et al.* Nut production in *Bertholletia excelsa* across a logged forest mosaic: implications for multiple forest use. **PLoS one**, v. 10, n. 8, p. e0135464, 2015.

RODRIGUES, J. E. *et al.* Phase equilibrium measurements of Brazil nut (*Bertholletia excelsa*) oil in supercritical carbon dioxide. **The journal of super critical fluids**, v. 34, p. 223–229, novembro, 2005.

RUSLI, J. K.; SANGUANSRI, L.; AUGUSTIN, M. A. Stabilization of oils by microencapsulation with heated protein-glucose syrup mixtures. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 83, n. 11, p. 965-972, 2006.

SABLANI, S. S.; RAHMAN, M. S. Pore formation in selected foods as a function of shelf temperature during freeze drying. **Drying Technology**, v. 20, n. 7, p. 1379-1391, 2002.

SAIKIA, S.; MAHNOT, N. K.; MAHANTA, C. L. Optimisation of phenolic extraction from *Averrhoa carambola* pomace by response surface methodology and its microencapsulation by spray and freeze drying. **Food Chemistry**, v. 171, p. 144-152, 2015.

SALOMÃO, R. P. A castanheira: história natural e importância econômica. **Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi, Ciências Naturais**, 9(2), 259-266, 2014.

SANTO, E. F. *et al.* Comparison between freeze and spray drying to obtain powder *Rubrivivax gelatinosus* biomass. **Food Science and Technology**, v. 33, n. 1, p. 47-51, 2013.

SANTOS, A. B.; FERREIRA, V. P.; GROSSO, C. R. F. Microcápsulas: uma alternativa viável. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento, Brasília, ano**, v. 3, p. 26-30, 2000.

SANTOS, A. L. *et al.* Avaliação físico-química do óleo residual da castanha-do-brasil (*Bertholletia excelsa* HBK) e sua conversão em biodiesel. **Rev. Encicl. Bras**, v. 11, n. 22, p. 3550-3561, 2015.

SANTOS, O. V. *et al.* Chemical evaluation and thermal behavior of Brazil nut oil obtained by different extraction processes. **Food Research International**, v. 47, n. 2, p. 253-258, 2012.

SANTOS, O. V. *et al.* Yield, nutritional quality, and thermal-oxidative stability of Brazil nut oil (*Bertolletia excelsa* HBK) obtained by supercritical extraction. **Journal of Food Engineering**, v. 117, n. 4, p. 499-504, 2013.

SARIKA, P. R.; NIRMALA, R. J. Curcumin loaded gum Arabic aldehyde gelatin nanogels for breast cancer therapy. **Materials Science and Engineering C. Materials for Biological Applications**, Amsterdam, v. 65, p. 331–337, Aug. 2016.

SARKAR, S.; SINGHAL, R. S. Esterification of guar gum hydrolysate and gum Arabic with n-octenyl succinic anhydride and oleic acid and its evaluation as wall material in microencapsulation. **Carbohydrate Polymers**, v. 86, n. 4, p. 1723-1731, 2011.

SATTLER, S. E. *et al.* Vitamin E is essential for seed longevity and for preventing lipid peroxidation during germination. **The plant cell**, v. 16, n. 6, p. 1419-1432, 2004.

SCHONS, J. I. *et al.* Extração assistida por ultrassom e caracterização do óleo de castanha-do-Brasil. **Interciencia**, v. 42, n. 9, 2017.

SECOLIN, V.A. **Microencapsulação de compostos bioativos de *Camellia sinensis* em sistemas lipídicos por spray-drying**. Dissertação (Mestrado em Ciências) 113 p. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, 2014.

SILVA, A. M. M. **Estudo das propriedades funcionais de proteínas comerciais de origem vegetal: caracterização, estabilização de emulsões e aplicação em complexos coacervados**. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) 120 p. Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas, Campinas, São Paulo, 2019.

SHEPARD, G. H.; RAMIREZ, H. “Made in Brazil”: human dispersal of the Brazil nut (*Bertholletia excelsa*, Lecythidaceae) in ancient Amazonia. **Economic Botany**, v. 65, n. 1, p. 44-65, 2011.

SHIH, F. F. An update on the processing of high-protein rice products. **Food/Nahrung**, v. 47, n. 6, p. 420-424, 2003.

SILVA, K. C. **Microencapsulação de óleo de semente de uva por spray drying**. Trabalho de Conclusão de Curso 39p. Tecnologia de Alimentos, Universidade Tecnológica Federal do Para. 2018.

