

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

*FILMES DE ZEÍNA E ÓLEOS ESSENCIAIS PARA
REVESTIMENTO E CONSERVAÇÃO
DE CASTANHA-DO-BRASIL*

Izabel Cristina Gibelli

São Carlos / SP
2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

*FILMES DE ZEÍNA E ÓLEOS ESSENCIAIS PARA
REVESTIMENTO E CONSERVAÇÃO
DE CASTANHA-DO-BRASIL*

Izabel Cristina Gibelli

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de São Carlos como parte dos requisitos à obtenção do título de Doutor em Biotecnologia, área de concentração em Pesquisa e Desenvolvimento.

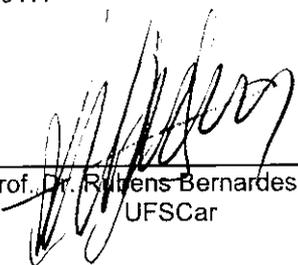
Orientadores: Prof. Dr. Rubens Bernardes Filho
Prof. Dr. Clovis Wesley Oliveira de Souza

São Carlos / SP
2017

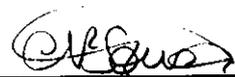


Folha de Aprovação

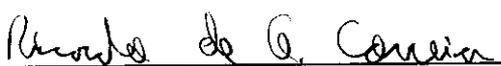
Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Tese de Doutorado do candidato Izabel Cristina Gibelli, realizada em 30/06/2017:



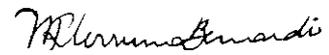
Prof. Dr. Ruyens Bernardes Filho
UFSCar



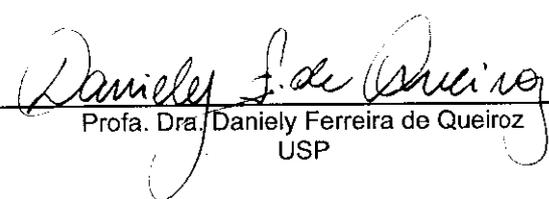
Profa. Dra. Cristina Paiva de Sousa
UFSCar



Prof. Dr. Ricardo de Oliveira Correia
USP



Profa. Dra. Marta Regina Verruma Bernardi
UFSCar



Profa. Dra. Daniely Ferreira de Queiroz
USP

Dedico essa tese a minhas irmãs que se esforçaram ao máximo para o meu desenvolvimento e formação, apoiaram e incentivaram incondicionalmente. Em especial minha mãe que sempre com seu amor e olhar de fé me amparou e incentivou nos momentos de dificuldade. Ao meu pai (*in memórian*), vivo em meu coração, dedico mais essa conquista.

Amo vocês.

Obrigada!

AGRADECIMENTOS

- A Deus pela proteção e sabedoria necessária para trilhar meus caminhos. Por ter abençoado todos os dias da minha vida e me dar forças para seguir sempre em frente.
- A minha família pelo amor, compreensão e apoio. Obrigada por proporcionarem a oportunidade de estudar e conseguir alcançar esse objetivo.
- Agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia (PPGBiotec) da Universidade Federal de São Carlos pelo apoio institucional, que proporcionou meu aprendizado.
 - Ao Conselho Nacional de Pesquisa - CNPq - que me concedeu uma bolsa, durante a realização deste doutorado, fato este que muito contribuiu para a viabilização desta tese.
- Aos orientadores Prof. Dr. Clovis Wesley Oliveira de Souza (Departamento de Morfologia e Patologia – UFSCar) por ter aceito me orientar novamente. Obrigada pela oportunidade de tê-lo como orientador de Mestrado e Doutorado e ao Prof. Dr. Rubens Bernardes Filho (Embrapa Instrumentação- São Carlos). Tenho muito orgulho de citá-los como uns dos responsáveis pela minha formação profissional. Agradeço aos orientadores pela confiança, pela amizade, conselhos e paciência. Os senhores são exemplo de simplicidade, compreensão e competência. Agradeço a dedicação, a orientação e o amor ao trabalho, a pesquisa. MUITÍSSIMO obrigada!!! E que eu possa sempre contar com o privilégio de suas amizades.
- A Embrapa Instrumentação e ao departamento de morfologia e patologia da UFSCar, pela disponibilidade dos laboratórios e da infraestrutura utilizadas, para execução do trabalho experimental.
- As técnicas dos laboratórios da Embrapa, Viviane, Silviane e Joana pela ajuda e eficiência na realização dos experimentos.
- Aos funcionários e funcionárias do Departamento de Morfologia e Patologia da UFSCar, em especial a Zélia Venésio, pela colaboração na realização dos trabalhos práticos.
- A Profa. Dra. Marta Verruma Bernardes pela parceria de fundamental importância. Meus sinceros agradecimentos pelo apoio as análises sensoriais, pela atenção, dedicação e discussões dos resultados.

- Ao Prof. Dr. Stanislau Bogusz Junior e sua equipe pela colaboração em realizar as análises por Cromatografia gasosa.
- A estagiária Juliana pelo precioso auxílio na execução das atividades laboratoriais. Obrigada pelos incentivos e por compartilhar seus conhecimentos em química.
- Às demais pessoas que contribuíram direta ou indiretamente na elaboração deste trabalho ou participaram da minha vida, e que, por ventura, eu tenha me esquecido de agradecer

“Do mesmo modo que o metal enferruja com a ociosidade e a água parada perde sua pureza, assim a inércia esgota a energia da mente.”
Leonardo da Vinci

RESUMO

O Brasil é um grande produtor de castanha-do-brasil e os ácidos graxos presentes podem ser oxidados através de fatores naturais e espontâneos causando a deterioração do alimento e uma considerável modificação no sabor e aroma, caracteristicamente conhecido como rancificação. Além disso, esse produto é suscetível à colonização por fungos produtores de aflatoxinas. Na saúde podem causar intoxicações e para a economia agrícola provocam grandes perdas em milhões de dólares anuais. Uma alternativa é o uso de revestimento comestível que atua como barreira seletiva contra os fatores determinantes da oxidação e consequentemente evita a produção de aromas e sabores indesejáveis. O objetivo dessa pesquisa foi produzir revestimentos composto por zeína, proteína do milho, e óleos essenciais (OE) de cravo botão, melaleuca e pimenta rosa com aplicação direta na castanha buscando obter filmes hidrofóbicos. Para a caracterização do material foi realizado a medida de ângulo de contato e microscopia de força atômica (MFA). Foi avaliada a aceitação das castanhas revestidas através da análise sensorial. Após aceleração térmica em estufa a 50°C durante 14, 21 e 28 dias o óleo foi extraído e caracterizado por cromatografia gasosa (CG) e o estudo da oxidação lipídica por ressonância magnética nuclear (RMN de ^1H). Também foi avaliado a ação antifúngica dos óleos essenciais nas concentrações 0,5, 1 e 1,5%. Os resultados para a medida de ângulo de contato e as imagens por MFA foram condizentes, mostraram que a capacidade de absorção de água diminui com o aumento da concentração do óleo de cravo, ou seja, o filme contendo óleo de cravo é mais hidrofóbico com concentrações maiores do OE, por outro lado, o filme contendo OE de melaleuca é mais hidrofóbico em menores concentrações. A análise sensorial mostrou que as castanhas revestidas com o material foram bem aceitas pelos avaliadores. A CG mostrou as variações dos ácidos graxos comprovando a ação oxidativa. As integrações dos picos de RMN mostraram que o revestimento contendo pimenta rosa e melaleuca foram eficazes retardando o processo de oxidação. Quanto a ação antifúngica o óleo de cravo tem ação fungicida e o óleo de pimenta rosa e melaleuca tem ação fungistática para *Aspergillus flavus*.

Palavras-chave: revestimento comestível; biopolímeros; análises sensoriais.

ABSTRACT

Brazil is a major producer of brazil nuts and the fatty acids present can be oxidized through natural and spontaneous factors causing spoilage of the food and a considerable modification in taste and aroma, characteristically known as rancification. In addition, this product is susceptible to colonization by aflatoxin-producing fungi. In health they can cause intoxications and for the agricultural economy they cause great losses in millions of annual dollars. An alternative is the use of edible coating that acts as a selective barrier against the oxidation determining factors and consequently avoids the production of undesirable flavors and flavors. The objective of this research was to produce coatings composed of zein, corn protein, and essential oils (OE) of clove bud, melaleuca and pink pepper with direct application to the chestnut looking for hydrophobic films. For the characterization of the material was carried out the measurement of contact angle and atomic force microscopy (MFA). The acceptance of the coated nuts was evaluated through sensorial analysis. After thermal acceleration in the oven at 50 ° C for 14, 21 and 28 days the oil was extracted and characterized by gas chromatography (GC) and lipid oxidation by nuclear magnetic resonance (^1H NMR). The antifungal action of essential oils in 0.5, 1 and 1.5% concentrations was also evaluated. The results for the contact angle measurement and the MFA images were consistent, showing that the water absorption capacity decreases with the increase of the clove oil concentration, that is, the film containing clove oil is more hydrophobic with concentrations Higher OE, on the other hand, the film containing OE of melaleuca is more hydrophobic at lower concentrations. The sensorial analysis showed that the nuts coated with the material were well accepted by the evaluators. GC showed variations of fatty acids proving oxidative action. Integrations of the NMR peaks showed that the coating containing pink pepper and melaleuca were effective in retarding the oxidation process. As for the antifungal action the clove oil has a fungicide action and the oil of pink pepper and melaleuca has fungistatic action for *Aspergillus flavus*.

Keywords: edible coating; biopolymers; sensory analysis.

Sumário

1- Introdução.....	1
2-Revisão Bibliográfica	3
2.1-Castanha-do-brasil.....	3
2.2-Contaminação Fúngica em Castanhas-do-brasil.....	5
2.3-Composição do Óleo da Castanha-do-brasil	6
2.4-Oxidação Lipídica	8
2.5-Revestimento Comestível Composto por Zeína e Óleos Essenciais	11
2.5.1-Óleos Essenciais.....	14
2.5.2-Óleo Essencial de Melaleuca	15
2.5.3-Óleo Essencial de Pimenta Rosa.....	16
2.5.4-Óleo Essencial de Cravo	17
2.6-Análise Sensorial	18
2.7-Técnicas Usadas para Caracterização do Material.....	19
2.7.1-Medida de Ângulo de Contato.....	19
2.7.2-Microscopia de Força Atômica (MFA)	20
2.8-Cromatografia Gasosa (CG) para Análise de Ácidos Graxos.....	22
2.8.1-Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) para Avaliação da Oxidação Lipídica	23
3-Objetivos Gerais.....	25
3.1-Objetivos Específicos	25
4-Materiais e Métodos	26
4.1-Matéria-prima	26
4.2-Preparo da Zeína.....	26
4.3-Preparo das Soluções Composta por Zeína e Óleos Essenciais..	26
4.4-Produção dos Corpos de Prova	26
4.5-Técnicas para Caracterização dos Filmes	27
4.5.1-Medida de Ângulo de Contato.....	27
4.5.2-Microscopia de Força Atômica.....	27
4.6-Revestimento das Castanhas para Oxidação Acelerada em Estufa e Análise Sensorial.....	27
4.6.1-Oxidação Acelerada em Estufa	28
4.6.2-Análise Sensorial.....	28
4.7-Extração do Óleo das Castanhas-do-brasil.....	30
4.8-Testes Realizados com o Óleo Extraído.....	30
4.8.1-Análise de Ácidos Graxos em Óleo da Castanha-do-brasil.....	30
4.8.2-Avaliação da Oxidação Lipídica.....	31
4.9-Ação Antifúngica dos Óleos Essenciais.....	31
5-Resultados e Discussões	33
5.1-Corpos de Prova.....	33
5.2-Medida de Ângulo de Contato.....	34
5.3-Microscopia de Força Atômica (MFA).	38

5.4-Análise Sensorial	40
5.5-Análise de Ácidos Graxos em Óleo de Castanha-do-brasil	43
5.6-Estudo da Oxidação Lipídica por RMN de ¹ H	44
5.6.1-Análise dos Óleos Pré-oxidação	44
5.6.2-Análise dos Óleos após Tratamento Térmico em Estufa	46
5.7-Ação Antifúngica dos Óleos Essências.....	51
6-Conclusões.....	53
7-Perspectivas Futuras.....	54
8-Referências Bibliográficas	55

1 INTRODUÇÃO

O Brasil produz em torno de 40mil toneladas por ano de castanha-do-brasil. Sua produção está concentrada na região norte do país, sendo os maiores produtores os estados do Acre, Amazonas, Pará, Rondônia, Amapá e Roraima. Muito apreciada pelo seu sabor, é considerada uma das riquezas do Brasil, principalmente por ser um alimento fonte de nutrientes como ácidos graxos e selênio. A maior parte da castanha colhida no Brasil destina-se ao consumo in natura, com um grande potencial promissor para a indústria de alimentos (Ferreira *et al.*, 2006; IBGE, 2017).

A castanha-do-brasil (*Bertholletia excelsa H. B. K.*) é constituída por 60 a 70% de lipídios e de 15 a 20% de proteína, além de vitaminas e minerais (FREITAS *et al.*, 2007).

Devido ao processo de coleta, pode haver uma contaminação dessas castanhas por fungos, uma vez que os ouriços são normalmente coletados do chão da floresta. Um dos fungos mais comuns, o *Aspergillus flavus* que produz aflatoxinas, quando ingeridas podem causar efeitos adversos a saúde. A atmosfera amazônica, quente e húmida, favorece a propagação desses fungos, além disso, as condições do extrativismo, transporte e armazenamento inadequados também são fatores contribuintes para contaminação/produção de fungos toxigênicos (SILVA & VENÂNCIO, 2011; PIMENTEL *et al.*, 2010).

Outro foco preocupante é a oxidação dos lipídios presente nas castanhas. Um fenômeno espontâneo que causa deterioração do alimento e uma considerável modificação no sabor e odor, caracteristicamente conhecido como rancificação. Tal efeito provoca perda de qualidade do produto e rejeição por parte dos consumidores (SILVA *et al.*, 1999). Vários fatores são responsáveis por esse processo como: temperatura, tempo de armazenamento, luz e principalmente exposição ao oxigênio, fatores os quais sendo controlados retardam o processo oxidativo.

Uma proposta para diminuir a taxa de rancificação é o uso de revestimentos comestíveis. Esses revestimentos apresentam grandes vantagens frente aos filmes sintéticos, exemplo, a biodegradabilidade, biocompatibilidade, menor impacto ambiental e principalmente por serem atóxicos, principal característica observada pelos consumidores, visto que, a satisfação dos clientes está cada vez mais

relacionada a alimentos que consideram saudáveis e livres de aditivos químicos (BOURTTOM *et al.*, 2006; CAMPOS *et al.*, 2011).

Uma alternativa apresentada por Sánchez-González *et al.* (2011) é o uso de recursos naturais, produtos vegetais que possuem propriedades funcionais adicionais, exemplo os óleos essenciais, compostos naturais que têm sido extensamente estudados.

Nesta tese utilizamos revestimentos filmogênico composto por zeínas (proteínas de reserva do milho) e óleos essenciais que podem ser diretamente aplicada à superfície da castanha e que, devido às sua propriedade filmogênica formam uma película que atua como barreira contra a humidade e a passagem de gases. (SILVA *et al.*, 1999; COLZATO *et al.*, 2011).

Alguns óleos essenciais possuem componentes com propriedades antimicrobianas (CAMPOS *et al.*, 2011), que adicionados as embalagens podem retardar ou impedir o crescimento de microrganismos presentes nos alimentos, resultando em uma vida de prateleira maior sem oferecer risco a saúde dos consumidores (QUINTAVALLA & VICINI, 2002).

Esses óleos possuem ação antifúngicas, antibacterianas e antioxidantes; são provenientes de flores, brotos, sementes, folhas, galhos, cascas, ervas, madeira, frutas e raízes, sendo obtidos por destilação a vapor, cujo método é o mais comumente utilizado (CAMPOS *et al.*, 2011; SÁNCHEZ-GONZÁLEZ *et al.*, 2011).

Por consequência dos valores expostos, esse trabalho é de suma importância visto que, teve como objetivo desenvolver um filme comestível composto por zeína com adição de óleos essenciais para revestimento de castanhas-do-brasil, com a finalidade de bloquear a ação oxidativa do ar e inibir ou retardar o crescimento de *Aspergillus flavus*.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Castanha-do-brasil

A Floresta Amazônica dispõe da mais notável e diversificada fonte de produtos naturais do planeta, dentre elas a castanheira. (ARRUS *et al.*, 2005).

A classificação botânica partiu do barão Humbolt e de seu amigo Aimé Bonpland, que contaram com a colaboração de outro botânico, o alemão Carl Sigmund Kunth, juntos decidiram homenagear o químico francês Claude-Louis Berthollet. Desses pesquisadores viria o nome científico da castanheira, uma planta pertencente à família *Lecythydaceae*, gênero *Bertholletia* e espécie *excelsa*, acrescentando-se os sobrenomes dos três pesquisadores Humboldt, Bonpland e Kunth abreviados, sendo assim: *Bertholletia excelsa* H. B. K. (ALMEIDA, 2015)

A castanheira, árvore de grande porte (figura 1), pode atingir até 50 metros de altura e 2 metros de diâmetro de base. As folhas possuem de 25 a 35 centímetros de comprimento e coloração verde-escura brilhante.



Figura 1. Porte arbóreo da *Bertholletia excelsa*. Fonte: Camargo (2010).

O fruto da castanheira, chamado de ouriço (figura 2), possui uma casca bastante dura, pesa até 1,5kg e contém entre 15 a 25 sementes (amêndoas). Esta parte comestível do fruto é conhecida comumente como castanha-do-pará ou castanha-do-brasil (FREITAS *et al.*, 2007; SILVA & VENÂNCIO, 2011).

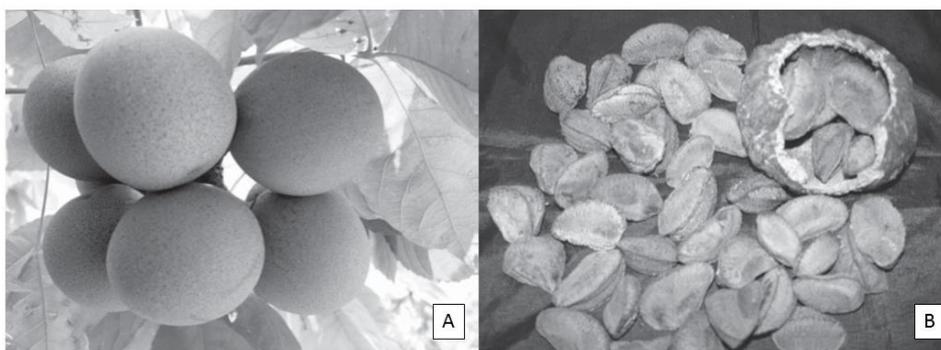


Figura 2. Foto A: Ouriço, Foto B: Ouriço com as castanhas. Fonte: (Freitas *et al.*, 2007).

O início da floração ocorre, na maioria das espécies, de Outubro a Dezembro e a frutificação varia de acordo com a região de Janeiro a Março (CAMARGO, 2010).

Após remoção dos ouriços, as castanhas são submetidas à lavagem e triagem, com o objetivo de remover aquelas visivelmente deterioradas e atrofiadas, passando por um processo de secagem e por final armazenamento em depósito até a comercialização (BAQUIÃO *et al.*, 2012).

Essa oleaginosa possui elevado valor energético, rica em proteínas e principalmente alto percentual de selênio, um antioxidante natural muito citado na prevenção de doenças cardiovasculares, câncer entre outras patologias (SANTOS, 2012).

Stockler-Pinto *et al.* (2014) através de seus resultados concluíram que a castanha-do-brasil como fonte de selênio desempenha um papel importante como agente anti-inflamatório e antioxidante.

Entretanto, o comércio da castanha pode ser afetado pela contaminação por fungos produtores de toxinas, uma vez que a região Amazônica apresenta condições propícias para o crescimento como temperatura e umidade elevada (ARRUS, 2005).

2.2 Contaminação Fúngica em Castanhas-do-brasil

A contaminação de castanhas-do-brasil teve seu primeiro relato em 1921 por Spencer, que descreveu a perda entre 10 e 25% das castanhas-do-brasil exportadas da Amazônia para os EUA. Identificou-se que a perda pós-colheita foi ocasionada pela contaminação fúngica (SILVA & VENÂNCIO, 2011).

As fases de desenvolvimento fúngico podem ocorrer desde fases no campo, durante a formação das sementes, na colheita, na secagem, no armazenamento e ainda no manuseio e transporte até o consumidor (BAQUIÃO, 2012a).

A castanha é suscetível à contaminação por diferentes microrganismos, onde o solo é o principal reservatório primário de muitos fungos, inclusive os do gênero *Aspergillus* (BAQUIÃO, 2012a). Este gênero é de grande preocupação, pois alguns são produtores de aflatoxinas (AF). Há mais de 300 tipos de micotoxinas, porém as AF são as mais estudadas devido ao seu potencial tóxico (KLICH, 2009; CALDERARI *et al.*, 2013).

As micotoxinas são metabolitos secundários tóxicos produzidos por fungos filamentosos que causam grandes impactos na saúde pública; são tóxicas para os humanos e animais em baixas concentrações. Além disso, na economia agrícola são responsáveis por milhões de dólares em perdas anuais, pois lotes de alimentos contaminados são sistematicamente rejeitados por países importadores ((BENNET & KLICH, 2003; ZOLLNER *et al.*, 2006; BAQUIÃO, 2012a).

As aflatoxinas mais comumente produzidas são aflatoxinas B1 (AFB1) e B2 (AFB2), G1 (AFG1) e G2 (AFG2). AFB1 é particularmente importante, pois é o composto natural hepatocarcinogênico mais tóxico e potente que já foi caracterizado, sendo classificado como carcinogênico humano do grupo 1 pela Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (SILVA & VENÂNCIO, 2011; BAQUIÃO, 2012a).

As Aflatoxinas Totais (AFT) referem-se à soma dos quatro compostos citados anteriormente. A ingestão do alimento contaminado por AF pode causar efeitos adversos à saúde, por exemplo, aumentar o risco de câncer de pulmão e fígado e afetar o sistema imunológico, elevando o risco de infecções (SILVA & VENÂNCIO, 2011).

As principais espécies de fungos relacionadas com a produção de micotoxinas são *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus* e *Aspergillus nomius*

(BAQUIÃO, 2012a). A literatura retrata que o *Aspergillus flavus* é o fungo predominantemente isolado nas amostras de castanha-do-brasil (FREIRE *et al.*, 2000). Reis *et al.*, (2014) estudaram a prevalência de *Aspergillus* sp em castanha-do-brasil e os resultados mostraram que o *Aspergillus flavus* foi a principal espécie encontradas (74,4%).

A pesquisa realizada por Taniwaki *et al.*, (2017) analisaram a biodiversidade micobiótica em 172 amostras de castanha-do-brasil e mostraram em seus resultados que a aflatoxina B foi encontrada em 38% de isolados de *A. flavus*.

Pacheco *et al.*, (2010) avaliaram a presença de fungos aflatoxigênicos e aflatoxina em amostras de castanha-do-brasil e concluíram que todas as cepas de *A. flavus* são aflatoxigênicas, sendo necessário um controle efetivo para a segurança alimentar na produção de castanha-do-brasil.

2.3 Composição do Óleo da Castanha-do-brasil

A castanha é composta por 60-70% de gordura, expressivamente de ácidos graxos, os quais são apresentados na Tabela 1 cujo levantamento bibliográfico mostra os valores em porcentagem para os ácidos graxos encontrados no óleo de castanha-do-brasil (MARTINS, 2014).

O óleo da castanha também é composto por 15-20% de proteína de boa qualidade biológica, vitaminas lipossolúveis (A, E), selênio (Se), magnésio (Mg), fósforo (P), cálcio (Ca), ferro (Fe), potássio (K), zinco (Zn) e cobre (Cu). O óleo à temperatura ambiente é fluido com coloração amarelo claro, com aroma e sabor agradáveis característicos da castanha (MUNIZ *et al.*, 2015).

Tabela 1. Composição percentual dos principais ácidos graxos presentes no óleo bruto da Castanha-do-brasil.