SILVA, M. C. **Avaliação da qualidade microbiológica de alimentos com a utilização de metodologias convencionais e do sistema simplate**. Dissertação (Mestrado em Ciências)

89p. Programa de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2002.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A. ; SILVEIRA, N. F.A. Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos. In: **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**. Varela, 2001.

SOUZA, M. L.; MENEZES, H. C. Processamentos de amêndoa e torta de Castanha-do-Brasil e farinha de mandioca: parâmetros de qualidade. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 24, n. 1, p. 120–128, 2004.

SOUZA, S. J. F. **Estudo da atividade de água em co-produtos da indústria de sucos: sementes de maracujá, casca de laranja e cascas de manga**. Tese (Doutorado em Ciências dos Alimentos) 86p. Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, 2015.

STOCKLER-PINTO, B. M. *et al.* Effect of selenium supplementation via Brazil nut (*Bertholletia excelsa*, HBK) on thyroid hormones levels in hemodialysis patients: a pilot study. **Nutricion hospitalaria**, v. 32, n. 4, 2015.

SUAVE, J. *et al.* Microencapsulação: Inovação em diferentes áreas. **Revista Saúde e Ambiente/Health and Environment Journal**, v. 7, n. 2, p. 12-20, 2006.

TANG, X. C.; PIKAL, M. J. Design of freeze-drying processes for pharmaceuticals: practical advice. **Pharmaceutical research**, v. 21, n. 2, p. 191-200, 2004.

TANSAZ, S. *et al.* Soy protein isolate/bioactive glass composite membranes: Processing and properties. **European Polymer Journal**, v. 106, p. 232-241, 2018.

TEXEIRA, A. S. **Adequação e apresentação de parâmetros de validação intralaboratorial de um ensaio para a quantificação de aflatoxinas em Castanha-do-Brasil (*Bertholletia excelsa* Bonpl.) através de cromatografia Líquida de Alta Eficiência**. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) 69p. Instituto de Tecnologia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 2008.

TONINI, H.; PEDROZO, C. A. Variações anuais na produção de frutos e sementes de Castanheira-do-Brasil (*Bertholletia excelsa* Bonpl., Lecythidaceae) em florestas nativas de Roraima. **Revista Árvore**, v. 38, n. 1, 2014.

TONON, R. V. *et al.* Microencapsulation of flaxseed oil by spray drying: Effect of oil load and type of wall material. **Drying Technology**, v. 30, n. 13, p. 1491-1501, 2012.

UMER, H. *et al.* Microencapsulation: Process, techniques and applications. **International journal of research in pharmaceutical and biomedical sciences**, v. 2, n. 2, p. 474-481, 2011.

VADIVEL, V; KUNYANGA, C.N; BIELSALKI, H.K. Health benefits of nut consumption with special reference to body weight control. **Nutrition**, vol 28, p.1089-1097, 2012.

VENKATACHALAM, M; SATHE, S. K. Chemical composition of selected edible nut seeds. **Journal of agricultural and food chemistry**, 54(13), 4705-4714, 2006.

VERRUCK, S.; PRUDENCIO, E. S.; DA SILVEIRA, S. M. Compostos bioativos com capacidade antioxidante e antimicrobiana em frutas. In: **Revista do Congresso Sul Brasileiro de Engenharia de Alimentos**. 2018.

VIEIRA, D. G. **Avaliação da estabilidade oxidativa de azeite de oliva extra virgem após adição de trans-resveratrol**. Rio de Janeiro: UFRJ, p. 96, 2008.

VONDERHEIDE, A. P. *et al.* Characterization of Selenium Species in Brazil Nuts by HPLC-ICP-MS and ES-MS. **Journal of agricultural and food chemistry**, vol.50, p.5722-5728, agosto, 2002.

WANDREY, C.; BARTKOWIAK, A.; HARDING S. E. Materials for Encapsulation. Encapsulation technologies for active food ingredients and foods processing. **Spring**, New York. 2010.

WESTPHALEN, *et al.* Encapsulação dos compostos bioativos do *Butia quaraimana* a partir da técnica de liofilização. **Blucher Chemical Engineering Proceedings**, v. 1, n. 3, p. 1986-1991, 2015.

WOLFE K. L., LIU R. H. Cellular Antioxidant Activity (CAA) Assay for Assessing Antioxidants, Foods and Dietary Supplements. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. Cornell University, Ithaca, New York, v. 55 , p. 8896-8907, 2007.