COMPONENTES	Gonçalves <i>et al.</i> , (2002)	Ryan <i>et al.</i> , (2006)	Venkata chalam & Sathe (2006)	Freitas <i>et al.</i> , (2007)	Chunhieng (2008)	Yang (2009)	Silva <i>et al.</i> , (2010)	Santos <i>et al.</i> , (2012)
Ácido palmítico (C16)	13,15	13,5	-	16,38	13	13,5	13,33	14,24
Ácido esteárico (C18)	10,36	11,77	9,51	10,84	11	11,77	10,78	11,19
Ácido oleico C18:1, (ω-9)	37,42	29,09	28,75	26,98	39,3	29,09	36,21	36,26
Ácido linoleico (C18:2, ω-6)	37,75	42,8	45,43	45,01	36,1	42,8	38,28	37,53
Ácido linolênico (C18:3, ω-3)	-	0,20	0,18	-	-	0,20	-	0,076

Fonte: adaptado Martins (2014).

Os ácidos graxos ocorrem na natureza como substâncias livres e esterificadas com o glicerol, normalmente formando triglicerídeos; componentes dos óleos e gorduras comestíveis (VIANNI & BRAZ-FILHO, 1996), ou seja, os óleos vegetais são constituídos predominantemente por triacilgliceróis, quimicamente são ésteres formados a partir do glicerol e ácidos graxos e sua estrutura química pode ser observado na figura 3 (RINALDI *et al.*, 2007; COLZATO *et al.*, 2008).

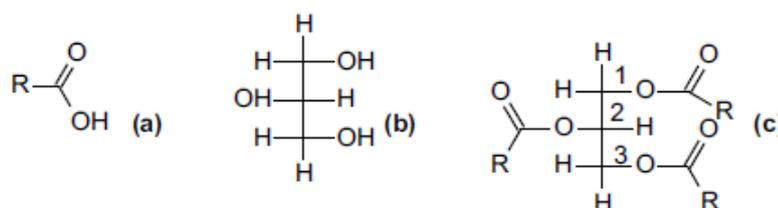


Figura 3. (a) ácido graxo, (b) glicerol e (c) triglicerídeo, onde R é a cadeia hidrocarbônica com número de carbonos e de insaturações diferentes para cada ácido graxo. A posição 1, 2 e 3 refere-se à cada ácido graxo no triglicerídeo. Fonte: (Colzato *et al.*, 2008)

Os ácidos graxos podem ser classificados de acordo com o tamanho da cadeia carbônica e por sua saturação ou insaturação, ou seja, são caracterizados pelo número de ligações existentes entre os átomos de carbono. Quanto ao tamanho da cadeia carbônica, esses podem ser classificados em ácidos graxos de cadeia curta (de 2 a 4 átomos de carbono), cadeia média (de 6 a 10 átomos de carbono) e cadeia longa (acima de 12 átomos de carbono). Em relação a presença de ligações simples ou duplas, os ácidos graxos são classificados em ácidos graxos

saturados (sem dupla ligação na molécula), mono-insaturados (uma dupla ligação na molécula) ou poli-insaturados (duas ou mais duplas ligações na molécula) (RAPOSO, 2010).

Para a classificação dos ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa é utilizada a localização da primeira insaturação a partir da metila terminal e assim recebe a nomenclatura ômega (ω). O ácido esteárico não apresenta dupla ligação, o ácido linoleico possui a primeira dupla ligação no 6º carbono da cadeia, sendo por isso, o precursor da família $\omega 6$; o ácido linolênico tem a primeira dupla ligação no 3º carbono da cadeia, sendo o precursor da família $\omega 3$ (TSUKAMOTO & TAKAHASHI, 2016).

Portanto, os ácidos graxos poli-insaturados compõem famílias ω -9, ω -6 e ω -3, representadas pelos ácidos oleico, linoleico e linolênico, respectivamente (PERINI *et al.*, 2010).

Outro exemplo de nomenclatura pode ser escrito o número de átomos de carbono seguido de dois pontos e do número de duplas ligações presentes na molécula. Em seguida identifica-se a posição da primeira dupla ligação pela letra grega ômega. Temos como exemplo o ácido graxo oleico C18:1 ω -9 (VIANNI & BRAZ-FILHO, 1996).

As funções mais importantes dos ácidos graxos são manter a integridade das células endoteliais, prevenir aterosclerose e alterações cardiovasculares; estimular a liberação de insulina; inibir a vasoconstrição, ajuda na coagulação sanguínea, participa no desenvolvimento normal da placenta, crescimento fetal e desenvolvimento dos neurônios (ANDRADE & CARMO, 2006).

Alimentos contendo ácidos graxos insaturados podem sofrer por exposição prolongada ao ar devido a presença de oxigênio, ocorrendo a oxidação nas ligações duplas. Visto que, quanto maior o número de duplas ligações mais susceptível é o óleo a degradação oxidativa (SILVA *et al.*, 1999).

2.4 Oxidação Lipídica

A oxidação é responsável pela deterioração dos alimentos e resulta em alterações indesejáveis de cor, sabor e aroma de ranço e também a consistência do alimento, tornando-o impróprio para o consumo (WAŚOWICZ *et al.*, 2004; HINNEBURG, DORMAN & HILTUNEN, 2006).

Este fenômeno inevitável e espontâneo envolve uma série de reações químicas e pode ocorrer por diferentes processos, em função do meio e dos agentes catalisadores como a hidrólise, oxidação não enzimática (foto-oxidação e auto-oxidação) e oxidação enzimática, sendo a presença de oxigênio o fator primordial para a reação de oxidação lipídica nos alimentos (SILVA *et al.*, 1999; MERRILL *et al.*, 2008).

Na reação hidrolítica ocorre a quebra dos triglicerídeos dos lipídios com a subsequente produção de ácidos graxos livres, ou seja, essas reações envolvem a quebra dos ésteres das moléculas dos triglicerídios e são catalisadas pelas lípases em presença de água e temperatura elevada, resultando na formação diglicerídios, monoglicerídios e ácidos graxos livres e glicerol (BARRERA-ARELLANO, 1998).

Quando a luz e um agente fotosensibilizador, como a clorofila, estão presentes, a ativação do oxigênio em oxigênio singlete pode desempenhar um papel importante na indução da deterioração oxidativa. Alternativamente, os metais, incluindo ferro ou cobre, ou a enzima lipoxigenase, podem atuar no processo pelo qual a deterioração oxidativa é iniciada (FERRARI, 1998; RAMALHO & JORGE, 2006).

A reação espontânea do oxigênio atmosférico com os ácidos graxos é conhecida como auto-oxidação. Ela representa o principal mecanismo de oxidação de lipídios e prossegue por um mecanismo de radicais livres em cadeia, sendo favorecido por temperaturas elevadas. É constituída por três fases principais; a iniciação, propagação e terminação (WAŚOWICZ *et al.*, 2004; RAMALHO & JORGE, 2006).

Segundo Fogaça & Sant'ana (2009), os radicais livres são espécies químicas que apresentam um ou mais elétrons desemparelhados no seu último orbital, o que os tornam altamente reativos e podem alterar a estrutura e a função de componentes celulares e extracelulares (BLOMHOFFI *et al.*, 2006).

Sendo assim, na auto-oxidação o átomo de hidrogênio adjacente a dupla ligação é retirado do ácido graxo (pela exposição à luz, calor ou íons metálicos), formando o radical livre que combina com o oxigênio molecular e forma o radical peróxido (ROO*), que retira um átomo de hidrogênio de outro ácido graxo insaturado formando um hidroperóxido (ROOH) e outro radical livre (propagação) (LADIKOS; LOUGOVOIS, 1990; SILVA *et al.*, 1999).

Uma vez iniciada, a reação segue em cadeia e somente termina quando estiverem esgotadas as reservas de ácidos graxos insaturados e oxigênio. Em outras palavras, este processo chega ao fim com o aparecimento dos produtos secundários de oxidação, obtidos por cisão e rearranjo dos peróxidos (epóxidos, compostos voláteis e não voláteis) (LADIKOS; LOUGOVOIS, 1990; FERRARI, 1998; SILVA *et al.*, 1999).

Uma rota alternativa levando à formação de hidroperóxidos, ao invés dos mecanismos de radicais livres, é através da foto-oxidação. Desencadeado essencialmente pela radiação ultravioleta em presença de moléculas fotosensibilizadoras, tais como a clorofila, que promovem a transformação de oxigênio triplete ($3O_2$) em oxigênio singlete (O_2), sua forma mais reativa. O oxigênio singlete reage diretamente com a dupla ligação formando hidroperóxidos, que por degradação posterior originam aldeídos, álcoois e hidrocarbonetos (SILVA *et al.*, 1999; RAMALHO & JORGE, 2006).

A oxidação por via enzimática ocorre através das enzimas lipoxigenases que catalisam a adição de oxigênio à cadeia de hidrocarboneto poli-insaturada, resultando na formação de peróxidos e hidroperóxidos com duplas ligações conjugadas que podem envolver-se em diferentes reações degradativas semelhantes às observadas no processo de autooxidação. (SILVA *et al.*, 1999; RAMALHO & JORGE, 2006).

Portanto, os principais produtos finais da oxidação lipídica são derivados da decomposição de hidroperóxidos, como álcoois, aldeídos, cetonas, ésteres e outros hidrocarbonetos, sendo os aldeídos os responsáveis para os *off-flavours* (FERRARI, 1998).

Os produtos da oxidação lipídica estão associados à muitas doenças, no organismo como a formação de compostos reativos através da peroxidação, que pode conduzir a alterações na permeabilidade e fluidez da membrana lipídica e alterar drasticamente a integridade das células, contribuindo para o desenvolvimento de aterosclerose, alguns tipos de câncer, além da participação no processo de envelhecimento. Além disso, a ingestão de óleos oxidados que contém hidroperóxidos e aldeídos, também provoca degeneração hepática e renal (FERREIRA, 1998; WAŚOWICZ *et al.*, 2004; BARRERA, 2012).

O controle da reação de oxidação é um desafio importante, pois a remoção da película que envolve as castanhas as expõe à luz e a umidade, levando a formação

de agentes que favorecem o ranço. É conhecido que esta película é rica em polifenóis, fitosteróis e outros antioxidantes que evitam os efeitos adversos da oxidação, por outro lado devido ao alto índice de ácido oleico e linoleico, o óleo de castanha-do-brasil pode ser muito instável (LÓPEZ-URIARTE *et al.*, 2009; ZAJDENWERG *et al.*, 2011).

O uso de revestimento comestível pode contribuir para o aumento da vida útil e a qualidade dos alimentos, pois atua como barreira seletiva contra os fatores determinantes da oxidação e conseqüentemente evita a produção de aromas e sabores indesejáveis. Além disso, os óleos essenciais podem ser adicionados à composição dos revestimentos e por possuírem propriedades antifúngicas evitam a contaminação e a produção de micotoxinas. Aplicado diretamente na castanha, o filme proporciona aos consumidores produto de alta qualidade e livre de aditivos químicos (DU *et al.*, 2009).

2.5 Revestimento Comestível Composto por Zeína e Óleos Essenciais

A história relata que no século XII, na China, ceras foram usadas para revestir frutas cítricas para retardar a perda de água. No século XV, no Japão, a preservação foi feita por uma película a partir do leite de soja fervido e na Inglaterra no século XVI, foi utilizada gordura animal (banha) para prolongar a vida útil dos produtos à base de carne. Foi emitida uma patente, nos Estados Unidos no século XIX, em relação à preservação de produtos de carne por revestimentos de gelatina (SÁNCHEZ-ORTEGA *et al.*, 2014).

Os biopolímeros ou bioplásticos são materiais biodegradáveis que têm sido desenvolvidos em forma de filmes ou coberturas para serem aplicados, principalmente, na indústria de alimentos (PAVLATH & ORTS, 2009).

É conhecido como filme o material pré-formado separadamente e aplicado posteriormente sobre o produto. Pode ser usado para cobrir, envolver ou como camada de separação. A cobertura é definida como uma fina camada de material aplicado e formado diretamente na superfície do produto que se deseja proteger (FAKHOURI *et al.*, 2007).

As coberturas são suspensões que podem ser aplicados por pulverização, espalhamento ou imersão e quando secas formam uma camada fina e transparente

sobre a superfície do alimento. Quando depositados diretamente sobre a superfície podem ser consumidos junto com o alimento e são considerados parte do produto final (SÁNCHEZ-ORTEGA *et al.*, 2014).

Os revestimentos provenientes de materiais biodegradáveis e renováveis podem ser produzidos, por exemplo, a partir da matéria-prima de polissacarídeos, o amido, o alginato, a celulose e a quitosana. As proteínas mais usadas são as de origem animal como a caseína, o colágeno e a gelatina e as de origem vegetal como as da soja, do trigo e a zeína do milho (CAMPOS & GERSCHENSON, 2011).

Tem aumentado o interesse para a confecção de filmes e coberturas para alimentos composto por zeína, pois apresenta um apelo ambiental já que são provenientes do milho que é uma fonte renovável (LAWTON, 2002).

A zeína é denominada proteína de reserva, pois é a reserva que o embrião da nova planta a ser gerada utilizará durante o processo de germinação e a fase inicial de crescimento antes da fotossíntese estar estabelecida. Ela é formada durante o desenvolvimento da planta e acumula-se no endosperma do grão, (D'OVIDIO & MASCI, 2004).

A zeína é hidrofóbica, devido à presença de aminoácidos não polares em sua constituição, como leucina, alanina e prolina. Portanto, é insolúvel em água, a menos que a água seja parte do solvente de diluição em outras soluções alcoólicas, sendo o etanol 70% o solvente mais comumente utilizado (FORATO *et al.*, 2013; PAPALIA & LONDERO, 2015; TURAZAN & KOKINI, 2016).

Para que a zeína apresente eficiência em sua aplicação de filmes, durante o seu processamento, é necessário o uso de plastificantes para tornar o material mais flexível (FORATO *et al.*, 2013).

Os plastificantes, utilizados neste caso, são compostos orgânicos de baixo peso molecular que reduzem as forças intermoleculares ao longo das cadeias do polímero, proporcionando alta mobilidade molecular e flexibilidade ao revestimento comestível (LAWTON, 2004).

Filmes de zeína podem ser produzidos por dissolução em uma solução de álcool e a evaporação do solvente em superfícies inertes. Estes filmes são rígidos e frágeis por isso necessitam geralmente da adição de plastificantes para ajustar as propriedades mecânicas (EMMAMBUX & STAGDING, 2007).

Os plastificantes comumente adicionados à zeína são o glicerol, o poli (etilenoglicol) e o sorbitol. O uso de ácidos graxos, como o ácido oleico, tem sido

descrito na elaboração de películas aplicadas na área de alimentos. Entretanto, o excesso de plastificante pode resultar na redução das propriedades mecânicas dos filmes, e em alguns casos, redução da tensão de superfície (SCRAMIN *et al.*, 2011; PAPALIA & LONDERO, 2015).

O uso da zeína como matéria-prima e suas propriedades mecânicas e de barreira para filmes foram estudadas por Wang & Padua (2006), que em seus resultados mostraram que os filmes à base de zeína misturados com ácido oleico tinham melhores propriedades de barreira ao vapor de água e flexibilidade.

Os estudos realizados por Subramanian *et al.*, (2007), teve como objetivo investigar as características de adsorção da proteína zeína em superfícies hidrofóbicas e hidrofílicas para compreender as mudanças de orientação associadas à estrutura proteica em uma superfície. Observaram que a zeína mostra uma melhor afinidade em relação às superfícies hidrofílicas do que as superfícies hidrofóbicas e que os modos de adsorção e as mudanças conformacionais são diferentes para cada uma delas. Concluíram que a molécula de zeína adota uma orientação perpendicular em uma superfície hidrofílica, enquanto que em uma superfície hidrofóbica parece ser quase plana, sendo assim essas informações podem abrir possibilidades de usar zeína como um revestimento protetor e impermeável para embalagens de alimentos.

Arcan *et al.* (2011) avaliaram as propriedades antioxidantes e antibacterianas de filmes à base de zeína após incorporação de diferentes ácidos fenólicos e flavonóides. A adição destes compostos também melhorou a fragilidade e flexibilidade dos filmes. Enfatizaram ainda que tais resultados abriam uma nova perspectiva para o uso em embalagens de zeína bioativa flexível.

Segundo Forato *et al.* (2013), observaram que os filmes de zeína sem plastificante são frágeis, mas a adição de 1 e 2% em massa de ácido oleico proporcionou um significativo aumento do módulo de elasticidade. Concluíram que a presença de plastificante introduz também irregularidades de superfície e leva a uma perda das características hidrofóbicas dessa proteína.

Pena-Serna & Lopes-Filho (2013), prepararam filmes de zeína em solução aquosa de etanol com ácido oleico e glicerol como plastificantes. O objetivo foi determinar o efeito da adição de diferentes concentrações de glicerol e etanol sobre as propriedades funcionais e estruturais dos filmes. Concluíram que as propriedades de barreira de água e vapor dos filmes foram maiores quando adicionaram uma

maior concentração de etanol e menor concentração de glicerol. Do mesmo modo, a opacidade, homogeneidade e estrutura do filme composto foram melhoradas à medida que o etanol aumentou e a glicerol baixou.

Chen *et al.* (2014), prepararam filmes de zeína a partir de soluções alcólicas com diferentes concentrações de etanol e isopropanol, usando glicerol como plastificante. Observaram a hidrofobicidade, propriedades mecânicas e de superfície. Os resultados indicaram que o filme preparado com etanol era mais resistente à tração e hidrofóbico comparado ao filme com isopropanol.

Portanto, a literatura retrata que o revestimento comestível a base de zeína possui propriedades hidrofóbicas e a adição de óleo melhora a flexibilidade do filme, sendo uma alternativa para prolongar a vida de prateleira de alimentos. Além disso, atua como barreira semipermeável, com função de inibir ou reduzir a transferência de umidade, oxigênio, dióxido de carbono, lipídios e aromas, também podem transportar componentes como antioxidantes e antimicrobianos (FAKHOURI *et al.*, 2007; HERNANDEZ-IZQUIERDO & KROCHTA, 2008; GILLGREN *et al.*, 2011; SÁNCHEZ-ORTEGA *et al.*, 2014).

2.5.1 Óleos Essenciais

Óleos essenciais são compostos aromáticos e voláteis com baixo peso molecular. Em temperatura ambiente apresenta aspecto oleoso e podem ser obtidos a partir de flores, sementes, folhas, galhos, cascas, ervas, madeira, frutos e raízes, sendo a destilação a vapor o método mais utilizado para extrair o óleo (BURT, 2004).

Algumas pesquisas reportaram o controle antifúngico usando aditivos alimentares e naturais, tais como os óleos essenciais. Os óleos essenciais e seus constituintes podem atuar como agentes fungistáticos e/ou fungicida, dependendo das concentrações utilizadas (ANTUNES & CAVACOB, 2010; TYAGI & MALIK, 2011). Essa atividade é atribuída à ação das substâncias presentes em sua composição como os compostos fenólicos, monoterpenos e terpenos (hidrocarbonetos voláteis e insaturados) (CARSON *et al.*, 2006; GILLES *et al.*, 2010).

Alguns autores discutem que a atividade antifúngica dos óleos essenciais testados altera a permeabilidade das células, ocasionando o extravasamento do

citoplasma e também inibem a respiração. Este mecanismo foi observado por trabalhos que mostram que o terpeno eugenol inibe a respiração mitocondrial e a produção de energia (CACCIONI & GUIZZARDI, 1994; ZAMBONELLI *et al.*, 1996; CARSON *et al.*, 2006).

A sua incorporação em revestimentos de polissacarídeos biodegradáveis representa uma técnica eficaz para controlar a elevada volatilidade destes compostos; à medida que a matriz de polissacarídeos entra em contacto com o agente bioativo, minimiza as perdas e diminui a velocidade de difusão para a superfície do produto, tornando o processo mais eficaz na redução de microorganismos do que quando aplicado na superfície do produto através de uma solução de pulverização (CHÁFER *et al.*, 2012).

O mecanismo de ação, tanto em bactérias quanto em fungos, envolve tanto a perda da integridade da membrana acompanhada pela liberação de material intracelular como a inibição da respiração celular, com a consequente incapacidade de manter a homeostase associada a alterações na morfologia celular (TERZI *et al.*, 2007).

Além de conferir propriedades antimicrobianas as películas comestíveis, a incorporação do óleo essencial também é responsável por modificar as propriedades físicas, isto é, melhora a permeabilidade ao vapor de água, fornece propriedades de barreira moderadas aos gases, assim contribui para uma maior vida de prateleira do alimento (VARGAS *et al.*, 2008; DHALL, 2013).

2.5.2 Óleo Essencial de Melaleuca

Entre os óleos essenciais podemos citar a melaleuca (*Melaleuca alternifolia* Cheel), também conhecida por *tea tree*, árvore-ti e árvore-do-chá. É uma árvore aromática pertencente à família das mirtáceas (*Myrtaceae*), originária da Austrália, e com grande interesse econômico no óleo que pode ser extraído das folhas, ramos e caule (SOUZA *et al.*, 2015).

Em relação ao método de extração do óleo essencial de melaleuca é feito por destilação a vapor das folhas e ramos (CARSON *et al.*, 2006).

O óleo de melaleuca é rico em terpineol, principal constituinte químico responsável por suas propriedades antifúngicas e antibacterianas (VIEIRA *et al.*, 2004).

Li *et al.*, (2016), testaram a ação antifúngica do óleo de melaleuca para *Aspergillus niger* e observaram que com concentrações crescentes, a taxa de morte celular e a duração da fase de atraso de crescimento aumentaram de forma correspondente.

Hossain *et al.*, (2016) avaliaram a ação antifúngica de óleos essenciais, como manjerição, canela, eucalipto, orégano, hortelã, melaleuca e tomilho contra *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus* e *Penicillium chrysogenum*. Em geral, os óleos essenciais foram efetivos na redução do diâmetro da colônia, porém novas pesquisas sobre seus principais componentes são necessárias, assim como uma melhor compreensão do modo de ação, a fim de avaliar a sua utilidade na extensão da vida útil dos alimentos embalados.

Carson *et al.*, (2006) em seu trabalho de revisão afirmam que leveduras, dermatófitos e outros fungos filamentosos são suscetíveis a ação da melaleuca e a atividade antisséptica ocorre, devido as propriedades químicas do óleo romperem a barreira de permeabilidade da membrana dos microrganismos.

Angelini *et al.*, (2006) testaram a ação antifúngica de alguns óleos essenciais, entre eles o de melaleuca, contra sete espécies de fungos entre elas o *Aspergillus niger* e *Aspergillus terreus* e os resultados mostraram que o óleo de melaleuca exibiu atividade antimicrobiana de largo espectro.

2.5.3 Óleo Essencial de Pimenta Rosa

A aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi) é uma planta nativa do Brasil, pertencente à família Anacardiaceae e possui outros nomes comuns como: aroeira-vermelha, aroeira-de-remédio, aroeira-mansa, aroeira-branca, aroeira-da-praia, aroeira-do-sertão, fruto-de-sabiá e árvore-da-pimenta. Seus frutos possuem a aparência de uma pequena pimenta de coloração rosa-avermelhada, por isso, também conhecida por pimenta rosa (LENZI & ORTH, 2004; TORRES *et al.*, 2016).

Tzortzakis & Economakis (2007) identificaram que o composto da Aroeira (*Schinus terebinthifolius*), o monoterpeno é o princípio ativo contra o crescimento dos fungos.

Garbin *et al.*, (2014) testaram a ação antifúngica de vinte e três plantas da região semi-árida do Brasil, contra *Trichophyton rubrum* e *Trichophyton*

mentagrophytes e seus resultados comprovaram a atividade antifúngica da pimenta rosa.

Oliveira Junior *et al.* (2013) avaliaram o efeito do óleo essencial do fruto de *Schinus terebinthifolius* sobre o crescimento micelial do fungo *Colletotrichum gloeosporioides in vitro*. A inibição do crescimento do fungo foi diretamente proporcional à quantidade do óleo e a maior inibição encontrada foi de 79,07% na concentração de 0,50% de óleo.

Johann *et al.* (2007), descreveram a propriedade antifúngica de extratos de oito plantas utilizadas na medicina tradicional brasileira foi testada contra cinco espécies de *Candida*, com relevância clínica. O extrato etanólico das folhas de *Schinus terebinthifolius* apresentou potencial atividade antifúngica contra *C. glabrata* e *S. schenckii*. Na análise fitoquímica preliminar dos extratos de *S. terebinthifolius* observou-se a presença de compostos biologicamente ativos como, flavonóides, triterpenos, esteróides e taninos.

2.5.4 Óleo Essencial de Cravo

Os cravos-da-índia (*Syzygium aromaticum*) são os botões florais secos aromáticos de uma árvore pertencente à família Myrtaceae (PAOLI *et al.*, 2007).

Os estudos fitoquímicos do cravo revelam a presença de até 90% de óleo essencial, no qual o eugenol é o componente majoritário. Trata-se de um composto fenólico com ação fungicida (Pereira *et al.*, 2008).

Alguns trabalhos na literatura mostram a ação antifúngica deste óleo essencial. O trabalho realizado por Ribes *et al.*, (2016) teve como objetivo controlar a deterioração fúngica de geléias de morango através de uma emulsão composta por óleo essencial de cravo e concluíram que as emulsões podem ser empregadas para o controle fúngico das geléias.

Císarová *et al.* (2016) testaram ação antifúngica de quinze óleos essenciais, dentre eles o óleo de cravo. Todos os óleos essenciais exibiram atividade contra *A. parasiticus* e *A. flavus*.

Bluma & Etcheverry (2008) analisaram cinco óleos essenciais, incluindo o cravo e concluíram que a eficácia do óleo depende principalmente da concentração que é utilizado.

Pinto *et al.*, (2009) estudaram a ação e a composição do óleo de cravo. Os resultados mostraram um alto teor de eugenol (85,3%) com atividade inibitória contra todas as cepas testadas, entre elas *Aspergillus fumigatus* e *Aspergillus niger*.

Portanto, os óleos essenciais quando adicionados ao processamento com a zeína, oferece vantagens como matéria-prima para a produção de filmes e coberturas que permitem seu uso em alimentos (LAWTON, 2002; SERNA & FILHO, 2015).

Com a visão de comercialização, a aceitação de um novo produto deve ser investigada, pois a qualidade sensorial do alimento favorece a fidelidade do consumidor em um mercado cada vez mais exigente (TEIXEIRA, 2009).

2.6 Análise Sensorial

A aceitabilidade de um produto foi definida pela Associação Brasileira de Normas Técnicas, ABNT (1993), como o grau de aceitação de um produto por um indivíduo ou população em termos de propriedades sensoriais. As propriedades sensoriais são influenciadas diretamente pela composição química e propriedades físicas de um produto e são percebidas pelos sentidos da visão, olfato, gosto e tato.

Os testes sensoriais têm como finalidade avaliar a resposta de consumidores habituais com relação a preferência e ou aceitação de um determinado produto, ou seja, os testes que melhor avaliam a aceitabilidade de produtos e serviços são aqueles que utilizam os próprios consumidores desses produtos (MORAES, 2004).

Wang *et al.* (2017), submeteram amostras de amendoim torrado de diferentes variedades a percepções sensoriais e concluíram que dos dezessete atributos sensoriais o sabor era o aspecto mais importante para os avaliadores.

Grosso *et al.* (2017) avaliaram a estabilidade de nozes não revestidas e revestidas com metil celulose e proteína do soro do leite durante 210 dias de armazenamento em temperatura ambiente. As amostras foram periodicamente removidas do armazenamento para realizar uma análise sensorial descritiva. Todas as amostras exibiram diferenças significativas nos seus atributos sensoriais inicialmente e após o armazenamento e concluíram que os índices de intensidade para sabores oxidados aumentaram durante o armazenamento.

Belviso *et al.* (2017) avaliaram entre seus estudos a percepção sensorial de avelãs torradas em tratamentos com temperaturas diferentes (ar quente a 120°C por

20 minutos e 170°C por 40 minutos). Observaram diferenças sensoriais significativas somente quando a temperatura de torrefação era alta.

Magnuson *et al.* (2016) exploraram as diferenças sensoriais entre 8 diferentes cultivares de nozes cruas e tostadas. Avaliaram a intensidade de 20 atributos de sabor usando análise descritiva. Os resultados mostraram que as intensidades de 10 dos 20 atributos de sabor foram maiores para as nozes torradas. Concluíram que a pesquisa oferece aos produtores e os fabricantes de produtos de nozes um melhor entendimento sobre as diferenças de sabor tanto em estados crus quanto em torrados.

Portanto, a análise da aceitação é de extrema importância, pois reflete a intensidade em que consumidores gostam ou desgostam de determinado produto, sendo realizado por um determinado número de pessoas representativas do público que se deseja atingir (MORAES, 2004).

2.7 Técnicas Usadas para Caracterização do Material

2.7.1 Medida de Ângulo de Contato

Essa medida é usada para indicar o grau de hidrofobicidade ou hidrofilicidade de superfície de uma amostra.

Quando uma gota de líquido é colocada sobre uma superfície sólida (figura 4) forma-se uma interface tripla entre o sólido, o líquido e o vapor, cuja posição de equilíbrio depende das forças associadas às três tensões interfaciais. O ângulo de contato (θ) é designado entre a superfície sólida e a tangente à superfície do líquido num ponto da linha de contato com o sólido (PASCH *et al.*, 2005; SU *et al.*, 2010).

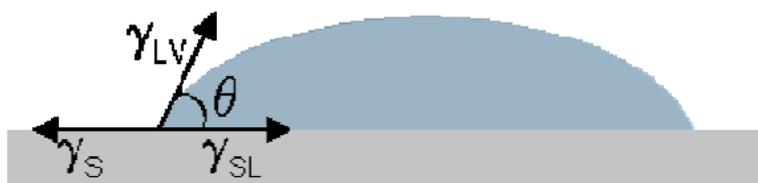


Figura 4. Ângulo de contato entre o líquido e a superfície. γ_S é a energia de superfície do sólido; γ_{LV} tensão superficial do líquido em equilíbrio com o vapor; e γ_{SL} é a energia da interface sólido-líquido. Fonte: (Peralva *et al.*, 2002).

A hidrofobicidade de uma amostra pode ser medida através do depósito de uma gota de água, com o auxílio de uma seringa, sobre a superfície do material que se deseja estudar. Um ângulo de contato tende a 0° quando há afinidade química entre a superfície e o líquido, ocorrendo o espalhamento completo do líquido no sólido. Quando o ângulo de contato tende a 180° o líquido não apresenta qualquer interação com a superfície (WANG; FU; WANG, 2009).

Filmes biodegradáveis podem ser analisados através dessa medida, avaliando assim sua polaridade e o seu caráter hidrofílico por meio do acompanhamento de sua variação desde o contato inicial da gota até um tempo pré-determinado de 300 segundos (ALMEIDA, 2010). Essa técnica foi utilizada por Forato *et al.* (2013), e Scramin *et al.* (2011) para avaliar a hidrofobicidade de filmes a base de zeína.

2.7.2 Microscopia de Força Atômica (MFA)

O MFA atua através de uma sonda percorrendo a superfície do material de interesse de estudo, e pode ser operado em diferentes modos. (FERREIRA, 2006; HERRMANN *et al.*, 1997).

Essa técnica microscópica é usada para entender a topografia de superfícies em micro e nanoescala e em alta resolução, sendo possível a modelagem 3D da superfície através das interações entre a amostra e a ponta do cantilever que escaneia a região (TURAZAN & KOKINI, 2016).

O princípio de funcionamento baseia-se em imagens geradas através da atração e repulsão entre a superfície da amostra e a sonda, (ponta piramidal localizada na parte inferior de uma haste flexível- o cantilever), ou seja, através dessas forças de atração ou repulsão da sonda pela amostra, o cantilever é puxado para cima ou para baixo e essa variação de altura é monitorada por um feixe de laser e um detector de posição (Herrmann *et al.*, 1997; FERREIRA, 2006;).

A varredura é feita por intermédio de um sistema piezoelétrico capaz de realizar movimentos nas posições x, y e z, com precisão de angstroms (Å). Este deslocamento é controlado por um sistema ótico de alinhamento onde um feixe a laser incide em um espelho, localizado na parte superior do cantilever, e um fotodetector cuja responsabilidade é medir as variações de posição e de intensidade da luz produzidas pelas deflexões desta sonda, corrige a posição do mesmo,

mantendo-o em contato com a amostra durante a varredura. Os diferentes tipos de “relevo geográfico” encontrados sobre a superfície da amostra fazem com que a interação mude. Essas diferenças, captadas pelo detector, são armazenadas e processadas por um software, que as transformam em imagens topográficas da superfície bi ou tridimensionais. O princípio de funcionamento foi esquematizado por Herrmann et al. (1997) (figura 5). A força mais comumente associada com esta microscopia na deflexão do cantilever é a força de van der Waals e forças eletrostáticas (Herrmann *et al.*, 1997; FERREIRA, 2006).

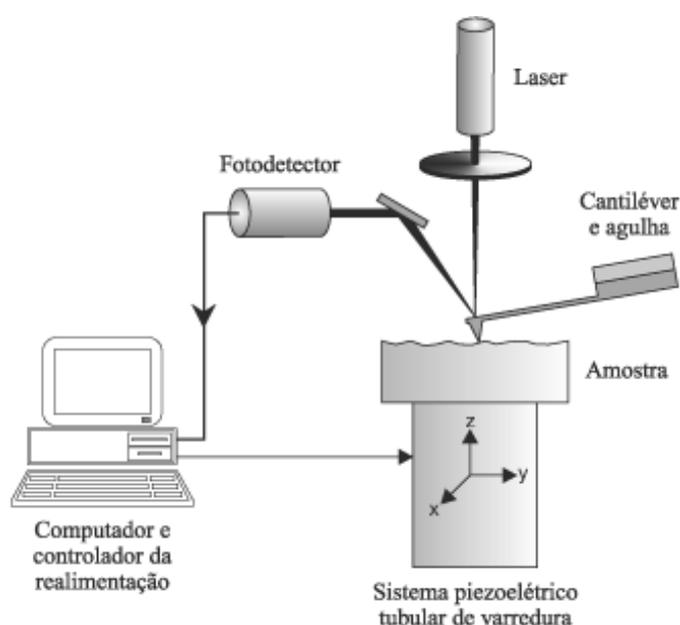


Figura 5. Esquema de funcionamento do microscópio de força atômica. Fonte: (Herrmann *et al.*, 1997).

Os modos de produzir as imagens, também chamados modos de varredura ou de operação, referem-se à distância mantida entre a sonda e a amostra, no momento da varredura, e às formas de movimentar a ponteira sobre a superfície a ser estudada. A técnica de MFA pode ser operada em três modos diferentes: contato, não-contato e contato intermitente (“*tapping*”). A escolha do modo apropriado depende da aplicação específica que se deseja fazer (FERREIRA, 2006).

Portanto, a MFA é frequentemente utilizada para caracterizar a superfície de filmes de zeína e outros produtos à base de biopolímeros. Este método também permite compreender as interações entre a zeína e outras substâncias (Turazan & Kokini, 2016).

Esta técnica foi utilizada por SUBRAMANIAN & SAMPATH, (2007) para estudar as características topográficas dos depósitos de zeína em uma base de ouro.

2.8 Cromatografia Gasosa (CG) para Análise de Ácidos Graxos

Gases ou substâncias volatilizáveis podem ser separados utilizando-se a técnica denominada “Cromatografia Gasosa” (COLLINS *et al.*, 1997).

A cromatografia é uma técnica de separação de espécies químicas semelhantes, ou seja, é aplicada na separação e determinação de componentes em vários tipos de amostras. Além disso, ela pode ser empregada para a identificação qualitativa e quantitativa das espécies separadas (SKOOG *et al.*, 2006).

O conceito de cromatografia foi enunciado pela primeira vez em 1941 por Martin e Synge, contudo, mais de uma década se passou antes que o valor da cromatografia fosse demonstrado experimentalmente e que essa técnica passasse a ser empregada como uma ferramenta rotineira no laboratório. Em 1955, o primeiro instrumento comercial para a cromatografia surgiu no mercado (SKOOG *et al.*, 2006).

De modo geral o processo de análise ocorre pela passagem da amostra por duas fases: uma estacionária (fixa) de grande área superficial e outra fase móvel. A fase móvel, denominada de gás de arraste, é o material que se desloca pela fase estacionária, arrastando os componentes da amostra. Então, após transitar pela fase estacionária, os componentes da amostra se separam e são identificados pelo detector, do primeiro componente menos retido ao último mais retido pela fase estacionária (COLLINS *et al.*, 1997; LANÇAS & McNAIR, 1982).

A composição de óleos comestíveis pode ser determinada através de cromatografia gasosa analisando os ácidos graxos que o compõem (JORGE & LUZIA, 2012).

Muniz *et al.* (2015) usaram a técnica de CG para caracterizar o óleo extraído de *Bertholletia excelsa* H.B.K. e os resultados indicaram que o óleo contém ácidos graxos poli-insaturados em grande proporção.

Esche *et al.* (2013) analisaram a composição e o conteúdo de constituintes lipídicos em dez diferentes tipos de nozes, entre elas a castanha-do-brasil. A abordagem aplicada foi baseada em cromatografia.

Ryan *et al.* (2006) através da CG determinaram a composição de ácidos graxos em noz pecan, pistache e castanha de caju. E concluíram que o ácido linoleico (C18: 2) foi o ácido graxo poli-insaturado majoritários.

2.8.1 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) para Avaliação da Oxidação Lipídica

O termo ressonância magnética nuclear (RMN) tem sua origem a partir de características de certos átomos no estado fundamental que, na presença de um campo magnético, tornam-se ressonantes à frequência magnética do campo (MADUREIRA *et al.*, 2010).

A história da (RMN) teve início com o físico Isidor Isaac Rabi em 1937, que propôs uma nova técnica capaz de determinar a intensidade dos momentos magnéticos nucleares. Em 1946, avançando os estudos iniciados por Rabi, a equipe do físico Edward Mills Purcell e outra equipe liderada pelo físico Félix Bloch, as equipes trabalharam de forma independente, publicaram artigos anunciando que haviam descoberto o efeito da ressonância magnética. Desde então, a RMN tem se mostrado ferramenta muito útil nas distintas áreas, como agricultura, piscicultura, química, médica, farmacêutica, etc. A RMN é uma técnica rápida, não destrutiva (não ionizante) e não invasiva (sem meio de contraste) que pode ser utilizada em diferentes análises, de diferentes materiais e em estados sólido e líquido (BLOCH *et al.*, 1946; PURCELL *et al.*, 1946; MARTINEZ *et al.*, 2003; HAGE & IWASAKI, 2009).

Johnson & Shoolery, (1962) foram os pioneiros com a publicação do trabalho “Determinação da insaturação e peso molecular médio das gorduras naturais por ressonância magnética nuclear”. Os pesquisadores relataram os sinais de RMN de ^1H típicos de óleos vegetais.

A RMN é uma técnica espectroscópica, ou seja, baseia-se no estudo da interação da radiação eletromagnética com a matéria. Explora a capacidade de isótopos atômicos (^1H , ^{13}C , ^{15}N , ^{31}P) absorver e reemitir a Radiação de Radiofrequência (RF) quando colocados sob fortes campos magnéticos (WHISHART, 2013).

É utilizada para analisar óleos, gorduras e lipídeos alimentares, onde as informações são fornecidas pelo equipamento em um curto período de tempo. O espectro de RMN fornece uma série de sinais (picos) cujas frequências podem ser

relacionadas à natureza química dos átomos de hidrogênios (grupos metil, metilenos, etc.) e cujas intensidades são proporcionais ao número de hidrogênios que produzem o sinal. (GUILLÉN & RUIZ, 2001).

Portanto, a ressonância magnética nuclear é, basicamente, a exploração dos isótopos que interagem com o campo magnético. Esta exploração se dá através da exibição por núcleos de determinados elementos químicos que, quando submetidos a um campo magnético forte e excitados por ondas de rádio em uma determinada frequência, emitem comprimento de onda de rádio, que poderá ser captado por uma antena e com auxílio de um software apropriado, ser convertido em imagem (HAGE & IWASAKI, 2009).

A espectroscopia de ressonância magnética nuclear de ^1H é uma ferramenta útil para monitorar os produtos de oxidação em óleos comestíveis. Colzato *et al.* (2009) através dessa técnica, observaram os produtos primários da oxidação como os hidroperóxidos e os dienos conjugados em óleos de canola, azeite de oliva e de macadâmia.

Colzato *et al.* (2011), através desta técnica, estudaram a eficácia de revestimentos comestíveis a base de zeína no bloqueio da oxidação de óleos de nozes macadâmia.

3 OBJETIVOS GERAIS

O objetivo deste trabalho foi desenvolver formulações filmogênicas à base de zeína com adição de óleos essenciais como plastificantes aplicadas sobre castanhas-do-brasil, visando bloquear a ação oxidativa e posteriormente avaliar a ação antifúngica dos óleos e a aceitação do produto revestido.

3.1 Objetivos Específicos

- Preparar soluções filmogênicas à base de zeína com adição de plastificante, óleos essenciais de cravo botão, pimenta rosa e melaleuca nas concentrações 0,5, 1 e 1,5%;
- Produzir amostras dos filmes e caracteriza-los através da medida de ângulo de contato e microscopia de força atômica;
- Revestir Castanhas-do-brasil com a solução filmogênica à 0,5% de óleo essencial de cravo botão, pimenta rosa e melaleuca, para serem submetidos a um processo de oxidação acelerada em estufa;
- Analisar a ação oxidativa através da espectroscopia de ressonância magnética nuclear;
- Quantificar os ácidos graxos majoritários por Cromatografia Gasosa;
- Avaliar a aceitação de preferéncia do produto através da análise sensorial;
- Estudar a ação antifúngica utilizando óleos essenciais nas concentrações 0,5; 1,0 e 1,5% para *Aspergillus flavus*.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Matéria-prima

Foram utilizados para essa pesquisa os principais materiais: Zeína: adquirida da empresa Sigma-Aldrich; Óleos Essenciais: pimenta rosa, cravo botão e melaleuca foram adquiridos comercialmente pela destilaria Bauru (especificações dos óleos no Anexo A, B e C respectivamente); Castanhas-do-brasil: fornecida pela empresa EcoNut®, em embalagens a vácuo.

4.2 Preparo da Zeína

Previamente foi necessário remover o óleo presente na zeína, utilizando o extrator soxhlet, com hexano por 24 horas. Após este processo, filtrou-se a solução utilizando filtro de papel com auxílio de sistema de vácuo e o material retido no filtro foi seco em capela de exaustão química em temperatura ambiente. Com a zeína completamente seca, o material está pronto para o preparo da solução filmogênica (Adaptado FORATO, 2000; FORATO *et al.*, 2003).

4.3 Preparo das Soluções Composta por Zeína e Óleos Essenciais

Para o preparo foi pesado e transferido para um becker 0,8g de zeína, adicionado em seguida 20mL de álcool 70%, obtendo assim a concentração de 4% de zeína para todas as soluções, onde variou-se as concentrações de plastificante; o óleo essencial de cravo botão, pimenta rosa e melaleuca; sendo adicionado à solução nas concentrações de 0,5, 1 e 1,5%, para cada óleo. A solução ficou sob agitação magnética, em temperatura ambiente, durante 2 horas para garantir a homogeneização.

4.4 Produção dos Corpos de Prova

Para obter amostras dos filmes nas três concentrações para cada óleo descrito anteriormente, foi depositado 40mL da solução filmogênica em placa de Petri descartável sem tampa e deixadas em repouso dentro do dessecador com sílica gel até a evaporação do álcool. Após evaporação total do solvente formou-se uma película que facilmente se descolou, a qual foi submetida a medidas de ângulo de contato e microscopia de força atômica para caracterização do filme.

4.5 Caracterização dos Filmes

4.5.1 Medida de Ângulo de Contato

Com essa técnica foi possível avaliar a hidrofobicidade dos filmes. Estes, após serem destacados da placa de Petri foram cortados em pequenos retângulos (2cm) e fixados em uma fita dupla face sobre uma placa de acrílico. As medições foram realizadas com o auxílio de uma seringa preenchida com água foi liberado uma gota ($\cong 3\mu\text{L}$) sobre a superfície da película. As imagens foram captadas em tempo real com intervalos de 60 segundos e o ângulo formado na superfície foi calculado pelo software FTA32 Image Software utilizando o equipamento CAN101 da KSV Instruments. Para os diferentes filmes, foram feitas pelo menos cinco medidas em diferentes posições da superfície do filme e a média foi tomada.

4.5.2 Microscopia de Força Atômica

Com as imagens obtidas na microscopia de força atômica foi possível avaliar a topografia e uniformidade das amostras, portanto foi utilizado o microscópio de força atômica modelo Flex, fabricado pela Nanosurf. Os cantileveres utilizados foram adquiridos da Budget Sensors, modelo Tap 150G, com frequência de ressonância em torno de 130KHz. As imagens foram obtidas em modo vibracional, em alguns casos chamado "tapping" ou "near contact".

4.6 Revestimento das Castanhas para Oxidação Acelerada em Estufa e Análise Sensorial

Para submeter às castanhas à oxidação acelerada em estufa e o teste da análise sensorial, as amostras passaram previamente pelo processo de revestimento. Seguindo-se:

- Solução filmogênica utilizada para o revestimento: zeína 4% com a concentração 0,5% de cada óleo essencial (cravo, pimenta e melaleuca), tendo o álcool 70% como solvente.
- As castanhas foram uma a uma imersas na solução por 3 segundos, em seguida foram dispostas em um suporte e permaneceram em temperatura ambiente (28°C) por 1 hora para secagem e evaporação do solvente, formando assim uma película não aparente aos olhos nus.

4.6.1 Oxidação Acelerada em Estufa

Após o recobrimento, as castanhas já secas foram armazenadas em placa de Petri juntamente com o controle (amostras não revestidas) e incubadas em estufa com ar circulante Eletrolab® modelo EL101/4 a 50°C com o objetivo de acelerar a oxidação. O período de incubação foi 14, 21 e 28 dias. Passado a incubação, as castanhas foram retiradas periodicamente da estufa para extração do óleo e posteriormente foram submetidas à análise de Cromatografia Gasosa e Ressonância Magnética Nuclear para quantificação dos ácidos graxos majoritários e avaliação da oxidação.

4.6.2 Análise Sensorial

4.6.2.1 Matéria-prima

Os testes sensoriais foram realizados em períodos de armazenamento diferentes, sendo o primeiro teste realizado com castanhas não revestidas controle (A) e revestidas com pimenta rosa (B) e cravo botão (C), seguindo o procedimento de revestimento descrito anteriormente em 4.4. As castanhas foram armazenadas em sacos plásticos com fechos herméticos e permaneceram em temperatura ambiente e cinco dias após o revestimento as amostras foram analisadas. A matéria prima para o revestimento de melaleuca não estava disponível no primeiro período, portanto foi realizado no segundo período de armazenamento, sendo o segundo teste realizado com castanhas sem revestimento controle (A), com pimenta rosa (B), com cravo botão (C) e com acréscimo do revestimento com melaleuca (D). As amostras foram armazenadas em estufa com ar circulante a 50°C por 30 dias.

4.6.2.2 Condições dos Testes Sensoriais

Este projeto foi submetido ao Comitê de Ética para Pesquisa em Seres Humanos, o qual foi aprovado com o número do CAAE: 62744316.3.0000.5504 (Anexo D).

O primeiro teste sensorial, após 5 dias de armazenamento, foi realizado no Laboratório de Análise Sensorial no Centro de Ciências Agrárias/UFSCar Araras em cabines individuais utilizando luz branca com 35 avaliadores. O segundo, realizado após 30 dias, na Embrapa Instrumentação da cidade de São Carlos com 30

avaliadores não treinados. Em ambos os testes cada avaliador recebeu duas unidades de castanhas de cada tratamento que foram servidas em copinhos plásticos codificados e uma ficha para o teste de ordenação de diferença e preferência das castanhas.