WU, X. S. Synthesis, characterization, biodegradation, and drug delivery application of biodegradable lactic/glycolic acid polymers: Part III. Drug delivery application. **Artificial cells, blood substitutes, and biotechnology**, v. 32, n. 4, p. 575-591, 2004.

WU, Y. *et al.* Emulsifying properties of water soluble yellow mustard mucilage: a comparative study with gum Arabic and citrus pectin. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v. 47, p. 191–196, 2015.

XIONG, T. *et al.* Identification and Quantification of Proteins at Adsorption Layer of Emulsion Stabilized by Pea Protein Isolates. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, 2018.

YANG, J.; XIAO, J. X.; DING, L. Z. An investigation into the application of konjac glucomannan as a flavor encapsulant. **European Food Research and Technology**, Berlin, v. 229, n. 3, p.467-474, 2009.

8.0 ANEXOS

8.1 Análise de variância para a caracterização da matéria-prima e das microcápsulas.

ANOVA para absorção dados percentuais de absorção de água					
<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ*</i>	<i>gl**</i>	<i>MQ***</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>
<i>Entre grupos</i>	77565,1	2	38782,5	1639,84	0,00000000609
<i>Dentro dos grupos</i>	141,901	6	23,6502		
<i>Total</i>	77707	8			

ANOVA para os dados percentuais de absorção de óleo					
<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ*</i>	<i>gl**</i>	<i>MQ***</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>
<i>Entre grupos</i>	1351,56	2	675,779	30,4277	0,000723
<i>Dentro dos grupos</i>	133,256	6	22,2094		
<i>Total</i>	1484,82	8			

ANOVA para o rendimento do processo de microencapsulação					
<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ*</i>	<i>gl**</i>	<i>MQ***</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>
<i>Entre grupos</i>	11,0822	2	5,54109	1,97377	0,219435
<i>Dentro dos grupos</i>	16,8442	6	2,80736		
<i>Total</i>	27,9264	8			

ANOVA para molhabilidade das microcápsulas					
<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ*</i>	<i>gl**</i>	<i>MQ***</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>
<i>Entre grupos</i>	185,398	2	92,699	228,216	0,00000218
<i>Dentro dos grupos</i>	2,43713	6	0,40619		
<i>Total</i>	187,835	8			

ANOVA para higroscopicidade das microcápsulas					
<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ*</i>	<i>gl**</i>	<i>MQ***</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>
<i>Entre grupos</i>	2492,85	2	1246,42	2515,2	0,00000000169
<i>Dentro dos grupos</i>	2,97333	6	0,49556		
<i>Total</i>	2495,82	8			

ANOVA para eficiência de encapsulação das microcápsulas					
<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ*</i>	<i>gl**</i>	<i>MQ***</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>
<i>Entre grupos</i>	91,678	2	45,839	20,228	0,002154
<i>Dentro dos grupos</i>	13,5967	6	2,26611		
<i>Total</i>	105,275	8			

8.2 Análise de variância para índice de peróxidos e acidez durante o armazenamento.

Índice de Peróxidos						Índice de Acidez					
Semana 0						Semana 0					
<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>	<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>
Entre grupos	0,01	3,00	0,00	0,10	0,96	Entre grupos	0,21	3,00	0,07	2,25	0,16
Dentro dos grupos	0,23	8,00	0,03			Dentro dos grupos	0,24	8,00	0,03		
Semana 1						Semana 1					
<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>	<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>
Entre grupos	4,31	3,00	1,44	26,11	0,00	Entre grupos	0,36	3,00	0,12	1,57	0,27
Dentro dos grupos	0,44	8,00	0,05			Dentro dos grupos	0,61	8,00	0,08		
Semana 2						Semana 2					
<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>	<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>
Entre grupos	8,11	3,00	2,70	23,47	0,00	Entre grupos	1,69	3,00	0,56	7,94	0,01
Dentro dos grupos	0,92	8,00	0,12			Dentro dos grupos	0,57	8,00	0,07		
Semana 3						Semana 3					
<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>	<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>
Entre grupos	33,15	3,00	11,05	140,90	0,00	Entre grupos	8,50	3,00	2,83	34,40	0,00
Dentro dos grupos	0,63	8,00	0,08			Dentro dos grupos	0,66	8,00	0,08		
Semana 4						Semana 4					
<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>	<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>
Entre grupos	32,52	3,00	10,84	48,39	0,00	Entre grupos	16,12	3,00	5,37	26,59	0,00
Dentro dos grupos	1,79	8,00	0,22			Dentro dos grupos	1,62	8,00	0,20		
Semana 5						Semana 5					
<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>	<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>
Entre grupos	24,75	3,00	8,25	92,99	0,00	Entre grupos	36,19	3,00	12,06	66,51	0,00
Dentro dos grupos	0,71	8,00	0,09			Dentro dos grupos	1,45	8,00	0,18		
Semana 6						Semana 6					
<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>	<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>
Entre grupos	45,56	3,00	15,19	91,30	0,00	Entre grupos	85,82	3,00	28,61	187,70	0,00
Dentro dos grupos	1,33	8,00	0,17			Dentro dos grupos	1,22	8,00	0,15		