4.6.2.3 Análise Sensorial de Ordenação de Diferença e Preferência

Foi utilizado o teste de ordenação de diferença e preferência (ABNT, 1994) em relação a cor (clara-escura), brilho (fraco-forte), aroma doce (menos-mais), aroma oleoso (menos-mais), sabor doce (menos-mais), sabor oleoso (menos-mais), crocância (menos-mais) e dureza (menos-mais) e para ordenação de preferência (menos preferida – mais preferida). Todos os atributos foram ordenados em ordem crescente (figura 6).

ATRIBUTO	DESCRIÇÃO DO ATRIBUTO				
COR	Favor ordenar as amostras em ordem crescente da cor (mais clara - mais escura)	-			+
BRILHO	Favor ordenar as amostras em ordem crescente o brilho (menos brilho - mais brilho)	-			+
AROMA DOCE	Favor ordenar as amostras em ordem crescente o aroma doce (menos doce – mais doce)	-			+
AROMA OLEOSO	Favor ordenar as amostras em ordem crescente o aroma oleoso (Nenhum – muito oleoso)	-			+
GOSTO DOCE	Favor ordenar as amostras em ordem crescente o sabor doce (menos doce – mais doce)	-			+
SABOR OLEOSO	Favor ordenar as amostras em ordem crescente o sabor oleoso (nenhum – muito oleoso)	-			+
CROCÂNCIA	Favor ordenar as amostras em ordem crescente a crocância (menos crocante - mais crocante)	-			+
DUREZA	Favor ordenar as amostras em ordem crescente a dureza (menos dura - mais dura)	-			+

Agora, avalie as amostras de ordenação em ordem crescente de acordo com sua preferência, ou seja, da amostra menos preferida para a mais preferida.

-				+
---	--	--	--	---

Figura 6. Modelo de ficha utilizada no teste de ordenação de diferença e preferência das castanhas.

4.6.2.4 Análise Estatística

As interpretações dos dados obtidos nos testes de ordenação foram realizadas de acordo com o teste de Friedman (1987) utilizando a Tabela de Newell; MacFarlane (1987) para verificar se há ou não diferença significativa entre amostras em nível de 5% de significância (Anexo E).

4.7 Extração do Óleo das Castanhas-do-brasil

De acordo com as retiradas 14, 21 e 28 dias as castanhas foram removidas da estufa para a extração do óleo, que ocorreu em triplicata para as amostras revestidas, o controle (não revestido e submetido a temperatura) e o padrão (castanha não revestida e não submetida a temperatura). As castanhas foram moídas manualmente com o auxílio de um moinho de Almofariz e transferidas para um becker. Dentro da cabine de exaustão foi adicionado 40mL de Clorofórmio, em seguida foi coberto com filme plástico para evitar evaporação do solvente e deixado em agitador magnético por 2 horas. Após o período de agitação as amostras foram filtradas a vácuo; a castanha retida no papel filtro foi descartada e a parte líquida que continha o solvente e o óleo da castanha permaneceu sob agitação constante para total evaporação do clorofórmio, restando assim o óleo puro da castanha, o qual foi estudado através da Cromatografia Gasosa e Ressonância Magnética Nuclear.

4.8 Testes Realizados com o Óleo Extraído

4.8.1 Análise de Ácidos Graxos em Óleo da Castanha-do-brasil

Para análise do teor de ácidos graxos foi submetidos o óleo de castanha antes do tratamento térmico (T0) e após tratamento térmico (T28). Foi desenvolvida e otimizada uma metodologia de separação por cromatografia gasosa (GC) e os analitos foram quantificados empregando metodologia validada por cromatografia gasosa acoplada a um detector espectrométrico de massas (GC-MS). A análise foi realizada em conjunto com o prof. Dr. Stanislaw Bogusz Junior no laboratório de química da Universidade de São Paulo - USP São Carlos. O óleo da castanha foi submetido ao processo de derivatização com trifluoreto de boro em metanol sob atmosfera de nitrogênio, conforme estabelecido por JOSEPH & ACKMAN (1992) como seguiu: foram pesados em frasco âmbar 25mg de óleo, após foram adicionados 1000µL de Trifluoreto de boro (BF₃) em metanol e o frasco foi fechado com tampa de rosca. Após a mistura foi aquecido em banho-maria a 100°C por 30 minutos para que ocorresse a derivatização. Em seguida, o frasco de reação foi resfriado em água corrente e então foram adicionados 1000µL de iso-octano. O vial foi então agitado em vórtex por 1 minuto seguido da adição de 500µL de solução saturada de Cloreto de Sódio (NaCl). A amostra foi agitada por 1 minuto em vórtex e, após separação de fases, transferiu-se 800µL da fase orgânica para um vial

âmbar. Os FAME (*Fatty acid methyl ester*) foram separados e quantificados em um cromatógrafo a gás acoplado a um espectrômetro de massa quadrupolar, marca Shimadzu, modelo GC-2010 (Shimadzu, Kyoto, Japão). O cromatógrafo era dotado de um auto-injetor, marca Shimadzu, modelo AOC-20i/s (Shimadzu, Kyoto, Japão). A separação dos analitos ocorreu em uma coluna capilar de sílica fundida HP5-MS (30 m x 0,25 µm x 0,25 mm d.i.). Os parâmetros e condições do teste encontra-se em Anexo F.

4.8.2 Avaliação da Oxidação Lipídica

Com o objetivo de observar a oxidação da castanha-do-brasil, foram realizados experimentos, em triplicata, de ressonância magnética nuclear de ^1H . Estas análises foram realizadas em um espectrômetro de RMN Bruker modelo BZN 600'70 ASCEND TM, operando na frequência de 600 MHz para o núcleo ^1H . A preparação das amostras foram realizadas com 500µL de Clorofórmio deuterado e 100µL do óleo da castanha contendo traços de Tetrametilsilano (TMS) como referência interna, em tubos de RMN de 5 mm de diâmetro. Os óleos submetidos aos testes são referentes à: castanhas não revestidas e não submetidas à temperatura de 50°C (Padrão); castanhas não revestidas, mas submetidas à temperatura de 50°C (Controle); castanhas revestidas contendo a concentração 0,5% de óleo essencial de pimenta rosa, cravo botão ou melaleuca.

4.9 Ação Antifúngica dos Óleos Essenciais

Os testes *in vitro* para observar o crescimento micelial do *Aspergillus flavus* e a ação inibitória dos óleos cravo botão, pimenta rosa e melaleuca foram realizados em triplicata.

O meio de cultura Ágar Sabouraud Glicose (Oxoid) (Anexo G) foi autoclavado a 1 atm (121 °C) por 20 minutos e, antes da solidificação, a uma temperatura de aproximadamente 45 °C, foram acrescentados para cada óleo as concentrações 0,5, 1 e 1,5%. Após homogeneização, foi vertido em placa de Petri e o controle foi representado pelo meio de cultura sem adicional de óleo essencial.

Após a solidificação do meio, com o auxílio de uma agulha bacteriológica o fungo foi transferido para a placa de Petri através de três pontos na placa. As placas inoculadas e os controles foram incubados em estufa à temperatura de 30°C. Após o

período de 3, 7 e 15 dias, os testes foram retirados da estufa para avaliação do crescimento vegetativo e com uma régua comum foi anotado o diâmetro das colônias.

O cálculo para porcentagem de inibição foi realizado através da fórmula: Porcentagem de Inibição = $(C-T)/C \times 100$ Sendo: C = média do diâmetro da colônia (mm) do controle e T = média do diâmetro da colônia (mm) da placa teste.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 Corpos de Prova

Os filmes obtidos com a solução contendo concentração de 4% de zeína e adição de óleos de pimenta rosa e melaleuca se desprenderam facilmente de suas bases nas três concentrações (0,5, 1 e 1,5%), porém as amostras contendo cravo botão nas concentrações 1 e 1,5% ficaram aderidas à base, por isso foi necessário modificar a solução filmogênica para 8% de zeína.

Após aumentar a concentração de zeína para 8% para as amostras contendo cravo botão foi possível remove-las da base.

As figuras 7 A e B são referentes a películas destacadas da base. Para os três plastificantes os resultados macroscópicos foram semelhantes. As películas apresentaram-se transparentes, levemente brilhantes e quebradiças ao manuseio.

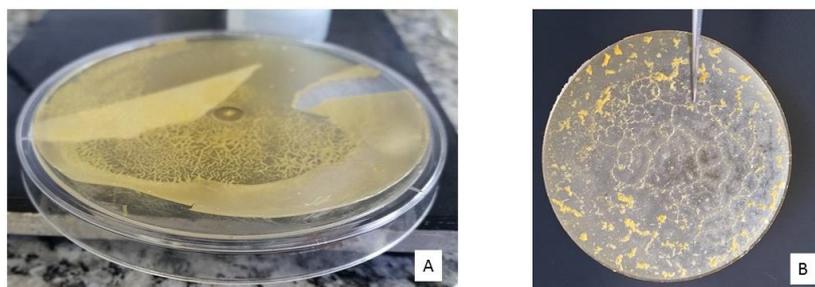


Figura 7. A e B. Películas de zeína contendo óleo essencial como plastificante.

5.2 Medida de Ângulo de Contato

A partir da média de 5 medidas realizadas nas diferentes formulações foram produzidos diversos gráficos (figura 8 a 16). Para os filmes contendo 8% de zeína e incorporados com óleo essencial de cravo observou-se que a capacidade de absorção de água diminui com o aumento das concentrações do óleo, ou seja, é observado maior ângulo com o aumento da concentração do óleo. Para as amostras contendo 4% de zeína e incorporadas com o óleo de pimenta rosa, os resultados indicam uma variação muito pequena apenas para concentração de 1,5%. Os filmes contendo 4% de zeína e incorporados com óleo essencial de melaleuca apresentaram um comportamento contrário aos filmes contendo óleo de cravo. As menores concentrações de óleo de melaleuca apresentaram maior hidrofobicidade. Sendo assim, de todos os tratamentos e concentrações, o óleo de melaleuca com concentração de 0,5% e 1% apresentaram melhores resultados, uma vez que busca-se que os filmes tenham caráter hidrofóbico.

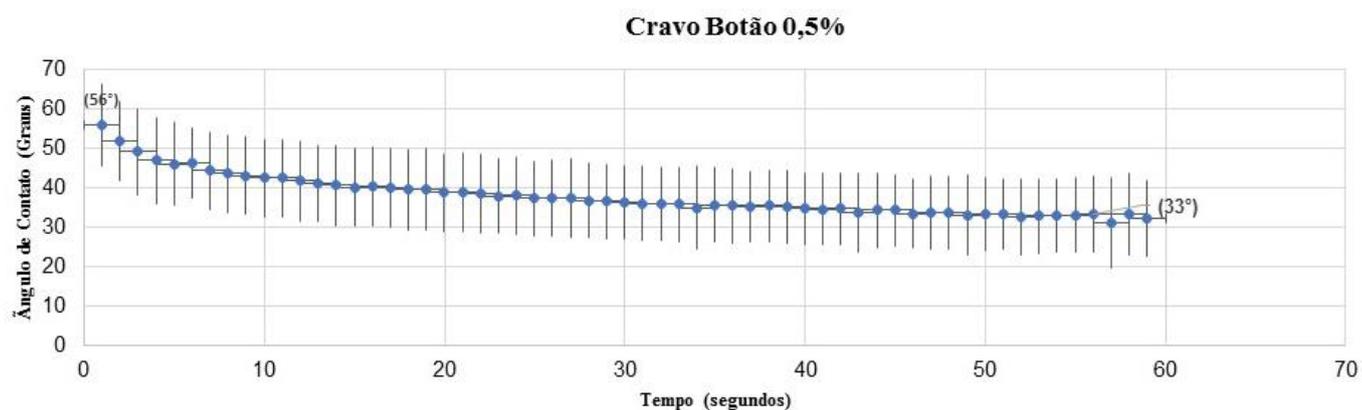


Figura 8. Medida de ângulo de contato em relação ao tempo. Filmes contendo 8% de zeína e 0,5% de óleo essencial de cravo botão.

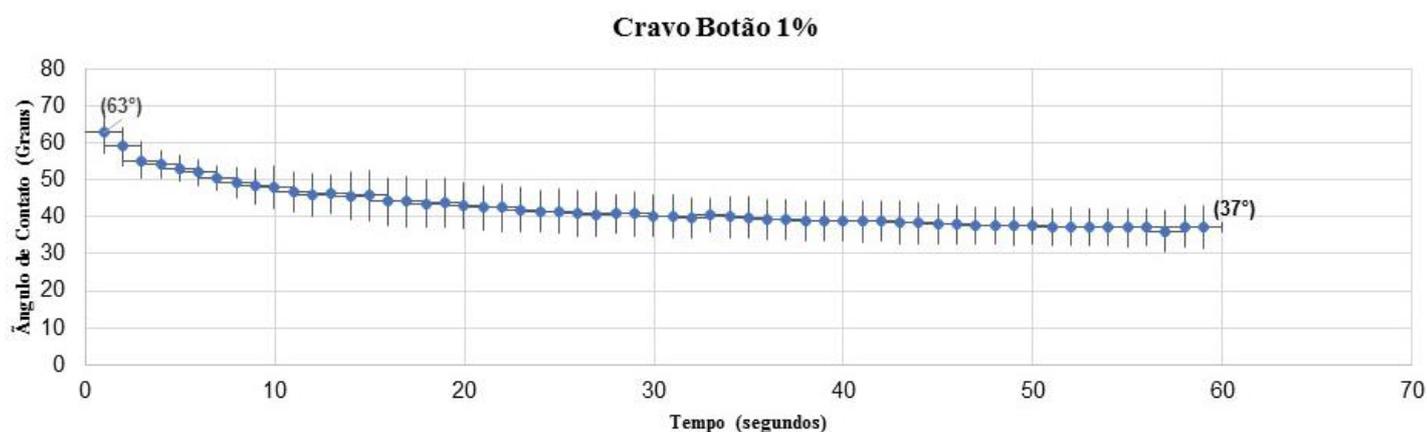


Figura 9. Medida de ângulo de contato em relação ao tempo. Filmes contendo 8% de zeína, e 1% de óleo essencial de cravo botão.

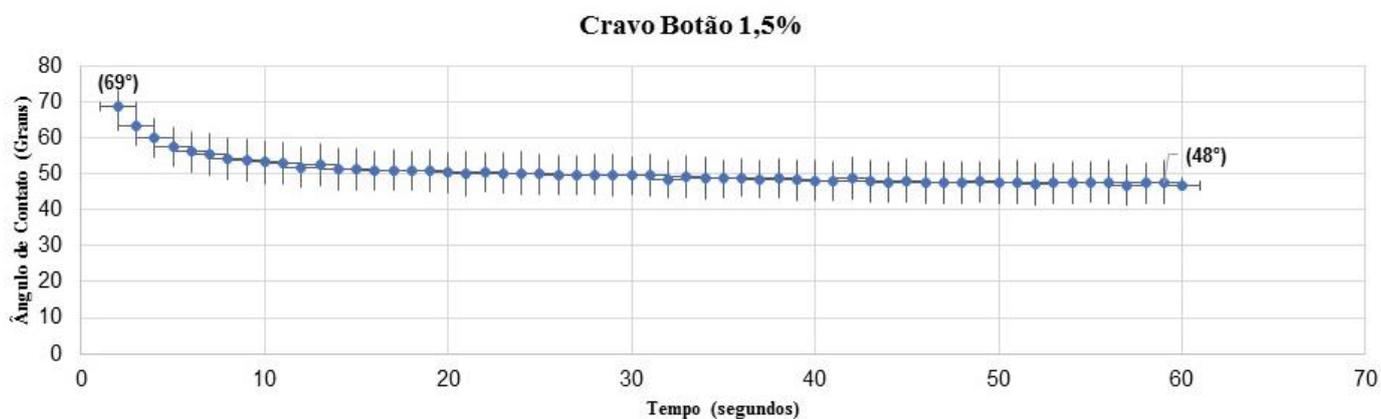


Figura 10. Medida de ângulo de contato em relação ao tempo. Filmes contendo 8% de zeína e 1,5% de óleo essencial de cravo botão.

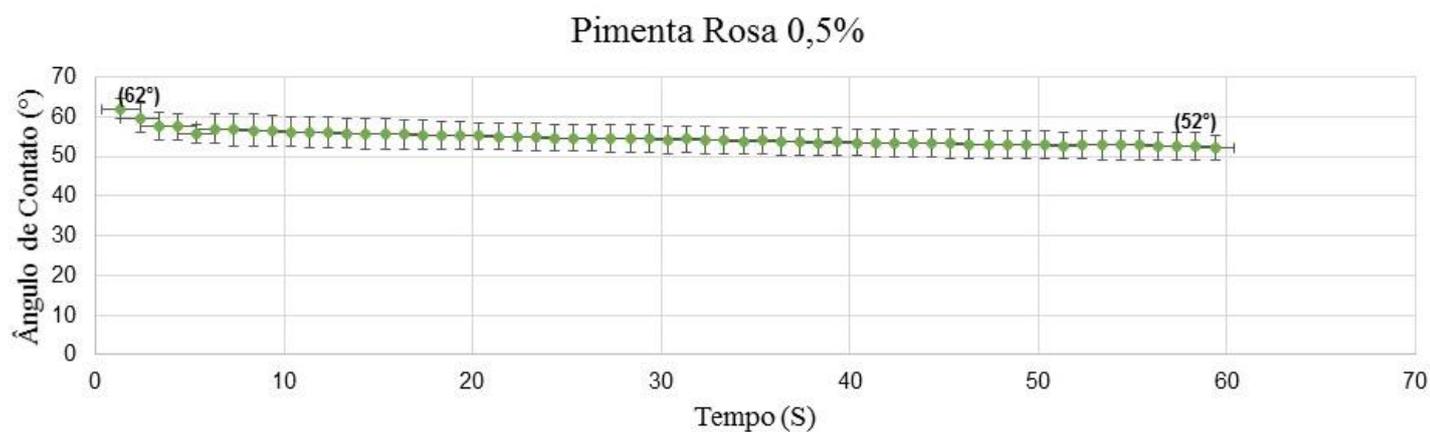


Figura 11. Medida de ângulo de contato em relação ao tempo. Filmes contendo 4% de zeína e 0,5% de óleo essencial de pimenta rosa.

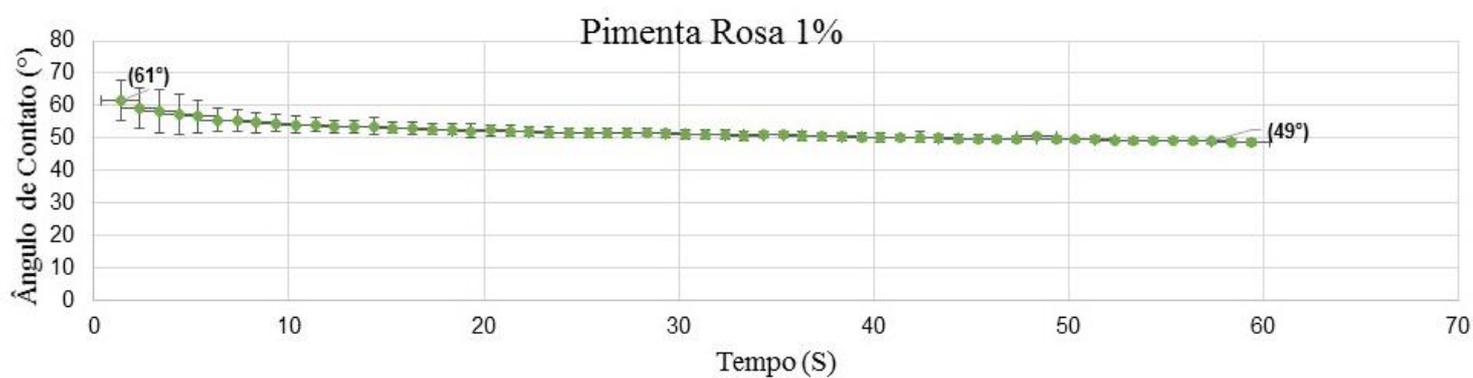


Figura 12. Medida de ângulo de contato em relação ao tempo. Filmes contendo 4% de zeína e 1% de óleo essencial de pimenta rosa.

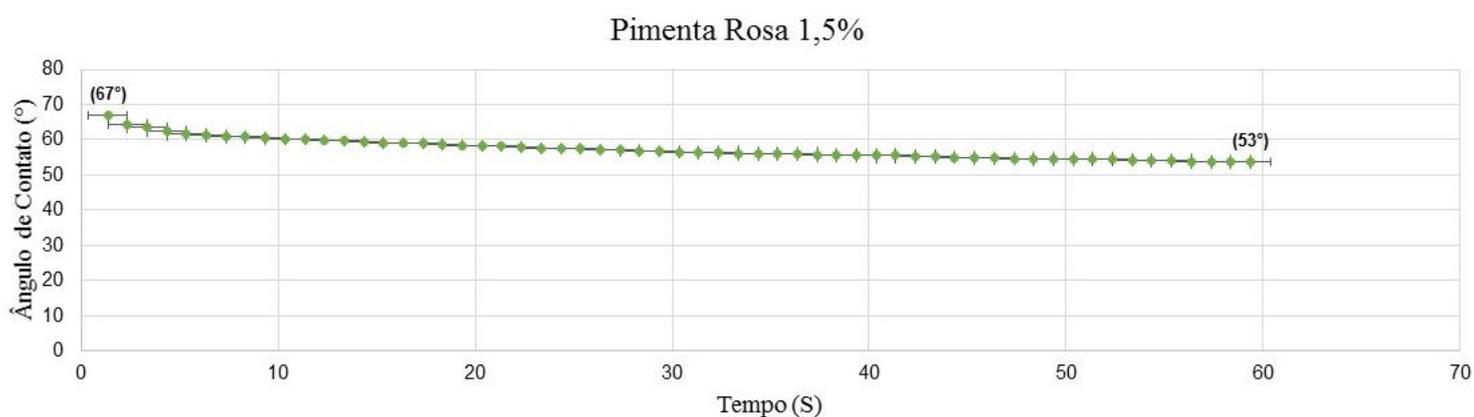


Figura 13. Medida de ângulo de contato em relação ao tempo. Filmes contendo 4% de zeína e 1,5% de óleo essencial de pimenta rosa.

Melaleuca 0,5%

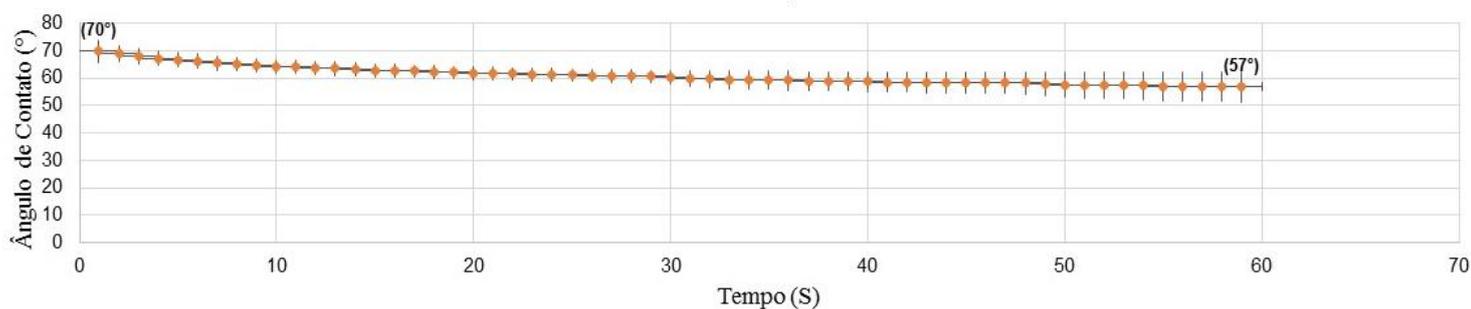


Figura 14. Medida de ângulo de contato em relação ao tempo. Filmes contendo 4% de zeína e 0,5% de óleo essencial de melaleuca.

Melaleuca 1%

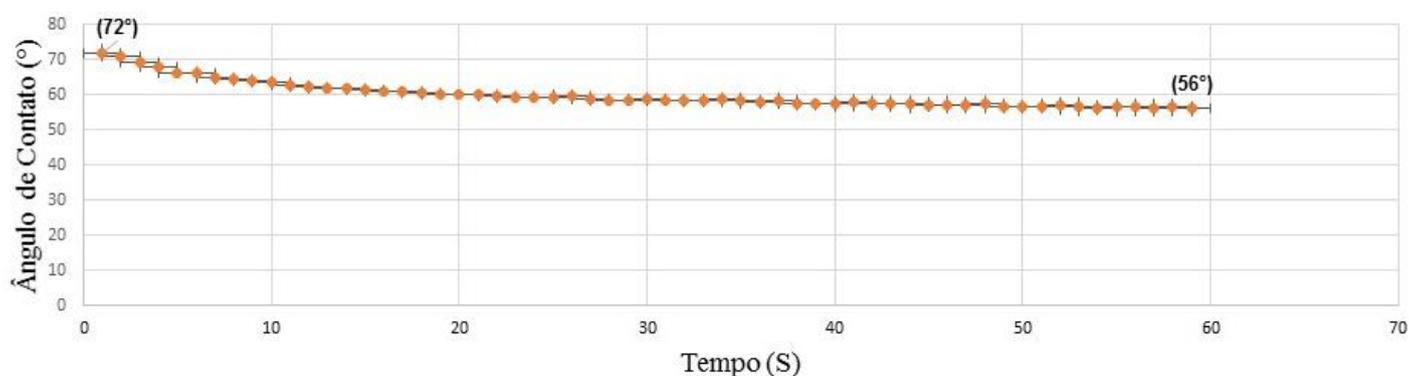


Figura 15. Medida de ângulo de contato em relação ao tempo. Filmes contendo 4% de zeína e 1% de óleo essencial de melaleuca.

Melaleuca 1,5%

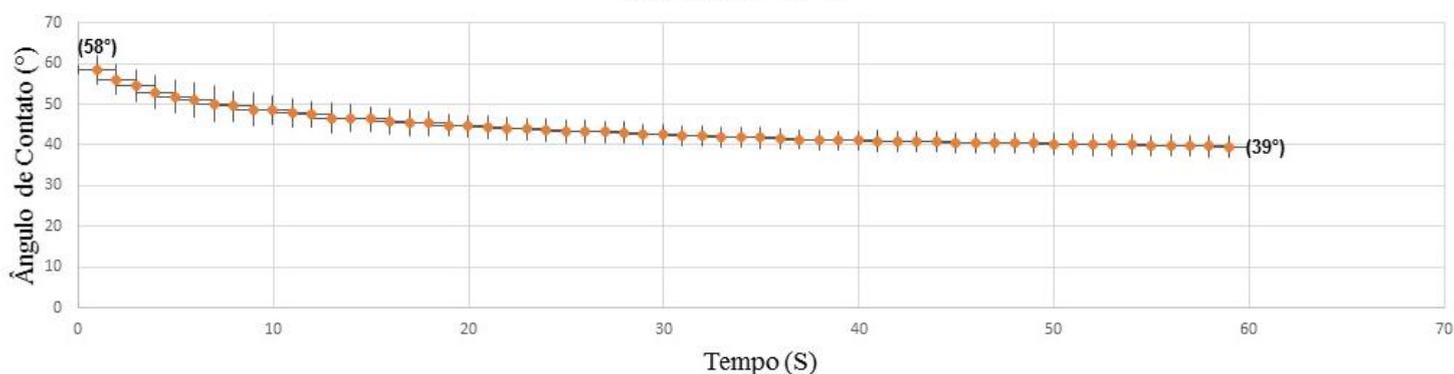


Figura 16. Medida de ângulo de contato em relação ao tempo. Filmes contendo 4% de zeína e 1,5% de óleo essencial de melaleuca.

Tihminlioglu *et al.* (2010) afirma que a hidrofobicidade de superfície dos filmes de zeína depende da formulação do mesmo, incluindo concentração de zeína, concentração de plastificante e o tipo de plastificante. Em nossos resultados

podemos observar que a concentração de zeína não interferiu na hidrofobicidade do material, visto que, filmes com concentração 8 e 4% de zeína mostraram-se hidrofóbicos, entretanto a variação, dependendo da origem do óleo, aumentou ou diminuiu a hidrofobicidade. Quanto maior a concentração de óleo de cravo ou de pimenta rosa menos afinidade pela água o material possui, já o óleo de melaleuca quanto maior a concentração mais hidrofílico é o material.

Park *et al.* (2012) desenvolveram filmes multicamadas de polietileno e zeína incorporados com agentes antioxidantes (timol, carvacrol e eugenol) e polietilenoglicol como plastificante. Observaram em seus resultados que as películas contendo antioxidantes (independentemente do tipo de agente antioxidante utilizado a uma concentração de 3%); apresentaram melhores propriedades de barreira à água quando comparadas as películas laminadas com zeína simples.

Os mesmos autores explicam que o timol, o carvacrol e o eugenol (compostos principais de óleos essenciais de ocorrência natural no tomilho, orégano e cravo), são fortemente hidrofóbicos e interrompem a penetração de moléculas de água. A presença destes componentes deve ser a razão pela qual o óleo de cravo apresentou menor capacidade de absorção de água.

De acordo com Sánchez-González *et al.*, (2011a), o mesmo comportamento foi observado quando os óleos essenciais (bergamota, limão ou óleo melaleuca) foram incorporados em filmes compostos por quitosana e hidroxipropilmetilcelulose. Eles relataram que os valores de permeabilidade de vapor de água dos filmes compostos apresentaram uma diminuição com o aumento da concentração de agente antioxidante hidrofóbico.

5.3 Microscopia de Força Atômica (MFA)

Com o auxílio da microscopia foi possível mapear a superfície do filme de zeína composto por óleos essenciais e assim obter imagens da topografia. As figuras 17 e 18 mostram as imagens topográficas dos filmes contendo 4% de zeína com 0,5% de óleos essenciais de melaleuca e pimenta, respectivamente. As figuras 19 mostram as imagens topográficas do filme contendo 8% de zeína com 0,5% de óleo essencial de cravo e a figura 19B revela pontos escuros indicativo de orifícios. Todas as imagens mostraram que o material apresenta uma matriz contínua com

poucas características de superfície, onde os orifícios indicaram um possível caminho livre para passagem de gases.

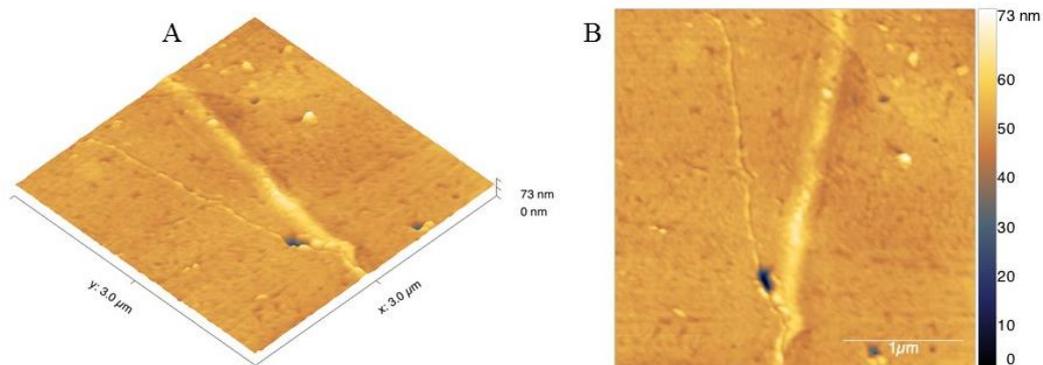


Figura 17. Imagem de MFA da topografia do filme contendo 4% de zeína + 0,5% de óleo de melaleuca. A) imagem 3D e B) imagem 2D.

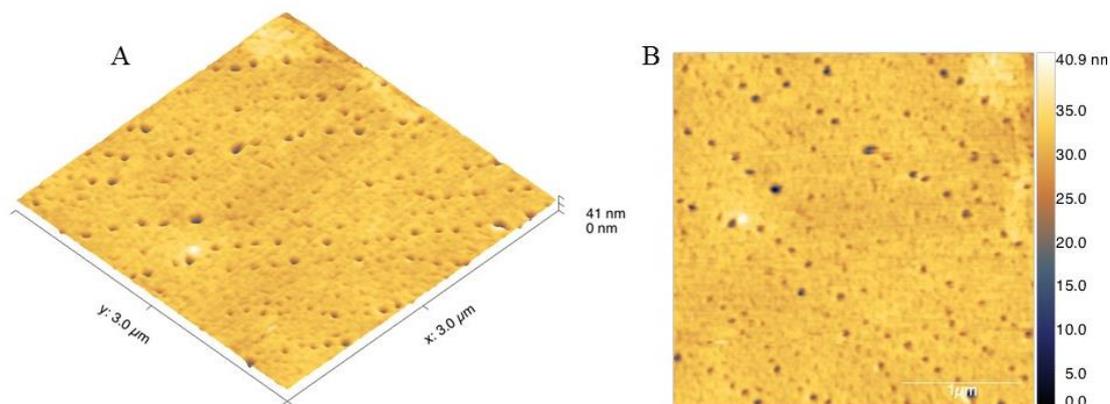


Figura 18. Imagem de MFA da topografia do filme contendo 4% de zeína + de 0,5% de óleo de pimenta rosa. A) imagem 3D e B) imagem 2D.

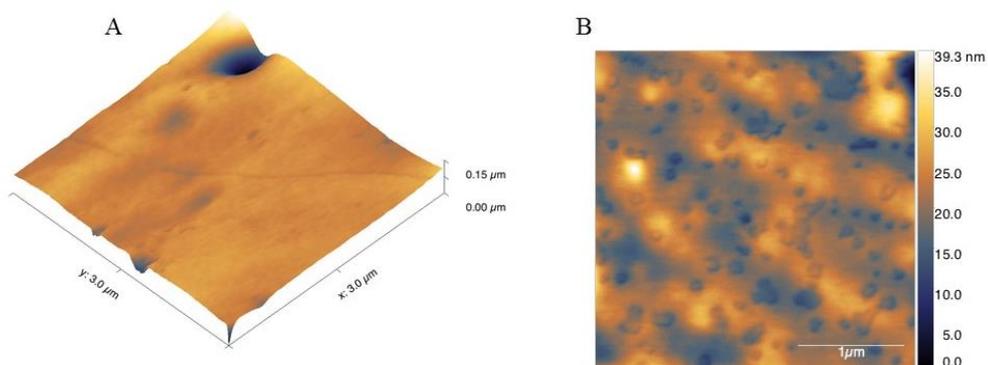


Figura 19. Imagem de MFA da topografia do filme contendo 8% de zeína + 0,5% de óleo de cravo botão. A) imagem 3D e B) imagem 2D.

Portanto, o material contendo 4% de zeína e 0,5% de óleo essencial de melaleuca apresentou-se homogêneo e com poucos orifícios, sendo estas características responsáveis pela diminuição significativa das trocas gasosas. Esse resultado é condizente com o resultado da medida de ângulo de contato, onde o filme é mais hidrofóbico com menores concentrações do óleo essencial de melaleuca na composição do material.

Por outro lado, o filme contendo 8% de zeína e 0,5% de óleo essencial de cravo apresentou-se homogêneo e com muitos orifícios, sendo responsável pelo aumento das trocas gasosas. Esse resultado condiz com o resultado da medida de ângulo de contato, onde o filme é mais hidrofílico com menores concentrações do óleo essencial de cravo na composição do material.

5.4 Análise Sensorial das Castanhas

Na Tabela 2 estão apresentados os resultados referentes às castanhas que foram analisadas após cinco dias do recobrimento.

Para os resultados (3 amostras e 35 respostas) constatou-se que, para que haja diferença significativa entre as amostras ao nível de 5% de significância, a diferença entre o somatório de cada par de amostras deve ser igual ou maior que 20 (ABNT, 1994). Os resultados da análise sensorial mostraram que as castanhas diferiram nos atributos sensoriais cor, brilho e aroma doce ($p < 0,05$).

Verificou-se que para o atributo cor, a castanha do grupo controle apresentou cor mais clara e diferença significativa das demais, cuja coloração foi, na avaliação de ordenação, mais escura. Essa diferença na coloração pode ser justificada pelo revestimento, já que as amostras revestidas não diferem entre si.

Quanto ao brilho, o revestimento contendo pimenta rosa apresentou uma diferença significativa comparada ao controle, ou seja, tal revestimento proporciona um pouco mais de brilho ao produto.

O aroma doce foi significativamente maior para castanha revestida contendo óleo de cravo na formulação.

Em relação ao aroma oleoso, gosto doce, sabor oleoso, crocância e textura não apresentou diferença significativa entre os tratamentos e a amostra controle. As amostras revestidas e sem revestimentos não apresentaram diferença significativa

no atributo preferência, indicando que as castanhas revestidas foram bem aceitas em relação à castanha controle.

Tabela 2. Resultados dos testes de ordenação de diferença e preferência das castanhas revestidas e não revestidas no período de 5 dias.

Atributos	Controle	Pimenta Rosa	Cravo Botão
Cor	50a	71b	89b
Brilho	57a	78b	75ab
Aroma doce	53a	65a	92b
Aroma oleoso	76a	64a	70a
Gosto doce	65a	70a	75a
Sabor oleoso	69a	74a	67a
Crocância	76a	69a	65a
Dureza	78a	69a	63a
Preferência	71a	62a	77a

Valores seguidos de letras iguais na horizontal não diferem significativamente ($p < 0,05$). Diferença mínima ≥ 20 .

Na Tabela 3 estão apresentados os resultados referentes às castanhas analisadas após 30 dias em armazenagem a 50°C. O aumento da temperatura teve como objetivo acelerar o processo de rancificação da castanha.

Para os resultados (4 amostras e 30 respostas) constatou-se que, para que haja diferença significativa entre as amostras ao nível de 5% de significância, a diferença entre o somatório de cada par de amostras deve ser igual ou maior que 26 (ABNT, 1994). Os resultados da análise sensorial mostraram que as castanhas diferiram nos atributos sensoriais cor e aroma doce ($p < 0,05$).

Para o atributo cor somente a amostra revestida com o cravo diferiu significativamente das outras amostras, apresentando-se mais escuras. Após 30 dias o brilho não sofreu alteração; mostrando que o revestimento não causou alteração para essa característica.

O revestimento de cravo para o aroma doce, não diferiu do aroma da melaleuca, mas apresentou diferença significativa comparado ao controle. As duas outras amostras, pimenta rosa e melaleuca, não diferiram do controle.

Quanto ao aroma e sabor oleoso as somatórias foram maiores para o controle, porém entre as quatro amostras não houve diferença significativa.

Após 30 dias o gosto doce não apresentou diferença significativa entre as amostras, portanto, o revestimento não causa alteração significativa no gosto. Em relação a crocância e dureza não houve diferença significativa, dado relevante pois o revestimento não provocou alteração para essas duas características, quando comparado a amostras não revestidas.

Para preferência não houve diferença significativa, portanto, as amostras revestidas são bem aceitas tanto quando a amostra não revestida.

Tabela 3. Somatória dos atributos sensoriais avaliados no teste sensorial de ordenação de diferença e preferência das castanhas no período de 30 dias a 50°C

Castanhas	Cor	Brilho	Aroma doce	Aroma oleoso	Gosto doce	Sabor oleoso	Croc.	Textura	Pref.
Controle	58b	63a	65b	81a	75a	82a	74a	69a	80a
Cravo	100a	89a	91a	73a	67a	68a	75a	82a	72a
Pimenta	66b	68a	64b	67a	89a	65a	70a	61a	78a
Melaleuca	66b	70a	70ab	69a	68a	75a	71a	68a	60a

Valores seguidos de letras iguais na vertical não diferem significativamente ($p < 0,05$). Diferença mínima ≥ 26 .

Observou-se que após 5 dias o aroma oleoso, sabor oleoso, crocância, textura e preferência não diferiram significativamente e mesmo após 30 dias esses atributos não apresentaram alterações significativas. Os resultados mostram que o revestimento não causaram modificações para essas características e que o produto revestido foi bem aceito pelos julgadores.

5.5 Análise de Ácidos Graxos em Óleo de Castanha-do-brasil

Na tabela 4 encontram-se os resultados quantitativos dos teores de ácidos graxos para os tratamentos T0 (castanhas sem tratamento e não submetidas a 50°C no tempo 0) e T28 (castanhas sem tratamento e submetidas a 50°C por 28 dias). Como pode ser observado no tratamento T28 houve perdas dos ácidos graxos C14:0, C16:0, C18:2, C18:1, C18:0 e C20:0.

Tabela 4. Resultados quantitativos expressos em $\mu\text{g mL}^{-1}$ e em variação % para os ésteres metílicos de ácidos graxos presentes no óleo de castanha amostras T0 e T28.

Composto	T0 $\mu\text{g mL}^{-1}$	T 28 $\mu\text{g mL}^{-1}$	Variação %
Mirístico C14:0	2,70	2,00	-25,93
Palmitoleico C16:1	4,60	5,15	11,96
Palmítico C16:0	273,32	251,51	-7,98
Linoleico C18:2	935,77	807,34	-13,72
Oleico C18:1	685,60	645,70	-5,82
Esteárico C18:0	343,17	333,99	-2,68
Araquidônico C20:0	1,87	1,7	-9,1

*valores negativos de Variação % indicam perdas nas quantidades de ácidos graxos com o tempo de armazenamento, enquanto que valores positivos indicam aumento nas quantidades dos ácidos graxos com o armazenamento.

Portanto, os valores em porcentagem para os ácidos graxos encontrados no óleo de castanha bruta foram: mirístico (0,12%), palmitoleico (0,20%), palmítico (12,1%), linoleico (41,6%), oleico (30,5%), esteárico (15,3%) e araquidônico (0,08%). Esses valores são coerentes com a literatura e podem ser comparados com os valores encontrados por Yang (2009) principalmente para os ácidos graxos majoritários, 42,8 e 29,09% para o linoleico e oleico, respectivamente.

Em geral, entre os ácidos graxos insaturados, com exceção do palmitoleico, pode-se observar que o linoleico teve uma maior perda após tratamento térmico. Essa perda dos ácidos graxos com o tempo de armazenamento em temperatura elevada é justificada pelo processo de oxidação. A literatura explica que quanto maior o número de duplas ligações mais susceptível é o óleo a degradação oxidativa (SILVA *et al.*, 1999; Belviso *et al.*, 2017).

No entanto, foi encontrada uma exceção ao comportamento à cima referido, em que houve o aumento de ácido palmitoleico. Provavelmente maiores conteúdos de ácido linoleico foram afetados a esta temperatura elevada, aumentando a porcentagem de ácido graxo insaturado (Amaral *et al.*, 2006).

5.6 Estudo da Oxidação Lipídica por RMN de ^1H

5.6.1 Análise dos Óleos Pré-oxidação

Como já relatado os óleos vegetais são compostos por triacilgliceróis, componentes principais dos óleos. O espectro de RMN de ^1H de qualquer óleo vegetal comestível mostra pelo menos nove sinais de intensidade significativa e, em alguns casos, dez sinais. Estes sinais são referentes a prótons dos componentes principais, isto é, dos triglicerídeos (GULLÉN & RUIZ, 2003).

Tais sinais podem ser observados na figura 20, a qual apresenta o espectro de RMN de ^1H para o óleo da castanha-do-brasil antes da submissão às condições oxidativas (dia 0- Padrão). É indicando acima deste as atribuições dos sinais. O sinal de número 1 em 0,9 ppm é referente aos hidrogênios da metila; o número 2, entre 1,4 e 1,2 ppm é referente aos hidrogênios de grupos metilenos das cadeias alifáticas; o número 3; entre 1,7 e 1,5 ppm, aos hidrogênios do carbono γ do éster; o número 4, entre 2,1 e 1,9 ppm, aos hidrogênios ligados aos carbonos β da dupla ligação entre carbonos; o sinal de número 5, entre 2,3 e 2,2 ppm, aos hidrogênios de carbonos β do éster; o número 6 é referente aos hidrogênios presentes no ácido linoléico. O sinal 7, entre 4,3 e 4,1 ppm são referentes aos hidrogênios ligados aos carbonos do glicerol; o sinal 8 corresponde ao hidrogênio ligado ao carbono de éster; e o sinal 9, entre 5,4 e 5,3 aos hidrogênios ligados aos carbonos que formam duplas ligações. Entre 6,4 a 5,7, ao sistema de dienos conjugados. As atribuições dos sinais da figura 22 pode ser visualizado na Tabela 5 (FORATO *et al.*, 2000; GUILLÉN & RUIZ, 2001; COLZATO *et al.*, 2009; COSTA-SINGH *et al.*, 2012).

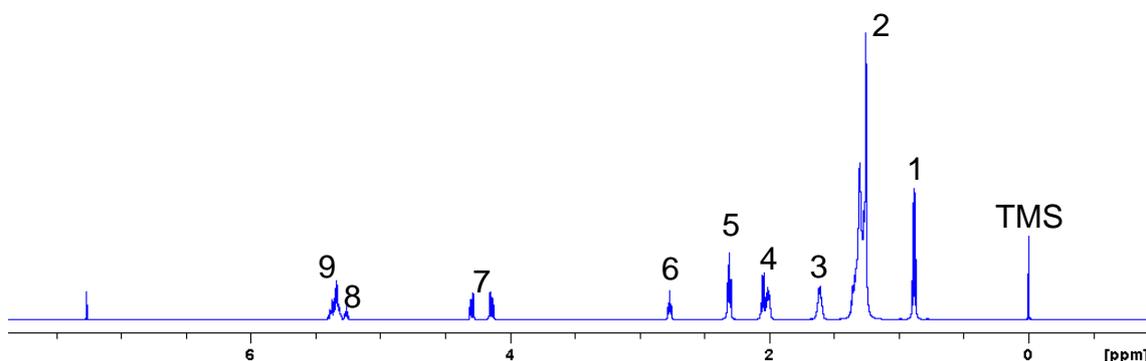


Figura 20. Espectro de RMN de ^1H (600 MHz) do óleo da castanha-do-brasil, antes da submissão às condições oxidativas (dia 0- Padrão). Os números de 1 a 9 são as atribuições dos sinais, sendo o Tetrametilsilano (TMS) como referência.

Tabela 5. Atribuição dos picos do espectro de H1

Deslocamento químico (ppm)	Atribuição
0,90-0,80	$-\text{CH}_3$ grupos acil
1,40-1,15	$-(\text{CH}_2)_n$ - grupos acil
1,70-1,50	$-\text{OCO}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ grupos acil
2,10-1,90	$-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-$ grupos acil
2,35-2,20	$-\text{OCO}-\text{CH}_2-$ grupos acil
2,59-2,43	$>\text{CH}-\text{OOH}-$ (hidroperóxidos)
2,80-2,70	$=\text{HC}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{}$
4,32-4,10	$-\text{CH}_2\text{OCOR}-$ glicerol
5,26-5,20	$>\text{CHOCOR}$
5,40-5,26	$-\text{CH}=\text{CH}-$ grupos acil
5,70; 6,00; 6,13; 6,36	$-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}=\text{CH}-$ (sistema de dienos conjugados)

Fonte: Guillén & Ruiz (2001).

O resultado desta pesquisa para o óleo de castanha-do-brasil no dia 0-Padrão é consistente com a literatura. Colzato *et al.*, (2009), em seus estudos sobre análise comparativa dos espectros de RMN de ^1H de óleos comestíveis oxidados, apresentou o espectro de azeite de oliva indicando as atribuições dos sinais aos núcleos de hidrogênio na estrutura do triglicerídeo, como mostra a figura 21.