8.3 Análise de variância para umidade e atividade de água durante o armazenamento.

Umidade						Atividade de Água					
Semana 0						Semana 0					
<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>	<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>
Entre grupos	0,29	2,00	0,14	36,51	0,00	Entre grupos	0,01	2,00	0,00	262,83	0,00
Dentro dos grupos	0,02	6,00	0,00			Dentro dos grupos	0,00	6,00	0,00		
Semana 1						Semana 1					
<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>	<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>
Entre grupos	0,28	2,00	0,14	32,11	0,00	Entre grupos	0,01	2,00	0,00	10,96	0,01
Dentro dos grupos	0,03	6,00	0,00			Dentro dos grupos	0,00	6,00	0,00		
Semana 2						Semana 2					
<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>	<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>
Entre grupos	0,29	2,00	0,15	43,78	0,00	Entre grupos	0,01	2,00	0,01	17,14	0,00
Dentro dos grupos	0,02	6,00	0,00			Dentro dos grupos	0,00	6,00	0,00		
Semana 3						Semana 3					
<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>	<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>
Entre grupos	3,98	2,00	1,99	28,29	0,00	Entre grupos	0,01	2,00	0,01	34,59	0,00
Dentro dos grupos	0,42	6,00	0,07			Dentro dos grupos	0,00	6,00	0,00		
Semana 4						Semana 4					
<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>	<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>
Entre grupos	6,24	2,00	3,12	213,89	0,00	Entre grupos	0,01	2,00	0,01	94,94	0,00
Dentro dos grupos	0,09	6,00	0,01			Dentro dos grupos	0,00	6,00	0,00		
Semana 5						Semana 5					
<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>	<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>
Entre grupos	7,91	2,00	3,96	97,96	0,00	Entre grupos	0,01	2,00	0,01	125,60	0,00
Dentro dos grupos	0,24	6,00	0,04			Dentro dos grupos	0,00	6,00	0,00		
Semana 6						Semana 6					
<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>	<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>
Entre grupos	1,11	2,00	0,56	9,61	0,01	Entre grupos	0,01	2,00	0,01	14,69	0,00
Dentro dos grupos	0,35	6,00	0,06			Dentro dos grupos	0,00	6,00	0,00		

8.4 Análise de variância para avaliação microbiológica água durante o armazenamento.

Mesófilos					
Semana 1					
<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>
Entre grupos	631025,00	3,00	210341,67	1577,56	0,00
Dentro dos grupos	1066,67	8,00	133,33		
Semana 3					
<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>
Entre grupos	3802691,7	3,0	1267563,9	375,6	0,0
Dentro dos grupos	27000,0	8,0	3375,0		
Semana 6					
<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>
Entre grupos	2E+10	3E+00	8E+09	1E+03	1E-10
Dentro dos grupos	6E+07	8E+00	8E+06		
Bolores					
Semana 3					
<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>
Entre grupos	87558,33	3,00	29186,11	318,39	0,00
Dentro dos grupos	733,33	8,00	91,67		
Semana 6					
<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>
Entre grupos	13901500,00	3,00	4633833,33	4877,72	0,00
Dentro dos grupos	7600,00	8,00	950,00		
Bolores					
Semana 1					
<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>
Entre grupos	446039,58	3,00	148679,86	2523,56	0,00
Dentro dos grupos	471,33	8,00	58,92		
Semana 3					
<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>
Entre grupos	118023866,67	3,00	39341288,89	6584,32	0,00
Dentro dos grupos	47800,00	8,00	5975,00		
Semana 6					
<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>
Entre grupos	180917691,67	3,00	60305897,22	2489,41	0,00
Dentro dos grupos	193800,00	8,00	24225,00		