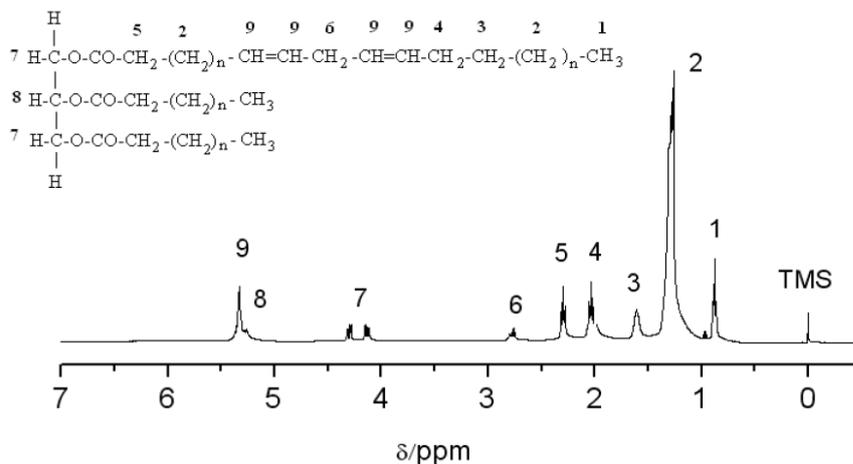


Figura 21. Espectro de RMN de ¹H do azeite de oliva, mostrando a atribuição de sinais na estrutura dos triacilglicericóis (COLZATO *et al.*, 2009).

Portanto, o espectro obtido para o óleo de castanha-do-brasil, sem passar pelo processo de oxidação térmica em estufa é similar ao espectro referente ao triglicerídeo do óleo de azeite de oliva, nos quais os mesmos sinais identificados estão presentes.

5.6.2 Análise dos Óleos após Tratamento Térmico em Estufa

É bem conhecido que ao longo do processo oxidativo ocorrem diferentes reações; é indicado pela literatura que dienos conjugados e hidroperóxidos são os principais produtos iniciais da reação; que resultam da oxidação de ácidos graxos insaturados e demonstraram deslocamentos químicos nas regiões de 6,0 e 8,5 ppm no espectro de RMN (COLZATO *et al.*, 2011).

Desta forma, buscou-se identificar sinais nestas regiões que ao longo do tempo de oxidação alterem a intensidade do sinal. As figuras 22 A e B mostram as regiões de interesse dos espectros de RMN de ¹H, dos óleos de castanha-do-brasil não revestidas com o filme de zeína. As regiões de 6,6 a 5,5ppm e de 9 a 8ppm são atribuídas a dienos conjugados e hidroperóxidos, respectivamente. Pode-se observar em A e B que o Padrão, não submetido a condições de oxidação, apresenta sinais de baixa intensidade, já os sinais observados nos controles são de intensidades maiores, indicando que após tratamento térmico ocorreu a oxidação dos óleos.

Controles (castanhas não revestidas)

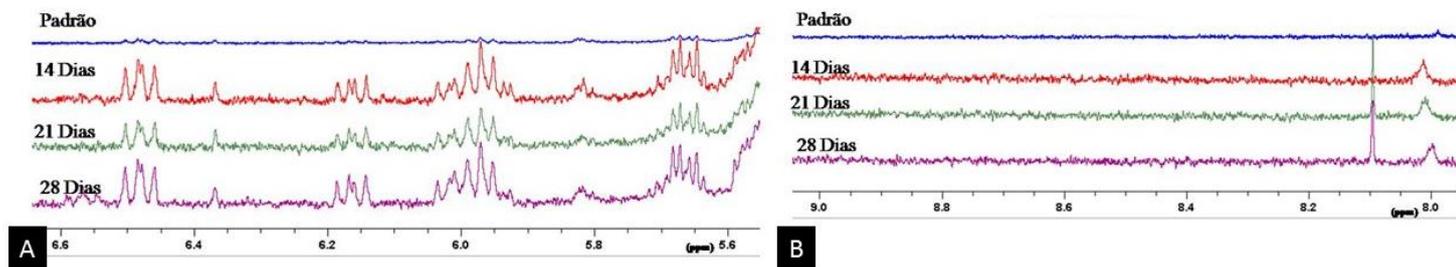


Figura 22. Expansão do espectro de RMN de ^1H para os óleos da castanha-do-brasil sem revestimento. A, região de 6,6 a 5,6ppm atribuídos a dienos conjugados e B região de 9 a 8ppm atribuídos a hidroperóxidos.

As figuras 23 A e B mostram a expansão dos espectros de RMN de ^1H , dos óleos de castanha-do-brasil não revestidas (controle) e revestidas com o filme de zeína e óleos essenciais (melaleuca, cravo e pimenta), após 14 dias de tratamento térmico em estufa. As regiões de 6,6 a 5,5ppm e de 9 a 8ppm são atribuídas a dienos conjugados e hidroperóxidos, respectivamente. Pode-se observar em A e B que houve a formação dos subprodutos de oxidação tanto para o controle quanto para as amostras revestidas com o filme.

14 Dias

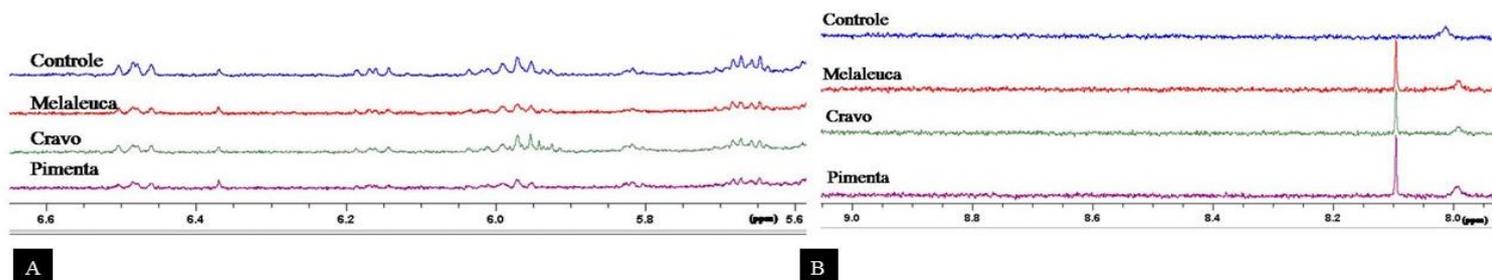


Figura 23. Expansão do espectro de RMN de ^1H para os óleos da castanha-do-brasil não revestidas (controle) e revestidas com o filme de zeína e óleos essenciais (melaleuca, cravo e pimenta), após 14 dias de tratamento térmico em estufa. Em (A), região de 6,6 a 5,6ppm atribuídos a dienos conjugados e em (B), região de 9 a 8ppm atribuídos a hidroperóxidos.

As figuras 24 A e B mostram a expansão dos espectros de RMN de ^1H , dos óleos de castanha-do-brasil não revestidas (controle) e revestidas com o filme de zeína e óleos essenciais (melaleuca, cravo e pimenta), após 21 dias de tratamento térmico em estufa. As regiões de 6,6 a 5,5ppm e de 9 a 8ppm são atribuídas a dienos conjugados e hidroperóxidos, respectivamente. Podemos observar em A e B que houve a formação dos subprodutos de oxidação tanto para o controle quanto para as amostras revestidas com o filme.

21 Dias

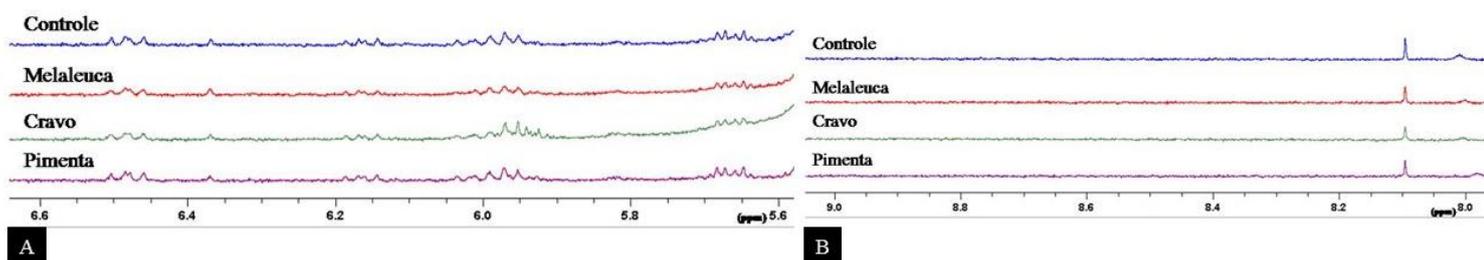


Figura 24. Expansão do espectro de RMN de ^1H para os óleos da castanha-do-brasil não revestidas (controle) e revestidas com o filme de zeína e óleos essenciais (melaleuca, cravo e pimenta), após 21 dias de tratamento térmico em estufa. Em (A), região de 6,6 a 5,6ppm atribuídos a dienos conjugados e em (B), região de 9 a 8ppm atribuídos a hidroperóxidos.

As figuras 25 A e B mostram a expansão dos espectros de RMN de ^1H , dos óleos de castanha-do-brasil não revestidas (controle) e revestidas com o filme de zeína e óleos essenciais (melaleuca, cravo e pimenta), após 28 dias de tratamento térmico em estufa. As regiões de 6,6 a 5,5ppm e de 9 a 8ppm são atribuídas a dienos conjugados e hidroperóxidos, respectivamente. Podemos observar em A e B que houve a formação dos subprodutos de oxidação tanto para o controle quanto para as amostras revestidas com o filme.

28 Dias

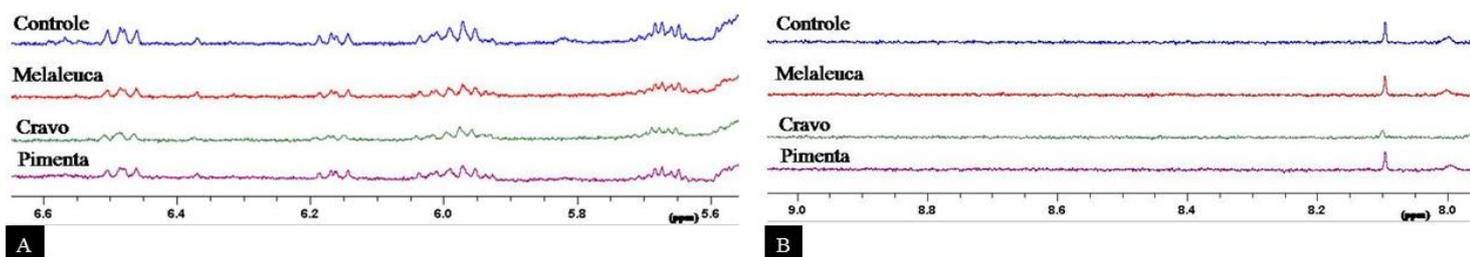


Figura 25. Expansão do espectro de RMN de ^1H para os óleos da castanha-do-brasil não revestidas (controle) e revestidas com o filme de zeína e óleos essenciais (melaleuca, cravo e pimenta), após 28 dias de tratamento térmico em estufa. Em (A), região de 6,6 a 5,6ppm atribuídos a dienos conjugados e em (B), região de 9 a 8ppm atribuídos a hidroperóxidos.

De forma geral, em todas as amostras, os sinais de oxidação foram observados, por isso foi necessário fazer uma análise por integração comparativa de picos.

Foi calculado a integral dos principais picos nas regiões de oxidação (6,6 a 5,6ppm e de 9 a 8ppm), através do software *Free TopSpin processing* e através da média foi calculado a porcentagem de inibição da oxidação através da fórmula: Porcentagem de Inibição = $(C-T)/C \times 100$. Onde, C é média das integrais do controle e T é a média das integrais do teste, sendo o controle representado por castanhas não revestidas pelo filme de zeína.

A figura 26 mostra a taxa de inibição das amostras que foram recobertas com os filmes de zeína contendo a concentração 0,5% dos óleos de pimenta rosa, melaleuca e cravo. Podemos observar que o filme contendo óleo de pimenta rosa foi mais eficaz em 14 dias, cuja taxa de inibição foi de 44%. O filme contendo óleo de melaleuca foi o único que inibiu a oxidação em 14, 21 e 28 dias. O filme de zeína contendo óleo de cravo não foi eficaz contra a oxidação; os valores negativos significa que a área do teste foi maior comparado a área do controle.

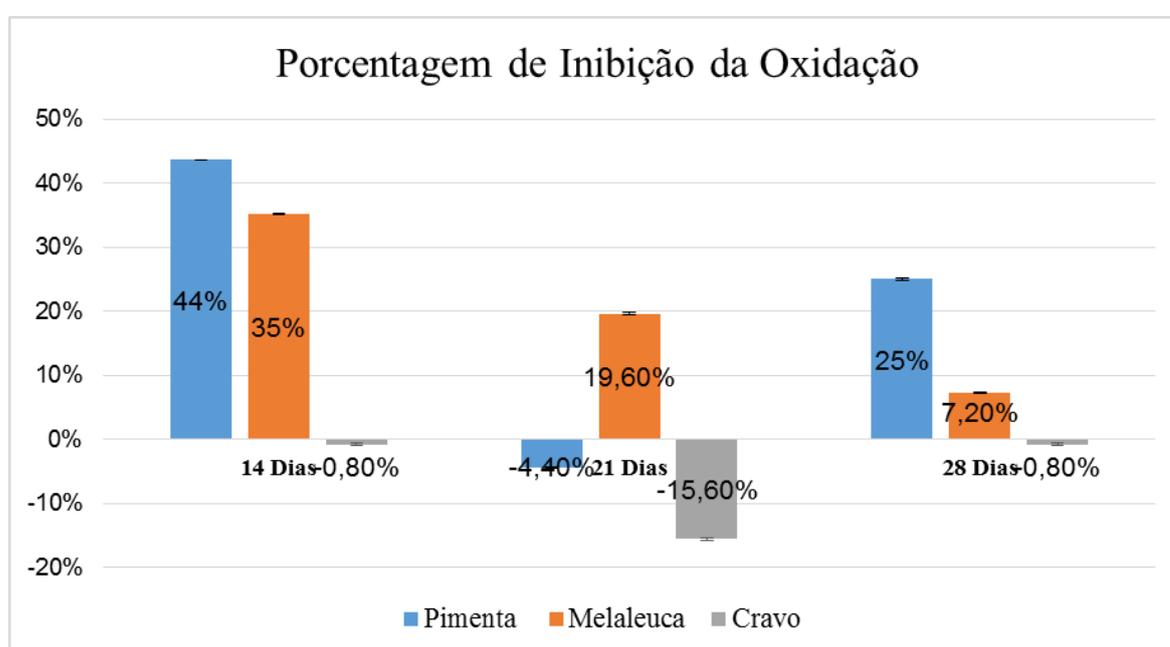


Figura 26. Porcentagem de inibição da oxidação após 14, 21 e 28 dias. O filme de zeína contendo óleo de pimenta rosa apresentou melhor inibição da oxidação em 14 dias. O filme de zeína contendo óleo de melaleuca apresentou inibição em 14, 21 e 28 dias. O filme de zeína contendo óleo de cravo não foi eficaz contra a oxidação.

Portanto, pode ser observado picos indicativos de oxidação nas regiões atribuídas a dienos conjugados e hidroperóxidos, sendo observado tanto nas castanhas não revestidas como também nas castanhas revestidas com os três tratamentos (zeína adicionados de 0,5% de óleos essenciais de melaleuca, cravo e pimenta). Entretanto, após integração dos picos foi observado que os filmes de zeína contendo a concentração de 0,5% de óleo de pimenta rosa e melaleuca foram eficazes contra a oxidação.

5.7 Ação Antifúngica dos Óleos Essências

A partir da média e desvio padrão dos experimentos realizados em triplicata da inibição do crescimento micelial para *Aspergillus flavus*, foram feitos os gráficos (Figura 27, 28 e 29).

A porcentagem indicada é a concentração dos óleos essenciais incorporados ao ágar Saboraud e as barras representam o desvio padrão referente a cada média do resultado. Pode ser observado que o óleo de cravo apresentou a melhor ação antifúngica, pois inibiu 100% do crescimento micelial. Este tratamento foi acompanhado ao longo dos dias e a taxa de inibição permaneceu em 100%. Para o óleo de pimenta rosa a melhor ação antifúngica, de 41%, ocorreu em 3 dias com a concentração de 1,5%. Após 7 dias as concentrações de 0,5% e 1% de óleo de pimenta favoreceram o crescimento micelial, por isso o valor negativo. O crescimento micelial prosseguiu e atingiu o tamanho máximo. Para o óleo de melaleuca a melhor ação ocorreu com 1,5%, cujo efeito foi observado após 15 dias, já a concentração de 0,5% foi perdendo o efeito com o passar dos dias chegando a menor taxa de 12% de inibição.

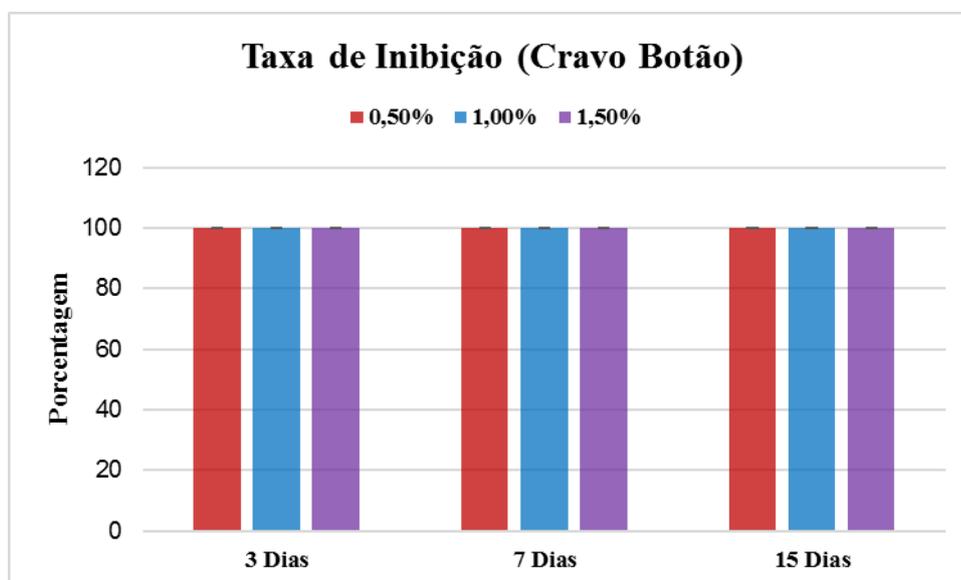


Figura 27. Porcentagem de inibição para *Aspergillus flavus* após 3, 7 e 15 dias de incubação para as três concentrações de óleo essencial de cravo botão, sendo utilizado o controle positivo sem adição de tratamento.

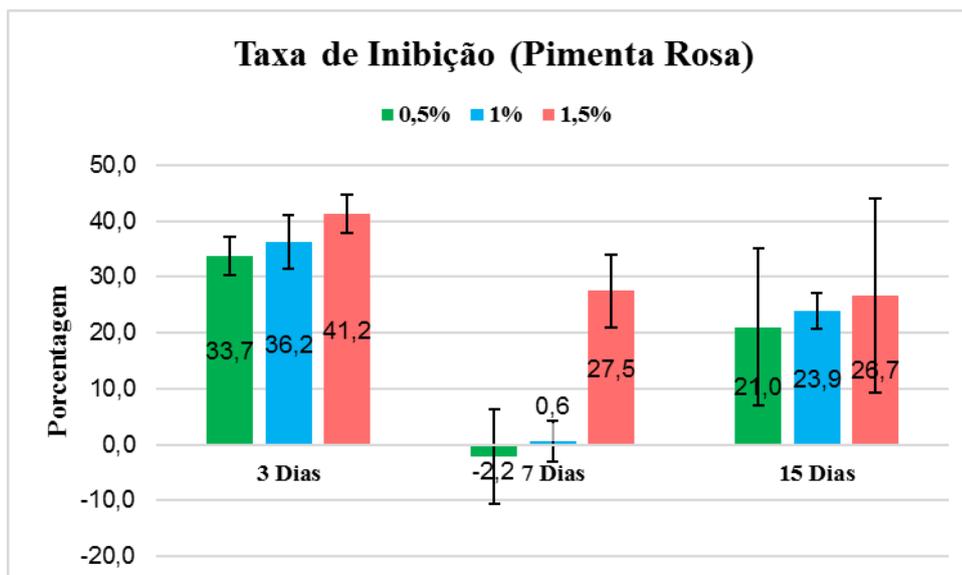


Figura 28. Porcentagem de inibição para *Aspergillus flavus* após 3, 7 e 15 dias de incubação para as três concentrações de óleo essencial de pimenta rosa, sendo utilizado o controle positivo sem adição de tratamento

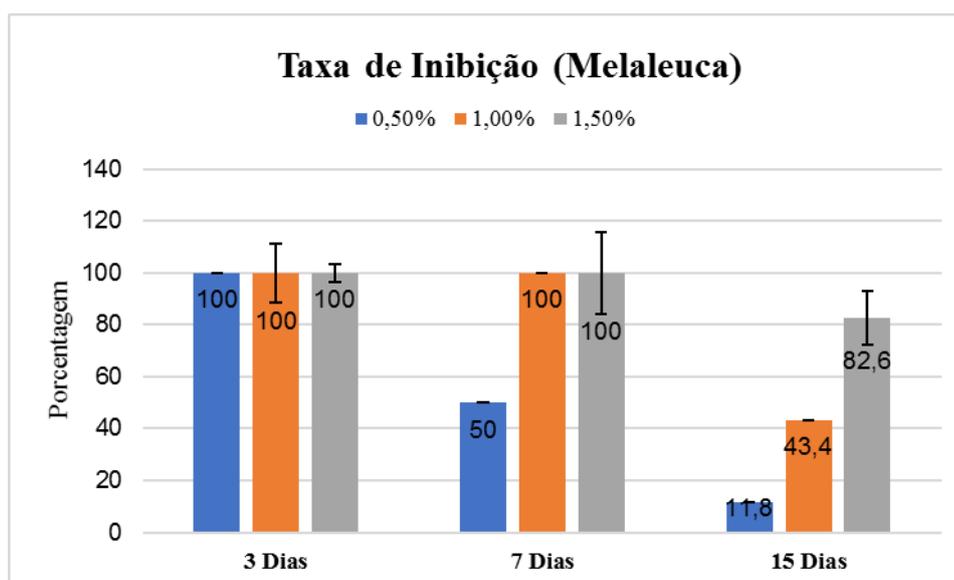


Figura 29. Porcentagem de inibição para *Aspergillus flavus* após 3, 7 e 15 dias de incubação para as três concentrações de óleo essencial de melaleuca, sendo utilizado o controle positivo sem adição de tratamento.

Li *et al.*, (2016) afirmam que com concentrações crescentes, a taxa de morte celular e a duração da fase de atraso de crescimento aumentam de forma correspondente.

6 CONCLUSÕES

- O óleo de cravo adicionado à solução composta por 4% de zeína provocou uma mudança na estrutura do material, apresentando uma maior afinidade pela base, conseqüentemente não se descolou da mesma. Esta aderência ao substrato pode ser indicativo de que o material se adsorva bem sobre as castanhas.
- Quanto à hidrofobicidade, quanto maior a concentração de óleo de cravo e de pimenta rosa mais hidrofóbico é o filme, por outro lado quanto maior a concentração de óleo de melaleuca mais hidrofílico é o filme, ou seja, a propriedade hidrofílica ou hidrofóbica depende da composição do óleo.
- O estudo da topografia de superfície revelou um material homogêneo com presença de poros que podem facilitar a passagem de gases e umidade.
- A análise sensorial mostrou que os revestimentos não alteraram a crocância e a textura das castanhas. O produto revestido com o material composto por zeína e os três tipos de óleos essenciais foram bem aceitos pelos avaliadores.
- A cromatografia gasosa comprovou que os ácidos graxos majoritários são o linoleico e oleico. Por essa técnica pode ser observado a degradação dos ácidos graxos após 28 dias, indicando o processo oxidativo dos óleos.
- O estudo realizado por RMN com óleos extraídos das castanhas indicou a possibilidade de acompanhar a oxidação através dos sinais referentes aos sistemas de dienos conjugados, na região de 6,0 a 9 ppm. Os espectros de ressonância magnética nuclear mostraram evidências comprovando o processo oxidativo tanto das castanhas revestidas quanto das não revestidas. Entretanto, por integração dos picos o revestimento contendo pimenta rosa e melaleuca foram eficazes retardando o processo de oxidação comparado ao controle.
- Quanto à ação antifúngica o óleo de cravo tem ação fungicida e óleo de pimenta rosa tem ação fungistática.

7 PERSPECTIVAS FUTURAS

- Produzir novas formulações com diferentes óleos essenciais e diferentes concentrações.
- Revestir castanhas com as novas formulações e assim submete-las a oxidação acelerada, para posterior avaliação da oxidação lipídica através de RMN 1H.
- Realizar testes por cromatografia gasosa e acompanhar as variações dos ácidos graxos nas amostras tratadas.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 ABNT. ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR: 13170: Teste de ordenação em análise sensorial. Rio de Janeiro, 1994.
- 2 ABNT. ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 12806: **Análise sensorial de alimentos e bebidas –Terminologia**. São Paulo, 1993.
- 3 ALMEIDA, C.B. **Características estruturais e funcionais de biofilmes produzidos com zeína e óleos vegetais comestíveis**. 2010, 100f. Tese (Doutorado em Engenharia e Ciência de Alimentos)- Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, São José do Rio Preto. 2010.
- 4 ALMEIDA, J.J. **Do extrativismo à domesticação: as possibilidades da castanha-do-pará**. 2015, 304 f. Tese (Doutorado em História) - Departamento de História da Faculdade de Filosofia, Letras e Ciências Humanas, Universidade de São Paulo, São Paulo. 2015.
- 5 AMARAL, J.S.; CASAL, S.; SEABRA, R.M.; OLIVEIRA, B.P.P. Effects of roasting on hazelnut lipids. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 4, p. 1315–1321, 2006.
- 6 ANDRADE, P.M.M.; CARMO, M.G.T. Ácidos graxos n-3: um link entre eicosanóides, inflamação e imunidade. **mn-metabólica**, v. 8, n.3, p.135-143,2006
- 7 ANGELINI, P.; PAGIOTTI, R.; MENGHINI, A.; VIANELLO, B. Antimicrobial activities of various essential oils against foodborne pathogenic or spoilage moulds. **Annals of Microbiology**, v. 56, n. 1, p. 65-69, 2006.
- 8 ANTUNES, M.D.C.; CAVACOB, A. The use of essential oils for postharvest decay control. A review. **Flavour Fragrance Journal**, v.25, p.351-366, 2010.
- 9 ARCAN, I.; YEMENICIOGLU, A. Incorporating phenolic compounds opens a new perspective to use zein films as flexible bioactive packaging materials. **Food Research International**, v. 44,n.2, p. 550–556, 2011.
- 10 ARRUS, K.A.; BLANK, G.; ABRAMSON, D.; CLEAR, R.; HOLLEY, R.A. Aflatoxin production by *Aspergillus flavus* in Brazil nuts. **Journal of Stored Products Research**,v. 41,n.5, p.513-527, 2005.
- 11 BAQUIÃO, A.C.; ZORZETE, P.; REIS, T.A.; ASSUNÇÃO, E.; VERGUEIRO, S.; CORRÊA, B. Mycoflora and mycotoxins in field samples of Brazil nuts. **Food Control**, v. 28,n.2, p. 224-229, 2012.

- 12 BAQUIÃO, A.C. Fungos e micotoxinas em castanhas-do-brasil, da colheita ao armazenamento. 2012, 142f. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, universidade de São Paulo, São Paulo. 2012a.
- 13 BARRERA-ARELLANO, D. Estabilidad y utilización de nitrógeno en aceites y grasas. **Grasas y Aceites**, v. 49, n. 1, p.55-63, 1998.
- 14 BARRERA, G. Oxidative stress and lipid peroxidation products in cancer progression and therapy. **International Scholarly Research Network: Oncology**, v. 2012, p.1-21, 2012.
- 15 BELVISO, S.; DALL BELLO, D.; GIACOSA, S.; BERTOLINO, M.; GHIRARDELLO, D.; ROLLE, L.; GERGI, V.; ZEPPA, G. Chemical, mechanical and sensory monitoring of hot air- and infrared-roasted hazelnuts (*Corylus avellana* L.) during nine months of storage. **Food Chemistry**, v. 217, p. 398-408, 2017.
- 16 BENNET, J.W.; KLICH, M. Mycotoxins. **Clinical Of Microbiology Review**, v. 16, p.497–51, 2003.
- 17 BLOCH, F.; HANSEN, W.W.; PACKARD, M. Nuclear induction. **Physical Review**, v.70, n.7, p.460-474, 1946.
- 18 BLOMHOFFI, R.; CARLSEN, M.H.; ANDERSEN, L.F.; JACOBS JR.; D. R. Health benefits of nuts: potential role of antioxidants. **British Journal of Nutrition**, v. 96, n. 2, p.52–60, 2006.
- 19 BLUMA, R.V.; ETCHEVERRY, M.G. Application of essential oils in maize grain: impact on *Aspergillus section Flavi* growth parameters and aflatoxin accumulation. **Food Microbiol**, v. 25, n.2, p. 324-334, 2008.
- 20 BOURTOOM, T.; CHINAN, M.S.; JANTAWAT, P.; SNAGUADEEKUL, R. Effect of plasticizer type and concentration on the edible film from water soluble fish proteins in Surimi wash water. **Food Science and Technology International**, v. 12, n. 2, p. 119 – 162, 2006.
- 21 BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 94, p. 223–253, 2004.
- 22 CACCIONI, D.R.L.; GUIZZARDI, M. Inhibition of germination and growth of fruit and vegetable postharvest pathogenic fungi by essential oil components. **Journal of Essential Oil Research**, v.6, p.173-9, 1994.
- 23 CALDERARI, T.O.; IAMANAKA, B.T.; FRISVAD, J.C.; PITT, J.I.; SARTORI, D.; PEREIRA, J.L.; FUNGARO, M.H.P.; TANIWAKI, M.H. The biodiversity of *Aspergillus section Flavi* in Brazil nuts: From rainforest to consumer. **International Journal of Food Microbiology**, v. 160, p. 267-272, 2013.

- 24 CAMARGO, F.F. Etnoconhecimento e variabilidade morfológica de castanha-do-brasil (*Bertholletia excelsa* Bonpl.: Lecythidaceae) em área da Amazônia mato-grossense. 2010, 127f. Tese (Doutorado em Ciências Florestais e Ambientais) – Departamento de Engenharia Florestal, Universidade Federal de Mato Grosso, Cuiabá. 2010.
- 25 CAMPOS, C.A.; GERSCHENSON, L.N.; FLORES, S.K. Development of edible films and coatings with antimicrobial activity. **Food Bioprocess Technol**, v.4, p.849-875, 2011.
- 26 CARSON, C.F.; HAMMER, K.A.; RILEY, T.V. Melaleuca alternifolia (tea tree) oil: a review of antimicrobial and other medicinal properties. **Clinical Microbiology Reviews**, v.19, n.1, p.50-62, 2006.
- 27 CHEN, Y.; YE, R.; LIU, J. Effects of different concentrations of ethanol and isopropanol on physicochemical properties of zeinbased films. **Industrial Crops and Products**, v. 53, p. 140– 147, 2014
- 28 CHUNHIENG, T.; HAFIDI, A.; PIOCH, D.; BROCHIER, J.; MONTET, D. Detailed study of Brazil nut (*Bertholletia excelsa*) oil micro-compounds: phospholipids, tocopherols and sterols. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v.19, p. 1374–1380, 2008.
- 29 CÍSAROVÁ, M.; TANČINOVÁ, D.; MEDO, J.; KAČANIOVÁ, M. The in vitro effect of selected essential oils on the growth and mycotoxin production of *Aspergillus* species. **J Environ Sci Health B**, v. 51, n. 10, p.668-674, 2016.
- 30 COLLINS, C.H.; BRAGA, G.L.; BONATO, P.S. Introdução a métodos cromatográficos. 7ª edição. Campinas: Editora da Unicamp, 1997.
- 31 COLZATO, M.; FORATO, L.A.; COLNAGO, L.A.; BENEDITO, O.; ASSIS, O.B.G. Identificação de produtos da oxidação de óleos comestíveis através da espectroscopia de RMN de 1H. **BioEng**, v.3 n.3, p.259-268, 2009.
- 32 COLZATO, M.; SCRAMIN, J.A.; FORATO, L.A.; COLNAGO, L.A.; ASSIS, O.B.G. ¹H NMR Investigation of oil oxidation in macadamia nuts coated with zein-based films. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 35, p. 790-796, 2011.
- 33 COSTA-SINGH, T.; BITENCOURT, T.B.; JORGE, N. Caracterização e compostos bioativos do óleo da castanha-de-cutia (*couepia edulis*). **Rev Inst Adolfo Lutz**, v.71, n. 1, p.61-68, 2012.
- 34 DAHLL, R.K. Advances in edible coatings for fresh fruits and vegetables: a review. **Critical Reviews In Food Science And Nutrition**, v.53, p.435–450, 2013.

- 35 D'OVIDIO, R.; MASCI, S. The low-molecular-weight glutenin subunits of wheat gluten. **Journal of Cereal Science**, v. 39, n.3, p. 321-329, 2004.
- 36 DU, W-X.; AVENA-BUSTILLOS, R.J.; MCHUGH, T.H.; LEVIN, C.E.; FRIEDMAN, F. Effects of allspice, cinnamon, and clove bud essential oils in edible apple films on physical properties and antimicrobial activities. **Journal of food science**, v.74, n.7, 2009.
- 37 EMMAMBUX, M.N.; STADING, M. In situ tensile deformation of zein films with plasticizers and filler materials. **Food Hydrocoll**, v. 21, n.8, p. 1245–1255, 2007.
- 38 ESCHE, R.; Müller, L.; Engel, K-H. Online lc-gc-based analysis of minor lipids in various tree nuts and peanuts. **Jornal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, n.47, p. 11636–11644, 2013.
- 39 FAKHOURI, F.M.; FONTES, L.C.B.; GONÇALVES, P.V.M.; MILANEZ, C.R.; STEEL, C.J.; COLLARES-QUEIROZ, F.P. Filmes e coberturas comestíveis compostas à base de amidos nativos e gelatina na conservação e aceitação sensorial de uvas Crimson. **Ciênc. Tecnol. Aliment**, v.27, n.2, p. 369-375, 2007.
- 40 FERNANDEZ, L.; APODACA, E.D.; CEBRIÁN, M.; VILLARÁN, M.C.; MATÉ, J.I. Effect of the unsaturation degree and concentration of fatty acids on the properties of WPI-based edible films. **European Food Research and Technology**, v.224, n. 4, 415-420, 2007.
- 41 FERRARI, C.K.B. Ação lipídica em alimentos e sistemas biológicos: mecanismos gerais e implicações nutricionais e patológicas. **Revista de Nutrição**, v.11, n.1, p.3-14, 1998.
- 42 FERREIRA, A.A.P. Microscopia de força atômica aplicada em imunoenaios. **Química Nova**, v.29, n.1, p.137-142, 2006.
- 43 FORATO, L.A. Estudo das estruturas das zeínas por RMN, FTIR e MFA. Tese (Doutorado) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2000.
- 44 FORATO, L.A.; BICUDO, T.C.; COLNAGO, L.A. Conformation of α zeins in solid state by Fourier transform IR. **Biopolymers (Biospectroscopy)**, v.72, p.421-426, 2003.
- 45 FORATO, L.A.; BRITTO, D.; SCRAMIN, J.A.; COLNAGO, L.A.; ASSIS, O.B.G. Propriedades mecânicas e molhabilidade de filmes de zeínas extraídas de glúten de milho. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 23, n.1, p. 42-48, 2013.
- 46 FREIRE, F.C., KOZAKIEWICZ, Z.; PATERSON, R.R. Mycoflora and mycotoxins in Brazilian black pepper, white pepper and Brazil nuts. **Mycopathologia**, v. 149, p. 13–19, 2000.

- 47 FREITAS, S.P.; SILVA, O.F.; MIRANDA, I.C.; COELHO, M.A.Z. Extração e fracionamento simultâneo do óleo da castanha-do-Brasil com etanol. **Ciênc. Tecnol. Aliment**, v.27, p.14-17, 2007.
- 48 GARBIN, R.P.B.; DEMITTO, F.O.; AMARAL, R.C.R.; FERREIRA, M.R.A.; SOARES, L.A.L.; SVIDZINSKI, T.I.E.; BAEZA, L.C.; OGATTA, S.F.Y. Antifungal potential of plant species from brazilian *caatinga* against dermatophytes. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v. 58, n. 18, p. 2-5, 2014.
- 49 GILLES, M.; ZHAO, J.; AN, M.; AGBOOLA, S. Chemical composition and antimicrobial properties of essential oils of three Australian Eucalyptus species. **Food Chemistry**, v.119, p.731-737, 2010.
- 50 GILLGREN, T.; FAYE, M.V.; STADING, M. Mechanical and barrier properties of films from millet protein pennisetin. **Food Biophysics**, v.6, p. 474-480, 2011.
- 51 GONÇALVES, J.F.; FERNANDES, A.V.; OLIVEIRA, A.F.M.; RODRIGUES, L.F.; MARENCO, R.A. Primary metabolism components of seeds from brazilian amazon tree species. **Brazilian Journal Plant Physiology**, v. 14, n. 2, p. 139-142, 2002.
- 52 GROSSO, A.L.; ASENSIO, C.M.; GROSSO, N.R.; NEPOTE, V. Sensory quality preservation of coated walnuts. **Journal of Food Science**, v.82, n. 1, p. 185-193, 2017.
- 53 GUILLÉN, M.D.; RUIZ, A. High Resolution 1H Nuclear magnetic resonance in the study of edible oils and fats. **Trends Food Sci. Technol**, v.12, p. 328–338, 2001.
- 54 GUILLÉN, M.D.; RUIZ, A. Edible oils: discrimination by 1H nuclear magnetic resonance. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.83, p. 338–346, 2003.
- 55 HAGE, M. C. F. N. S., IWASAKIM. Imagem por ressonância magnética: princípios básicos. **Ciência Rural**, v. 39, n. 4, p. 1287-1295, 2009.
- 56 HERNANDEZ-IZQUIERDO, V.M.; ROCHTA, J.M. Thermoplastic processing of proteins for film formation—a review. **Journal of Food Science**, v. 73, n. 2, p. R30–R39, 2008
- 57 HERRMANN, P.S.P.; SILVA, M.A. P; FILHO, R.B.; JOB. A.E.; COLNAGO, L.A.; FROMMER, J.E.; MATTOSO, L.H.C. Microscopia de varredura por força: uma ferramenta poderosa no estudo de polímeros. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v.7, n.4, p.51-61, 1997.
- 58 HINNEBURG, I.; DORMAN, H.J.; HILTUNEN, R. Antioxidant activities of extracts from selected culinary herbs and spices. **Food Chemistry**, London, v. 97, n. 1, p. 122-129, 2006.

- 59 HOSSAIN, F.; FOLLETT, P.; DANG VU, K.; HARICH, M.; SALMIERI, S.; LACROIX, M. Evidence for synergistic activity of plant-derived essential oils against fungal pathogens of food. **Food Microbiology**, v. 53, p. 24-30, 2016.
- 60 INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Sistema IBGE de recuperação automática: Banco de dados agregados. Disponível em: <<https://sidra.ibge.gov.br/Tabela/289#resultado>>. Acesso em Março 2017.
- 61 JOHANN, S.; PIZZOLATTI, M.G.; DONNICI, C.L.; RESENDE, M.A. Antifungal properties of plants used in Brazilian traditional medicine against clinically relevant fungal pathogens. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.38, n.4, p.632-637, 2007.
- 62 JOHNSON, L.F.; SCHOOLERY, J.N. Determination of unsaturation and average molecular weight of natural fats by nuclear magnetic resonance. **Analytical Chemistry**, v. 34, n. 9, p.1136–1139, 1962.
- 63 JORGE, N.; LUZIA, D.M.M. Caracterização do óleo das sementes de *Pachira aquatica* Aublet para aproveitamento alimentar. **Acta Amazonica**, v. 42, n. 1, p. 149-156, 2012.
- 64 JOSEPH, J. D.; ACKMAN, R. G.; Capillary column gas chromatographic method for analysis of encapsulated fish oils and fish oil ethyl esters Collaborative study. *Journal of AOAC International*, 1992, 75, 488.
- 65 KLICH, M.A. Health effects of Aspergillus in food and air. **Toxicology and Industrial Health**, v. 25, p. 657–667, 2009.
- 66 LADIKOS, D.; LOUGOVOIS, V. Lipid oxidation in muscle foods: A review. **Food Chemistry**, Barking, v.35, p. 295-314, 1990.
- 67 LANÇAS, F.M.; McNAIR, H.M. Cromatografia em fase gasosa 1. Teoria elementar. **Química Nova**, v. 6, n. 1, p. 6-13, 1983.
- 68 LAWTON, J.W. Zein: A history of processing and use. **Cereal Chem**, v. 79, n. 1, p.1-18, 2002.
- 69 LAWTON, J.W. Plasticizers for zein: their effect on tensile properties and water absorption of zein films. **Cereal Chemistry**, v. 81, n. 1, p. 1-5, 2004.
- 70 LI, W.R.; LI, H.L.; SHI, Q.S.; SUN, T.L.; XIE, X.B.; SONG, B.; HUANG, X.M. The dynamics and mechanism of the antimicrobial activity of tea tree oil against bacteria and fungi. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 100, n. 20, p. 8865–8875, 2016.
- 71 LENZI, M.; ORTH, A.I. Caracterização funcional do sistema reprodutivo da aroeiravermelha (*Schinus terebinthifolius* Raddi), em Florianópolis-SC, Brasil. **Rev. Bras. Frutic**, v. 26, n. 2, p. 198-201, 2004.

- 72 LÓPEZ-URIARTE, P.; BULLÓ, M.; CASAS-AGUSTENCH, P.; BABIO, N.; SALAS-SALVADÓ, J. Nuts and oxidation: a systematic review. **Nutrition Reviews**, v. 67, n. 9, p. 497-508, 2009.
- 73 MAGNUSON, S.M.; KELLY, B.; KOPPEL, K.; REID, W.A. Comparison of flavor differences between pecan cultivars in raw and roasted forms. **Journal of Food Science**, v.81, n.5, p. 1243–1253, 2016.
- 74 MARTINEZ, I., AURSAND, M., ERIKSON, U., SINGSTAD, T. E., VELIYULIN, E., VAN DER ZWAAG, C. Destructive and non-destructive analytical techniques for authentication and composition analyses of foodstuffs. **Food Science and Technology**, v. 14, p. 489–498, 2003.
- 75 MARTINS, M. Métodos naturais de detoxificação de micotoxinas em alimentos Amazônicos: guaraná (*Paullinia cupana Kunth*) e castanha-do-Brasil (*Bertholletia excelsa H.B.K.*). 2014, 159 f. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos)-Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis. 2014.
- 76 MORAES, P.C.B.T. Avaliação de iogurtes líquidos comerciais sabor morango: estudo de consumidor e perfil sensorial. 2004. 128 f. Dissertação (Mestrado em Alimentos e Nutrição) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual De Campinas, Campinas. 2004.
- 77 MUNIZ, M.A.P.; SANTOS, M,N.F.; COSTA, C.E.F.; MORAIS, L.; LAMARÃO, M.L.N.; RIBEIRO-COSTA, R.M.; SILVA-JÚNIOR, J.O.C. Physicochemical characterization, fatty acid composition, and thermal analysis of *Bertholletia excelsa* HBK oil. **Pharmacogn Mag**, v.11, n. 41, p.147–151, 2015.
- 78 NEWELL, G.J.; MacFARLANE, J.D. Expanded tables for multiple comparison procedures in the analysis of ranked data. **Journal of Food Science**, v.52, n.6, p. 1721-1725, 1987.
- 79 OLIVEIRA JUNIOR, L.F.G.; SANTOS, R.B.; REIS, F.O.; MATSUMOTO, S.T.; BISPO, W.M.S.; MACHADO, L.P.; OLIVEIRA, L.F.M. Efeito fungitóxico do óleo essencial de aroeira da praia (*Scinus terebinthifolius* Raddi) sobre *Colletotrichum gloeosporioides*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.15, n.1, p.150-157,2013.
- 80 PACHECO, A.M., LUCAS, A., PARENTE, R., PACHECO, N. Association between aflatoxin and aflatoxigenic fungi in Brazil nuts (*Bertholletia excelsa* H.B.K.). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 30, p. 330-334, 2010.
- 81 PARK, H-Y.; KIM, S-J.; KIM, K.M.; YOU, Y-S.; KIM, S.Y.; HAN, J. Development of antioxidant packaging material by applying corn-zein to lldpe film in combination with phenolic compounds. **Journal of Food Science**, v. 77, n.10, p. E273–E279, 2012.
- 82 PAOLI, S.; T.S GIANI, T.S.; PRESTA, G.A.; PEREIRA, M.O.; FONSECA, A.S.; BRANDÃO-NETO, J.; MEDEIROS, A.C.; SANTOS-FILHO, S.D.; BERNARDO-FILHO, M. Effects of clove (*caryophyllus aromaticus* L.) on the labeling of blood

- constituents with technetium-99m and on the morphology of red blood cells. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.50, p.175-182, 2007.
- 83 PAPALIA, I.S.; LONDERO, P.M.G. Extração de zeína e sua aplicação na conservação dos alimentos. **Ciência Rural**, v. 45, n. 2, p.552-559, 2015.
- 84 PASCHE, S.; TEXTOR, M.; MEAGHER, L.; SPENCER, N.D.; GRIESSER, H.J. Relationship between interfacial forces measured by colloid-probe atomic force microscopy and protein resistance of poly (ethylene glycol)-grafted poly (L-lysine) adlayers on niobia surfaces. **Langmuir**, v.21, n.14, p.6508-6520, 2005.
- 85 PAVLATH, A. E.; ORTS, W. Edible Films and Coatings: Why, What, and How? **Edible Films and Coatings for Food Applications**, pp 1-24, 2009.
- 86 PEREIRA, A.A.; CARDOSO, M.G.; ABREU, L.R.; MORAIS, A.R.; GUIMARÃES, L.G.L.; SALGADO, A.P.S.P. Caracterização química e efeito inibitório de óleos essenciais sobre o crescimento de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. **Ciência e Agrotecnologia**, v.32, n.3, p.887-893, 2008.
- 87 PERINI, J.A.L.; STEVANATO, F.B.; SARGI, S.C.; VISENTAINER, J.E.L.; DALALIO, M.M.O.; MATSHUSHITA, M.; SOUZA, N.E.; VISENTAINER, J.V. Ácidos graxos poli-insaturados n-3 e n-6: metabolismo em mamíferos e resposta imune. **Revista de Nutrição**, v.23, n. 6, p. 1075-1086, 2010.
- 88 PENA-SERNA, C.; LOPES-FILHO, J. F. Influence of ethanol and glycerol concentration over functional and structural properties of zeineoleic acid films. **Materials Chemistry and Physics**, v. 142, p. 580-585, 2013.
- 89 PÉROVAL, C.; DEBEAUFORT, F.; DESPRÉ, D.; VOILLEY, A. Edible arabinoxylan-based films. 1. Effects of lipid type on water vapor permeability, film structure, and other physical characteristics. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 3977–3983, 2002.
- 90 PIMENTEL, F.A.; CARDOSO, M.G.; BATISTA, L.R.; GUIMARÃES, L.G. L.; SILVA, D.M. Ação fungitóxica do óleo essencial de *Tanaecium nocturnum* (Barb. Rodr.) Bur. e K. Shum sobre o *Aspergillus flavus* isolado da castanha-do-Brasil (*Bertholletia excelsa*). **Acta Amazonica**, v. 40, n. 1, p.213-120, 2010.
- 91 PINTO, E.; VALE-SILVA, L.; CAVALEIRO, C.; SALQUEIRO, L. Antifungal activity of the clove essential oil from *Syzygium aromaticum* on *Candida*, *Aspergillus* and dermatophyte species. **Journal of medical microbiology**, v.58, p. 1454–1462, 2009.
- 92 PURCELL, E.M.; TORREY, H.C.; POUND, R.V. Resonance absorption by nuclear magnetic moments in a solid. **Physical Review**, n.69, p.37-38, 1946.
- 93 QUINTAVALLA, S.; VICINI, L. Antimicrobial Food Packaging in Meat Industry. **Meat Science**, v.62, p. 373-380, 2002.

- 94 RAMALHO, V.C.; JORGE, N. Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos. **Química Nova**, v. 29, n. 4, p. 755-760, 2006.
- 95 RAPOSO, H.F. Efeito dos ácidos graxos n-3 e n-6 na expressão de genes do metabolismo de lipídeos e risco de aterosclerose. **Rev Nutri**, v. 23, n.5, p. 871-879, 2010.
- 96 REIS, T.A.; BAQUIÃO, A.C.; ATAYDE, D.D.; GRABARZ, F.; CORRÊA, B. Characterization of *Aspergillus section Flavi* isolated from organic Brazil nuts using a polyphasic approach. **Food Microbiol**, v.42, p. 34-39, 2014.
- 97 RIBES, S.; FUENTES, A.; TALENS, P.; BARAT, J.M. Use of oil-in-water emulsions to control fungal deterioration of strawberry jams. **Food Chemistry**, v. 211, p. 92-99, 2016.
- 98 RINALDI, R.; GARCIA, C.; MARCINIUK, L.L.; ROSSI, A.V.; Schuchardt, U. Síntese de Biodiesel: uma proposta contextualizada de experimento para laboratório de química geral. **Química Nova**, v.30, n. 5, p. 1374-1380, 2007
- 99 RYAN, E.; GALVIN, K.; O'CONNOR, T.P.; MAGUIRE, A.R.; O'BRIEN, N.M. Fatty acid profile, tocopherol, squalene and phytosterol content of Brazil, pecan, pine, pistachio and cashew nuts. **International Journal of Food Science and Nutrition**, v. 57, p. 219-228, 2006.
- 100 SAMPAIO, C.R.P. Desenvolvimento e estudo das características sensoriais e nutricionais de barras de cereais fortificadas com ferro. 88 p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos, Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, 2009.
- 101 SÁNCHEZ-GONZÁLEZ, L.; VARGAS, M.; GONZÁLEZ-MATINEZ, C.; CHIRALT, A.; CHÁFER, M. Use of essential oils in bioactive edible coatings. **Journal Food Engineering Reviews**, v.3, p.1-16, 2011.
- 102 SÁNCHEZ-GONZÁLEZ, L.; CHIRALT, A.; GONZÁLEZ-MATINEZ, C.; CHÁFER, M. Effect of essential oils on properties of film forming emulsions and films based on hydroxypropylmethylcellulose and chitosan. **Journal of Food Engineering**, v. 105, p. 246-253, 2011a.
- 103 SÁNCHEZ-ORTEGA, I.; GARCÍA-ALMENDÁREZ, B.E.; SANTOS-LÓPEZ, E.M.; AMARO-REYES, A.; BARBOZA-CORONA, J.E.; REGALADO, C. Review article antimicrobial edible films and coatings for meat and meat products preservation. **The Scientific World Journal**, v. 2014, p. 1-18, 2014.
- 104 SANTOS, O.V. Estudo das potencialidades da castanha-do-brasil: produtos e subprodutos. 2012, 214 f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, São Paulo. 2012.

- 105 SANTOS, O.V.; CORRÊA, N.C.F.; SOARES, F.A.S.M.; GIOIELLI, L.A.; COSTA, C.E.F.; LANNES, S.C.S. Chemical evaluation and thermal behavior of Brazil nut oil obtained by different extraction processes. **Food Research International**, v. 47, p. 253–258, 2012.
- 106 SCRAMIN, J.A.; BRITO, D.; FORATO, L.A.; BERNARDES-FILHO, R.; COLNAGO, L.A.; ASSIS, O.B.G. Characterisation of zein–oleic acid films and applications in fruit coating. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 46, p. 2145–2152, 2011.
- 107 SERNA, C.P.; FILHO, J.F.L. Biodegradable zein-based blend films: structural, mechanical and barrier properties. **Food Technol. Biotechnol**, v.53, n.3, p. 348–353, 2015.
- 108 SILVA, F.A.M.; BORGES, M.F.M.; FERREIRA, M.A. Métodos para avaliação do grau de oxidação lipídica e da capacidade antioxidante. **Química Nova**, v.22, n.1, 1999.
- 109 SILVA, R.F.; ASCHERI, J.L.A.; SOUZA, J.M.L. Influence of Brazil nut processing on the quality of nuts. **Science and agro-technology**, v. 34, n. 2, p. 445-450, 2010.
- 110 SILVA, O.F.; VENÂNCIO, A. Brazil nuts: Benefits and risks associated with contamination by fungi and mycotoxins. **Food Research International**, v.44, p. 1434-1440, 2011.
- 111 SILVA, A.E.S. Identificação e quantificação via técnicas cromatográficas e ácidos graxos com potencial farmacológico em frutos amazônicos. 2012, 87 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Autarquia Associada à Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.
- 112 SKOOG, D.A, WEST, D.M., HOLLER, F.J., CROUCH, S.R. Fundamentos de Química Analítica. 8ª edição. Editora Thomson, 2006.
- 113 SOUZA, A.D.; ROGGIERO, T.U.; FURLAN, M.R.; AOYAMA, E.M. Óleo de melaleuca (*Melaleuca alternifolia* Maiden & Betche, Cheel) no controle de cercosporiose em beterraba. **Rev. Bras. Pl. Med**, v.17, n.4, p.1078-1082, 2015.
- 114 STOCKLER-PINTO, M.B.; MAFRA, D.; MORAES, C.; LOBO, J.; BOAVENTURA, G.T.; FARAGE, N.E.; SILVA, W.S.; COZZOLINO, S.F.; MALM, O. Brazil nut (*Bertholletia excelsa*, H.B.K.) improves oxidative stress and inflammation biomarkers in hemodialysis patients. **Biological Trace Element Research**, v. 158, n. 1, p.105-112, 2014.
- 115 SU, J-F.; HUANG, Z.; YUAN, X-Y.; LI, M. Structure and properties of carboxymethyl cellulose/soy protein isolate blend edible films crosslinked by Maillard reactions. **Carbohydrate Polymers**, v.79, p. 145-153, 2010.

- 116 SUBRAMANIAN, S.; SAMPATH, S. Adsorption of zein on surfaces with controlled wettability and thermal stability of adsorbed zein films. **Biomacromolecules**, v. 8, p. 2120–2128, 2007.
- 117 SUKAMOT, R.Y.; TAKAHASHI, N.S. Ômega-3: Tudo, ou quase tudo, que você queria saber mas não tinha a quem perguntar. Disponível em <http://formatacaoabnt.blogspot.com.br/2011/10/referencias.html>. Acesso em: Fevereiro, 2017.
- 118 TANIWAKI, M.H.; FRISVAD, J.C.; FERRANTI, L.S.; SOUZA L.A.; LARSEN, T.O.; FUNGARO, M.H.; IAMANAKA, B.T. Biodiversity of mycobiota throughout the Brazil nut supply chain: From rainforest to consumer. **Food Microbiol**, v. 61, p.12-22, 2017.
- 119 TEIXEIRA, L.V. Análise sensorial na indústria de alimentos. **Rev. Inst. Latic. “Cândido Tostes”**, v. 66, n.366, p. 12-21, 2009.
- 120 TERZI, V.; MORCIA, C.; FACCIOLI, P.; VALÈ, G.; TACCONI, G.; MALNATI, M. In vitro antifungal activity of the tea tree (*Melaleuca alternifolia*) essential oil and its major components against plant pathogens. **Letters in Applied Microbiology**, v. 44, n. 6, p. 613-618, 2007.
- 121 TORRES, K.A.; LIMA, S.M.; UEDA, S.M. Activity of the aqueous extract of *Schinus terebinthifolius* Raddi on strains of the *Candida* genus. **Rev Bras Ginecol Obstet**, v. 38, n. 12, p. 593-599, 2016.
- 122 TIHMINLIOGLU, F.; ATIK, I.D.; ÖZEN, B. Water vapor and oxygen-barrier performance of corn–zein coated polypropylene films. **Journal of Food Engineering**, v. 96, p. 342–347, 2010.
- 123 TURAZAN, H.; KOKINI, J.L. Advances in understanding the molecular structures and functionalities of biodegradable zein-based materials using spectroscopic techniques: A review. **Biomacromolecules**, p. 1-74, 2016.
- 124 TYAGI, A.K.; MALIK, A. Antimicrobial potential and chemical composition of *Mentha piperita* oil in liquid and vapour phase against food spoiling microorganisms. **Food Control**, v.22, p.1707-1714, 2011.
- 125 TZORTZAKIS, N.G.; ECONOMAKIS, C.D. Antifungal activity of lemongrass (*Cymbopogon citratus* L.) essential oil against key postharvest pathogens. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v.8, p.253-8, 2007.
- 126 VARGAS, M.P.C.; CHIRALT, A.; McCLEMENTS, D.J.; GONZÁLEZ-MARTÍNEZ, C. Recent advances in edible coatings for fresh and minimally-processed fruit. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 28, p. 496–511, 2008.

- 127 VENKATACHALAM, M.; SATHE, S.K. Chemical composition of selected edible nut seeds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, p. 4705-4714, 2006.
- 128 VIANNI, R.; BRAZ-FILHO, R. Ácidos graxos naturais: importância e ocorrência em alimentos. **Química Nova**, v.19, n. 4, 1996.
- 129 VIEIRA, T.R.; BARBOSA, L.C.A.; MALTHA, C.R.A. Constituintes químicos de melaleuca alternifolia (myrtaceae). **Quim. Nova**, v. 27, n. 4, p. 536-539, 2004.
- 130 WADT, L. H. O., KAINER, K. A., STAUDHAMMER, C. L., & Serrano, R. O. P. Sustainable forest use in Brazilian extractive reserves: Natural regeneration of Brazil nut in exploited populations. **Biological Conservation**, v. 141, p. 332-346, 2008.
- 131 WANG, Y.; PADUA, G.W. Water barrier properties of zein-oleic acid films. **Cereal Chemistry**, v. 83, n. 4, 2006.
- 132 WANG, H.J.; FU, J.X.; WANG, J.Y. Effect of water vapor on the surface characteristics and cell compatibility of zein films. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 69, n. 1, p.109-115, 2009.
- 133 WANG, S.; ADHIKARI, K.; HUNG, Y.C. Acceptability and preference drivers of freshly roasted peanuts. **Journal of Food Science**, v.82, n. 1, p. 174-184, 2017.
- 134 WĄSOWICZ, E.; GRAMZA, A.; HEŚ, M.; JELEŃ, H.H.; KORCZAK, J.; MATECKA, M.; MILDNER-SZKUDLARZ, S.; RUDZIŃKA, M.; SAMOTYJA, U.; ZAWIRSKAWOJTASIAK, R. Oxidation of lipids in food. **Polish Journal of Food and Nutrition Sciences**, v. 13/54, n. 1, p. 87-100, 2004.
- 135 WISHART, D.S. Characterization of biopharmaceuticals by NMR spectroscopy. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 48, p. 96-111, 2013.
- 136 YANG, J. Brazil nuts and associated health benefits: a review. **LWT Food Science and Technology**, v. 42, p. 1573-1580, 2009.
- 137 YOSHINO, T.; ISOBE, S.; MAEKAWA, T. Influence of preparation conditions on the physical properties of zein films. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v. 79, n. 4, p. 345-349, 2002.
- 138 ZAJDENWERG, C.; BRANCO, G.F.; ALAMED, J.; DECKER, E.A.; CASTRO, I.A. Correlation between sensory and chemical markers in the evaluation of Brazil nut oxidative shelf-life. **European Food Research and Technology**, v. 233, n. 1, p. 109-116, 2011.
- 139 ZAMBONELLI, A.; AULERIO, A.Z.; BIANCHI, A.; ALBASINI, A. Effects of essential oils on phytopathogenic fungi in vitro. **Journal of Phytopathology**, v. 144, p. 491-494, 1996.

- 140 ZOLLNER, P.; MAYER-HELM, B. Trace mycotoxin analysis in complex biological and food matrices by liquid chromatography.atmospheric pressure ionization mass spectrometry. **Journal of Chromatography**, v. 1136, p. 123-169, 2006.

Anexo A – Ficha Técnica Óleo de Pimenta Rosa



FICHA TÉCNICA

PRODUTO	: ÓLEO DE PIMENTA ROSA
(NOME CIENTIFICO : SCHINUS TEREBINTHIFOLIUS)	
CAS	: 8006-82-4
COMPANHIA	: DESTILARIA BAURU /
ORIGEM	: BRASIL
LOTE	: DBAM-PRSCH 280116
ENVASE	: Janeiro 2016
VALIDADE	: Janeiro 2018

Propriedades Organolépticas

APARÊNCIA	: Líquido Límpido Amarelo Claro
ODOR	: <i>Característico de Spice</i>

Físico Químico Propriedades

DENSIDADE (20° C)	: 0,895
ÍNDICE DE REFRAÇÃO (20°C)	: 1,490
ÍNDICE DE ACIDEZ (mg KOH/g)	: Máximo 2

ALFA PINENO (G.C) : 15- 25 % (Área %)

ARMAZENAGEM : Manter recipiente bem fechado , armazenado em local fresco e arejado , ao abrigo da luz

PRAZO VALIDADE : Sob condições normais de armazenagem : 24 meses , após fabricação .

EMBALAGEM : Bombonas Plásticas de Polietileno , nas seguintes capacidades : 05 Lt / 25 Lt / 50 Lt / 190 Lt

CRQ 0453779

Anexo B– Ficha Técnica Óleo de Cravo Botão

**CERTIFICADO DE ANÁLISE**

PRODUTO : ÓLEO DE CRAVO BOTÃO
COMPANIA : DESTILARIA BAURU LTDA
ORIGEM : BRASIL
LOTE : DBSNST-CRBT 0316
FABRICAÇÃO : MARÇO 2016
VALIDADE : MARÇO 2018

Propriedades Organolépticas

APARÊNCIA : Líquido Límpido, Amarelo Claro 'a Marrom
ODOR : *Característico*

Físico Químico Propriedades

DENSIDADE (20° C) : 1,038-1,060 Resultado : (1,044)
ÍNDICE DE REFRAÇÃO (20°C) : 1,525- 1,545 Resultado : (1,532)
ROTAÇÃO OPTICA : 0 a -3° (Resultado : 0)
ÍNDICE DE ACIDEZ (mg KOH/g) : Máximo 3
SOLUBILIDADE Alcool 80% : Solúvel até 3 Partes
ÁLCOOL TOTAL (EUGENOL) : 70% 'a 90 % (Resultado : 85,13 %)
CARIOFLIENO: Max. 15 (Resultado : 11,00 %)

ARMAZENAGEM : Manter recipiente bem fechado , armazenado em local fresco e arejado , ao abrigo da luz .

PRAZO VALIDADE : Sob condições normais de armazenagem : 24 meses , após fabricação .

EMBALAGEM : Bombonas Plásticas de Polietileno , nas seguintes capacidades : 01 Lt / 05 Lt /20 Lt /50 Lt /190 Lt, Net.

Temperatura recomendada para armazenagem : Máximo 25° C

CRQ – 04403511

Anexo C – Ficha Técnica Óleo de Melaleuca



FICHA TÉCNICA DE PRODUTO

PRODUTO	: ÓLEO DE MELALEUCA (TEA TREE)
COMPANIA	: DESTILARIA BAURU LTDA
ORIGEM	: BRASIL
LOTE	: DBLFF-MLCN 030316
FABRICAÇÃO	: 03/03/2016
VALIDADE	: 03/03/2018

Propriedades Organolépticas

APARÊNCIA	: Líquido Límpido, Sem Cor 'A Amarelo Claro
ODOR	: <i>Característico , Picante</i>

Físico Químico Propriedades

DENSIDADE (20° C)	: 0,890
ÍNDICE DE REFRAÇÃO (20°C)	: 1,477
ROTAÇÃO ÓTICA (°)	: + 9,8 °
ÍNDICE DE ACIDEZ (mg KOH/g)	: Máximo 2
SOLUBILIDADE Alcool 80%	: Insolúvel Água ,Solúvel Ethanol
TERPINOLENO(G.C)	: 3,56% (Área %)
Y- TERPINENO	: 19,85 % (Area %)
TERPINEN-4 -OL (G.C)	: 32,50 %(Área %)

ARMAZENAGEM : Manter recipiente bem fechado , armazenado em local fresco e arejado , ao abrigo da luz

PRAZO VALIDADE : Sob condições normais de armazenagem : 24 meses , após fabricação .

EMBALAGEM :Bombonas Plásticas de Polietileno , nas seguintes capacidades : 01 LT /05 LT /20 LT /50 LT / 180 LT, NET.

CRQ 0453779

Anexo E - Valores críticos para comparação com os módulos das diferenças entre as somas das ordens do teste de ordenação, a 5% de significância.

Nº de julgamentos	nº de amostras ou tratamentos									
	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
5	8	11	14	17	21	24	27	30	34	37
6	9	12	15	19	22	26	30	34	37	42
7	10	13	17	20	24	28	32	36	40	44
8	10	14	18	22	26	30	34	38	43	47
9	10	15	19	23	27	32	36	41	46	50
10	11	15	20	24	29	34	38	43	48	53
11	11	16	21	25	30	35	40	45	51	56
12	12	17	22	27	32	37	42	48	53	58
13	12	18	23	28	33	39	44	50	55	61
14	13	18	24	29	34	40	46	52	57	63
15	13	19	24	30	36	42	47	53	59	66
16	14	19	25	31	37	42	49	55	61	67
17	14	20	26	32	38	44	50	56	63	69
18	15	20	26	32	39	45	51	59	65	71
19	15	21	27	33	40	46	53	60	66	73
20	15	21	28	34	41	47	54	61	68	75
21	16	22	28	35	42	49	56	63	70	77
22	16	22	29	36	43	50	57	64	71	79
23	16	23	30	37	44	51	58	65	73	80
24	17	23	30	37	45	52	59	67	74	82
25	17	24	31	38	46	53	61	68	76	84
26	17	24	32	39	46	54	62	70	77	85
27	18	25	32	40	47	55	63	71	79	87
28	18	25	33	40	48	56	64	72	80	89
29	18	26	33	41	49	57	65	73	82	90
30	19	26	34	42	50	58	66	75	83	92
31	19	27	34	42	51	59	67	76	85	93
32	19	27	35	43	51	60	68	77	85	95
33	20	27	36	44	52	61	70	78	87	96
34	20	28	36	44	53	62	71	79	89	98
35	20	28	37	45	54	63	72	81	90	99
36	20	29	37	46	55	63	73	82	91	100
37	21	29	38	46	55	64	74	83	92	102
38	21	29	38	47	56	65	75	84	94	103
39	21	30	39	48	57	66	76	85	95	105
40	21	30	39	48	57	67	76	86	96	106
41	22	31	40	49	58	68	77	87	97	107
42	22	31	40	49	59	69	78	89	98	109
43	22	31	41	50	60	69	79	89	99	110
44	22	32	41	51	60	70	80	90	101	111
45	23	32	41	51	61	71	81	91	102	112
46	23	32	42	52	62	72	82	92	103	114
47	23	33	42	52	62	72	83	93	104	115
48	23	33	43	53	63	73	84	94	105	116
49	24	33	43	53	64	74	85	95	106	117
50	24	34	44	54	64	75	85	95	107	118
55	25	35	46	56	67	78	90	101	112	124
60	26	37	48	59	70	82	94	105	117	130
65	27	38	50	61	73	85	97	110	122	135
70	28	40	52	64	76	88	101	114	127	140
75	29	41	53	66	79	91	105	118	131	145
80	30	42	55	68	81	94	108	122	136	150
85	31	44	57	70	84	97	111	125	140	154
90	32	45	58	72	86	100	114	129	144	159
100	34	47	61	76	91	105	121	136	151	167

Fonte: ABNT – NBR 13170, 1994.

**Anexo F - Análise de Ácidos Graxos em Óleo de Castanha-do-brasil
cedido por prof. Dr. Stanislau Bogusz Junior**

- Condições Cromatográficas

As condições cromatográficas utilizadas foram: injetor a 260 °C, modo splitless; gás de arraste hélio a 0,6 mL min⁻¹; rampa de temperatura: 100 °C por 0,5 minutos, com incremento de 3 °C min⁻¹ até 260 °C, interface a 260 °C e fonte de ionização por elétrons (+70 eV) à 200° C. A identificação dos FAME foi realizada com uso dos seguintes padrões autênticos de ésteres metílicos de ácidos graxos: C14:0 (miristato de metila), C16:1 (palmitoleato de metila), C16:0 (palmitato de metila), C18:0 (estearato de metila), C18:1 (oleato de metila), C18:2 (linoleato de metila), C20:0 (eicosanoato de metila). O padrão interno utilizado nas análises foi o FAME C23:0 (tricosanoato de metila). Na Tabela 1 podem ser observados os íons monitorados para cada éster metílico de ácido graxo presente na composição do óleo de Castanha do Pará.

Tabela 1. Íons monitorados para quantificação no modo SIM por GC-MS.

Composto	Íons monitorados*
	QP-SIM
C14:0 (miristato de metila)	74+89+242
C16:1 (palmitoleato de metila)	74 +147+270
C16:0 (palmitato de metila)	74 +221+268
C18:2 (linoleato de metila)	67+93+164+265
C18:1 (oleato de metila)	55+ 93+194+265
C18:0 (estearato de metila)	74+255+298
C20:0 (eicosanoato de metila)	74+175+ 236

* o primeiro íon é o que foi utilizado para quantificação e os demais para identificação.

Além disso, para fins de confirmação da identidade dos analitos os seus espectros de massa foram comparados com os espectros de massa da biblioteca NIST 2008 com similaridade mínima de 90%.

1. Validação de metodologia por GC-MS

Para garantir a qualidade dos resultados da análise de FAME por GC-MS, foi realizada a validação analítica do método de análise. Foram avaliados os seguintes parâmetros: linearidade, limite de detecção e limite de quantificação, (ANVISA, 2003).

Para validação da linearidade foram construídas três curvas de calibração no solvente. Os níveis estudados foram 0,5; 1,0; 2,5; 7,5; 15; 25 e 50 ug/mL. A linearidade do método foi avaliada a partir da equação da regressão linear determinada pelo método dos mínimos quadrados ordinários. O coeficiente de correlação linear (r) foi usado como parâmetro para avaliar a adequação da reta como modelo matemático (ANVISA, 2003).

A estimativa do limite de detecção (LD) foi calculada segundo a ANVISA (2003) pela seguinte equação:

$$LD = \frac{DPa * 3}{IC}$$

Em que: DPa é a estimativa do desvio padrão da interceptação (coeficiente linear) das curvas construídas em solvente e IC = inclinação da curva de calibração (coeficiente angular).

O limite de quantificação (LQ) foi calculado segundo a RE 899/2003 da ANVISA pela seguinte equação:

$$LQ = \frac{DPa * 10}{IC}$$

Em que: DPa é a estimativa do desvio padrão da interceptação (coeficiente linear) das curvas construídas em solvente e IC = inclinação da curva de calibração (coeficiente angular).

Abaixo, na Tabela 2 encontram-se as figuras de mérito obtidas para Linearidade, limite de detecção (LOD), limite de quantificação (LOQ) para ésteres metílicos de ácidos graxos em óleo de Castanha do Pará por GC-MS.

Tabela 2. Linearidade, limite de detecção (LOD), limite de quantificação (LOQ) para ésteres metílicos de ácidos graxos em óleo de Castanha do Pará por GC-MS.

Composto	r	Equação	LOD (ug mL ⁻¹)	LOQ (ug mL ⁻¹)
C14:0	0,9984	$y = 0,0667x + 0,0421$	0,08	0,25
C16:1	0,9984	$y = 0,012x + 0,01$	0,08	0,25
C16:0	0,9934	$y = 0,0983x + 0,2066$	0,15	0,52
C18:2	0,9973	$y = 0,0178x + 0,0141$	0,10	0,33
C18:1	0,9898	$y = 0,0147x + 0,0382$	0,19	0,64
C18:0	0,9944	$y = 0,0557x + 0,0968$	0,14	0,47
C20:0	0,9983	$y = 0,0497x + 0,0778$	0,14	0,47

Referencias

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução - Resolução - RE nº 899, de 29 de maio de 2003. "Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos"

Anexo G - Composição do meio de cultura Agar Sabouraud glicose

	g/litro
Peptona.....	10
Dextrose.....	40
Agar.....	15